

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2020.40551

马琼, 向建伟, 牟若兰, 邓腊青, 王运, 周明. 蓝细菌光敏色素 Alr1966GAF2 及其突变体的表达与光化学性质研究 [J]. 植物科学学报, 2020, 38(4): 551~557

Ma Q, Xiang JW, Mou RL, Deng LQ, Wang Y, Zhou M. Expression and photochemical properties of cyanobacteriochrome Alr1966GAF2 and its mutants [J]. Plant Science Journal, 2020, 38(4): 551~557

## 蓝细菌光敏色素 Alr1966GAF2 及其突变体的表达与光化学性质研究

马琼<sup>1,2\*</sup>, 向建伟<sup>1,2</sup>, 牟若兰<sup>1,2</sup>, 邓腊青<sup>1,2</sup>, 王运<sup>1,2</sup>, 周明<sup>3</sup>

(1. 湖北民族大学生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北恩施 445000; 2. 湖北民族大学生物科学与技术学院, 湖北恩施 445000; 3. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 采用 PCR 技术从鱼腥藻 (*Anabaena* sp. PCC7120) 中扩增蓝细菌光敏色素基因片段 *alr1966gaf2*, 将 *alr1966gaf2* 插入到 pET-30a (+) 载体中, 构建表达质粒 pET-*alr1966gaf2*。最后将 Alr1966GAF2 与 HO1、PcyA 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中共表达获得色素蛋白 Alr1966GAF2, 并对该蛋白的光化学性质进行分析。结果显示, 色素蛋白 Alr1966GAF2 结合色素为藻蓝胆素 (phycoerythrobilin, PCB) 或藻紫胆素 (phycoviolobilin, PVB), 在 3 种不同吸收态 15Z-P<sub>428 nm</sub>、中间态和 15E-P<sub>514 nm</sub> 之间具有顺序可逆光效应。通过定点突变技术将 DXCF 基序中的保守性 Cys 突变为 Ala, 获得了突变体 Alr1966GAF2(C72A)。将 Alr1966GAF2(C72A) 与 HO1、PcyA 共表达, 获得色素蛋白 Alr1966GAF2(C72A)。研究结果表明 Alr1966GAF2(C72A) 结合色素为 PCB, Alr1966GAF2(C72A)-PCB 具有较强的荧光活性, 其荧光量子的产率高达 0.11。Alr1966GAF2(C72A) 不仅能够共价结合 PCB, 还可以结合胆绿素 (Biliverdin, BV), 均具有较强的红色荧光活性。

**关键词:** 蓝细菌光敏色素; 顺序可逆光效应; 红色荧光蛋白; 胆绿素

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2020)04-0551-07

## Expression and photochemical properties of cyanobacteriochrome Alr1966GAF2 and its mutants

Ma Qiong<sup>1,2\*</sup>, Xiang Jian-Wei<sup>1,2</sup>, Mou Ruo-Lan<sup>1,2</sup>, Deng La-Qing<sup>1,2</sup>, Wang Yun<sup>1,2</sup>, Zhou Ming<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China; 2. College of Biological Science and Technology, Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China; 3. Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** To construct pET-*alr1966gaf2*, a fragment of *alr1966gaf2* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from *Anabaena* sp. PCC7120, and then inserted into pET-30a (+). For over-expression, pET-*alr1966gaf2* was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) containing pACYC-ho1-pcyA and biliproteins were co-expressed successfully. Results showed that bili-Alr1966GAF2 had a sequential reversible photoconversion in three different states. We also detected red fluorescence reversible photoconversion of Alr1966GAF2 in

收稿日期: 2019-10-24, 退修日期: 2019-12-26。

基金项目: 恩施州科技计划项目 (D20190025); 国家自然科学基金 (21472055); 湖北民族大学高水平科研成果校内培育项目 (PY20200); 湖北民族大学大学生科研训练项目 (X201910517274, X201910517231)。

This work was supported by grants from the Project of Science and Technology of Enshi (D20190025), National Natural Science Foundation of China (21472055), Incubation Project for High-Level Scientific Research Achievements of Hubei Minzu University (PY20200), and Project of Student Research Training from Hubei Minzu University (X201910517274, X201910517231)。

作者简介: 马琼 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为蓝细菌光合作用与蛋白质工程 (E-mail: maqiong110@126.com)。

\* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: maqiong110@126.com)。

15E-P<sub>514 nm</sub>/15Z-P<sub>428 nm</sub> forms. Via site-directed mutagenesis, we mutated conserved Cys into Ala in the conserved DXCF motif of Alr1966GAF2, resulting in Alr1966GAF2 (C72A). Alr1966GAF2 (C72A)-PCB showed strong red fluorescence and high fluorescence quantum yield of 0.11. Furthermore, Alr1966GAF2 (C72A) could bind to phycoerythrobilin (PCB) and biliverdin (BV) covalently, with strong red fluorescence. Therefore, as a red fluorescent protein, Alr1966GAF2 (C72A) could be further developed as a fluorescent probe and applied in life sciences.

**Key words:** Cyanobacteriochrome; Sequential reversibility; Red fluorescent protein; Biliverdin

蓝细菌光敏色素(cyanobacteriochromes, CBCRs)是蓝细菌捕光系统的重要组成部分, CBCRs的N末端含有GAF(cGMP phosphodiesterase, adenylyl cyclase and FhlA protein domain, GAF)结构域, 该结构域可以共价结合线性四吡咯色素, 在色素化过程中起绑定色素的作用<sup>[1, 2]</sup>。少数CBCRs既能够结合胆绿素(biliverdin, BV), 又能够结合藻蓝胆素(phycoerythrobilin, PCB)。BV广泛存在于生物细胞内, 它是由生物细胞内源的血红素在血红素氧化酶(heme oxygenase 1, HO1)的催化作用下形成的四吡咯色素中间产物。PCB的生物合成也源于血红素, 首先血红素被血红素氧化酶HO1氧化为BV, 随后BV在蓝细菌胆绿素还原酶PcyA的还原作用下转化为PCB<sup>[3]</sup>。

目前仅在海洋藻*Acaryochloris marina*中发现了能够结合BV的CBCRs<sup>[4, 5]</sup>, 尚未在淡水藻中发现结合BV的CBCRs。分析鱼腥藻(*Anabaena* sp. PCC7120)中蓝藻光敏色素蛋白Alr1966GAF2的氨基酸序列及其结构域, 发现Alr1966GAF2与红色荧光蛋白RGS(编码基因slr1393)的同源性达38%<sup>[4]</sup>。

本研究利用PCR和蛋白质体外表达技术, 从淡水鱼腥藻(*Anabaena* sp. PCC7120)中获得了CBCRs辅基蛋白Alr1966GAF2, 实验结果表明Alr1966GAF2能够共价结合PCB和藻紫胆素(phycoviolobilin, PVB), 且具有明显的顺序可逆光效应, 但不能结合生物细胞内普遍存在的BV。利用定点诱变技术对Alr1966GAF2中保守

性DXCF基序中的半胱氨酸Cys进行突变, 获得了Alr1966GAF2(C72A), 该突变体能够结合PCB和BV, 且具有较强的红色荧光活性, 因此Alr1966GAF2(C72A)作为红色荧光蛋白可以进一步开发为荧光探针。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用载体pET-30a(+)购买于Novagen公司; 鱼腥藻购买自中国科学院淡水藻种库(Freshwater Algae Culture Collection at the Institute of Hydrobiology, FACHB); MutanBEST Kit定点突变试剂盒为Takara公司产品。质粒pACYC-ho1-pcyA、pACYC-ho1和大肠杆菌*E. coli* BL21(DE3)由华中农业大学惠赠。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 表达质粒的构建

以鱼腥藻基因组为模板, 以P1、P2为引物(表1), 对*alr1966gaf2*进行体外扩增, 扩增程序为: 94℃预变性240 s; 94℃变性60 s; 48℃退火60 s; 72℃延伸60 s; 共循环30次; 最后72℃延伸300 s。经检测, 扩增产物大小为480 bp。进一步将*alr1966gaf2*克隆到pET-30a(+)载体中, 获得表达质粒pET-alr1966gaf2。以pET-alr1966gaf2为模板, P3、P4为引物, 利用定点突变技术体外扩增*alr1966gaf2*(C72A)基因片段, 构建突变体表达质粒pET-alr1966gaf2(C72A)。

表1 构建质粒所用引物  
Table 1 Primers used for plasmid construction

Primer	Sequence(5'-3')	DNA
P1	GAAGGATCCGAAACCCCTTGATATTGAA	<i>alr1966gaf2</i>
P2	CGCGTCGACTTATTGCCTAGTTGTAG	
P3	CCTGCATTTCAAAAGATTAC	
P4	ATCAAGAATATTTGTCCCAGTAC	<i>alr1966gaf2</i> (C72A)

### 1.2.2 荧光蛋白的表达与纯化

将 pET 表达质粒转化含有催化 PCB 生物合成质粒 pACYC-ho1-pcyA 或催化 BV 生物合成质粒 pACYC-ho1 的 *E. coli* BL21 (DE3)，在含有 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  硫酸卡那霉素的 LB 平板上进行筛选，挑取阳性单克隆接种于 LB 液体培养基中。培养至对数期后，加入 IPTG(1 mmol/L) 进行诱导，避光表达 14 ~ 15 h 后，以 4000 g 转速离心收集细胞，再采用用 ddH<sub>2</sub>O 洗涤、离心。将沉淀细胞重悬于 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液(含 0.5 mol/L NaCl, pH7.2) 中，超声技术破碎细菌细胞。于 9000 g、4℃条件下离心 15 min，收集上清液。利用镍离子亲和层析柱对色素蛋白进行纯化，亲和层析柱平衡缓冲液 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液(含 0.5 mol/L NaCl, pH7.2)，采用含 0.05 mol/L 咪唑的磷酸钾缓冲液洗脱杂蛋白，然后再采用含 0.5 mol/L 咪唑的磷酸钾缓冲液<sup>[6, 7]</sup>洗脱目的色素蛋白。

### 1.2.3 色素蛋白的 SDS-PAGE

将色素蛋白和 SDS-PAGE 上样缓冲液以一定比例混匀，煮沸 15 min 后，于 9000 g、4℃条件下离心 10 min，取适量上清样品进行 SDS-PAGE 检测。将 SDS-PAGE 胶置于 1.5 mol/L 醋酸锌溶液中浸泡 10 min，在紫外灯下检测锌荧光，随后用考马斯亮蓝 R-250 染色，鉴定色素蛋白的表达量<sup>[8]</sup>。

### 1.2.4 色素蛋白的光谱分析

色素蛋白的光化学性质可以根据其特定的光谱特征进行判断。将干涉滤光片插入冷光源 Intralux 6000 (Volpi) 的光栅中，其输出端是滤光片所对应的单色光。将 200 ~ 400  $\mu\text{L}$  色素蛋白溶液置于石英比色皿中，在某种单色光下照射 5 min，使其处于一种光状态，扫描该状态色素蛋白的吸收光谱和荧光光谱。更换滤光片，即用另一种单色光照射色素蛋白 5 min，使其处于另一种光状态，扫描不同光状态色素蛋白的吸收光谱和荧光光谱<sup>[9, 10]</sup>。如果色素蛋白能够在不同光状态之间发生可逆变化，则可以判断该色素蛋白具有可逆光效应。根据所测的吸收光谱和荧光光谱，计算色素蛋白的荧光量子产率  $\Phi_F$ <sup>[11]</sup>。

### 1.2.5 色素蛋白的变性

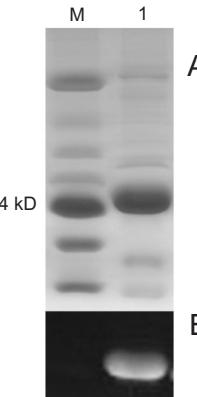
为了弄清藻胆色素与辅基蛋白结合过程中色素

类型是否发生变化，确定蛋白质结合色素的类型，本研究利用酸性尿素溶液(8 mol/L, pH1.5)变性色素蛋白，变性后辅基蛋白与色素分离，色素呈游离状态，测定变性产物上清的吸收光谱，根据其吸收光谱性质判断辅基蛋白结合色素的类型。根据色素蛋白变性前后的吸收光谱性质和游离色素的摩尔消光系数，利用 Lambert-Beer 定律，计算色素蛋白的摩尔消光系数  $\epsilon_{\text{Vis}}$ <sup>[12, 13]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 Alr1966GAF2 色素蛋白的表达及其锌荧光性质

本研究将 Alr1966GAF2 与 HO1、PcyA 在 *E. coli* BL21 中共表达，获得了结合藻胆色素的 Alr1966GAF2(图 1: A)。结果表明藻胆色素与锌离子能够形成螯合物，且经紫外光照射后能够发射荧光(图 1: B)。Alr1966GAF2 色素蛋白具有清晰的锌荧光活性，可以确定 Alr1966GAF2 能够与藻胆色素共价结合。



M: 蛋白质标准分子量; 1: Alr1966GAF2 色素蛋白; A: 考马斯亮蓝染色; B: 锌溶液染色。

M: Marker protein; 1: Bili-Alr1966GAF2; A: Stained with Coomassie brilliant blue; B: Stained with Zn<sup>2+</sup> solution.

图 1 色素蛋白 Alr1966GAF2 的 SDS-PAGE 染色结果

Fig. 1 SDS-PAGE profiles of bili-Alr1966GAF2 stained with Coomassie brilliant blue or Zn<sup>2+</sup> solution

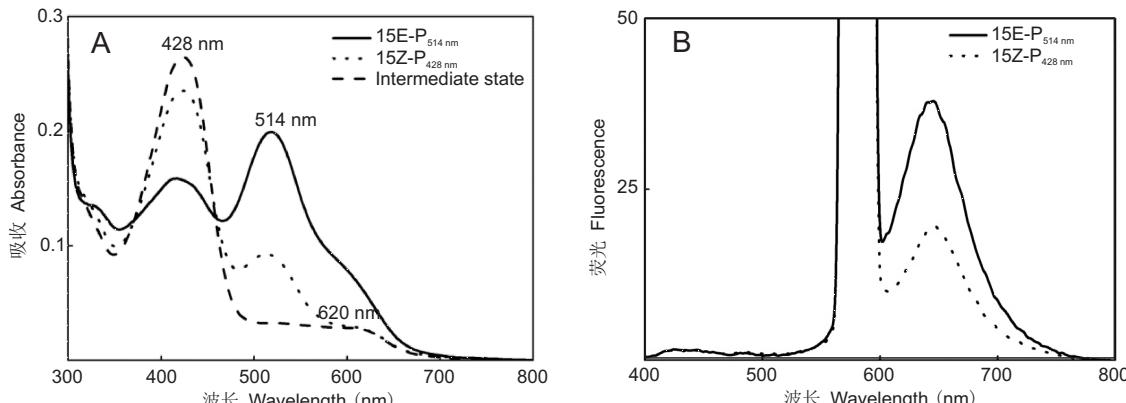
### 3.2 Alr1966GAF2 色素蛋白的光化学性质及其顺序可逆光效应

本研究发现，Alr1966GAF2 色素蛋白具有明显的可逆光效应，其可逆光效应独特。当分别采用 420、510、600 nm 单色光照射该色素蛋白时，该蛋白分别处于 3 种不同的吸收态(图 2)。利用 420 nm 蓝光照射色素蛋白时，其在 514 nm 处有最大吸收峰，且在 600 nm 附近出现一个宽肩峰；

随后利用 600 nm 红光照射, 色素蛋白在 600 nm 处的宽肩峰消失, 在 514 nm 处的吸收峰降低, 同时在 428 nm 处的吸收峰升高; 利用 510 nm 绿光照射色素蛋白, 色素蛋白在 514 nm 处的吸收余峰消失, 同时在 428 nm 处的吸收峰再次小幅升高。

进一步采用酸性尿素溶液对这 3 种状态的色素蛋白进行变性, 获得其变性产物的吸收光谱(图 3: A)和差减光谱(图 3: B)。分析色素蛋白的自然吸收光谱(图 2: A)以及变性吸收光谱(图 3: A), 发现 Alr1966GAF2 经 420 nm 蓝光照射之后, 色素蛋白处于  $15E-P_{514 nm}$ , 结合色素为  $15E$ -PCB 和  $15E$ -PVB; 随后经 610 nm 红光照射, 色素蛋白处于中间混合状态  $15Z-P_{428 nm}$  和  $15E-P_{514 nm}$  之间, 可

以结合色素  $15Z$ -PCB 和  $15E$ -PVB, 因此 610 nm 红光照射将  $15E-P_{514 nm}$  结合的  $15E$ -PCB 结构改变为  $15Z$ -PCB。当利用 510 nm 绿光照射色素蛋白, 色素蛋白处于  $15Z-P_{428 nm}$  状态, 结合色素为  $15Z$ -PCB 和  $15Z$ -PVB, 由此可知 510 nm 绿光照射使  $15E-P_{514 nm}$  结合的  $15E$ -PVB 异构为  $15Z$ -PVB。这 3 种状态的 Alr1966GAF2 结合色素的变化顺序依次为  $15E$ -PCB/PVB  $\rightarrow$   $15Z$ -PCB/ $15E$ -PVB  $\rightarrow$   $15Z$ -PCB/ $15Z$ -PVB, 该变化现象称为顺序可逆光效应<sup>[14]</sup>。CBCRs 与藻胆色素的共价结合是一个自催化过程, 某些 CBCRs 能够将部分 PCB 异构为 PVB<sup>[15]</sup>。在色素化过程中, Alr1966GAF2 能够将部分 PCB 异构为 PVB。

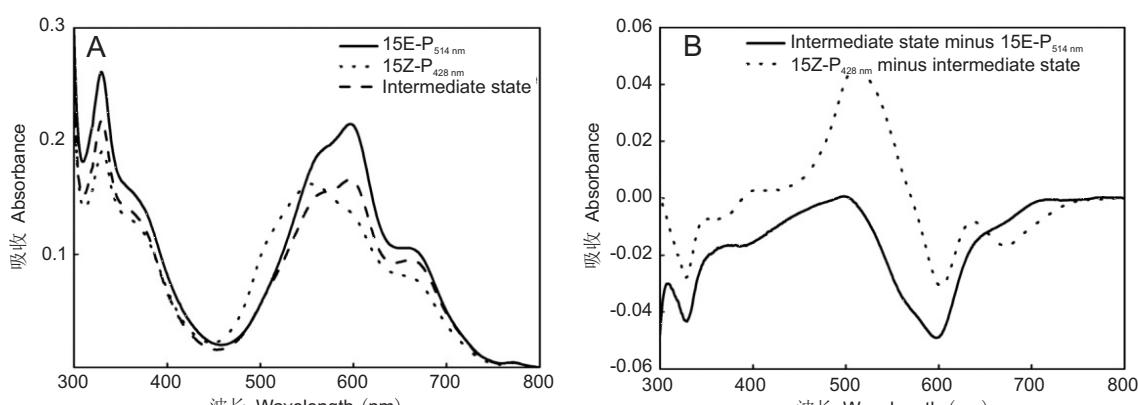


A: 色素蛋白 Alr1966GAF2 处于  $15E-P_{514 nm}$ 、 $15Z-P_{428 nm}$  和中间状态的吸收光谱; B: 色素蛋白 Alr1966GAF2 处于  $15E-P_{514 nm}$  和  $15Z-P_{428 nm}$  的荧光光谱。

A: Absorption spectra of bili-Alr1966GAF2 in  $15E-P_{514 nm}$ ,  $15Z-P_{428 nm}$  and intermediate state; B: Fluorescence spectra of bili-Alr1966GAF2 in  $15E-P_{514 nm}$  and  $15Z-P_{428 nm}$ .

图 2 不同状态色素蛋白 Alr1966GAF2 的可逆吸收光谱(A)和荧光光谱(B)

Fig. 2 Reversible absorption spectra (A) and fluorescence spectra (B) of bili-Alr1966GAF2 in different states



A: 变性的 Alr1966GAF2 处于  $15E-P_{514 nm}$ 、 $15Z-P_{428 nm}$  和中间状态的吸收光谱; B: 变性的 Alr1966GAF2 中间状态差减  $15E-P_{514 nm}$  和  $15Z-P_{428 nm}$  差减中间状态的吸收光谱。

A: Absorption spectra of denatured of bili-Alr1966GAF2 in  $15E-P_{514 nm}$ ,  $15Z-P_{428 nm}$  and intermediate state; B: Different absorption spectra of intermediate state minus  $15E-P_{514 nm}$  and  $15Z-P_{428 nm}$  minus intermediate state of bili-Alr1966GAF2.

图 3 不同状态色素蛋白 Alr1966GAF2 的变性吸收光谱(A)和差减光谱(B)

Fig. 3 Absorption spectra (A) of denatured Alr1966GAF2 and different absorption spectra (B) of bili-Alr1966GAF2

色素蛋白 Alr1966GAF2 在上述 3 种不同吸收态之间具有可逆光效应, 但其可逆光效应主要发生在 15E-P<sub>514 nm</sub> 和 15Z-P<sub>428 nm</sub> 之间, 色素蛋白处于 15E-P<sub>514 nm</sub> 时荧光发射峰 ( $\lambda = 645$  nm) 较高, 荧光量子的产率为 0.04; 而处于 15Z-P<sub>428 nm</sub> 时荧光发射峰较低(图 2: B)。

### 3.3 突变体 Alr1966GAF2(C72A)结合 PCB 的光谱性质

研究结果显示, 色素蛋白 Alr1966GAF2 具有保守的 DXCF 和 CH 基序(图 4)。本研究利用定点突变技术将 Alr1966GAF2 中保守的 DXCF 基序中的 Cys 突变为 Ala, 获得突变体 Alr1966GAF2(C72A)。将 Alr1966GAF2(C72A)与 HO1、PcyA 在 *E. coli* BL21 中共表达, 获得了纯化的色素蛋白 Alr1966GAF2(C72A)。色素蛋白 Alr1966GAF2(C72A)在 621 nm 处有最大吸收峰, 在 650 nm 处有最大荧光发射峰(图 5: A), 其荧光发射峰与野生型 15E-P<sub>514 nm</sub> 相比有 5 nm 红移, 荧光量子产

率高达 0.11, 是野生型的 2.75 倍。变性分析结果表明 Alr1966GAF2(C72A)结合色素的最大吸收峰为 660 nm, 此为 PCB 的特征吸收峰(图 5: B), 说明 Alr1966GAF2 保守基序 DXCF 中的 Cys 是使 PCB 自催化异构为 PVB 的必要条件, 该 Cys 突变后, 突变体 Alr1966GAF2(C72A)可通过保守基序 CH 中的 Cys 结合更多的 PCB。

### 3.4 突变体 Alr1966GAF2(C72A)可以共价结合胆绿素

本研究将 Alr1966GAF2(C72A)与 HO1 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中共表达, 结果显示纯化的 Alr1966GAF2(C72A)色素蛋白溶液呈浅绿色, 初步表明 Alr1966GAF2(C72A)辅基蛋白能够结合胆绿素 BV。Alr1966GAF2(C72A)-BV 的吸收光谱和荧光发射光谱分析结果表明(图 6: A), Alr1966GAF2(C72A)-BV 在 409 nm 和 620 nm 处有较强吸收, 在 650 nm 处有最大荧光发射峰, 具有较强的荧光活性。Alr1966GAF2(C72A)-BV

Alr2279	SDG—SGKVVQEAVMPGWSVTLQD1YDPC1KDGYLNMYRDGRITA1ADVYQGGLKPCY
Alr1966GAF2	ADG—SGTVVQESVLPGPWVVLGQN11DPC1QKDYVDKYRQGRVSA1VDVTKA1QECU
Al11280GAF2	PDM—SGK1VAESVVKPGW1KIALGAD1QDN1C1QSGAGADYRQG1KRA1AN1YTAELTDCH
A112239	PDM—SG1VVAES1LPGW1ATKGQ1IEDK1C1QDSAG1N1H1QLKKRA1ND1YQAGLTNCY
NpF1883GAF2	ANW—SGTV1AESV1PGYPKVLRSE1QDPC1GQGYVEKYQSGRVATTNN1YQAGLADCH
NpF1883GAF3	ANW—SGTV1AESVVL1TYPKVLRAE1EDPC1GQGYVKEYQSGRV1A1NN1YEVGLADCH
NpF1883GAF4	ANW—FG111AESVVPGPV1KLRSK11DSC1TQGY1EKYQSGRVVA1NN1YESGLADCH
A113691GAF2	LDVNYEYGEFVAEDVSPAFPSALAVK1QD1C1GENYANLYKQGR1CA1TDVQSS1LDCH
T1r1999	DDW—RG1MDVEAVVPPW1SALGDVYGDSC1TQGYVEAYKGR1II1VNSLEKASVAPCY
T1r0911	ADG—TGEVVAESVAAAPPFSL1I1RTFH1DPC1TRESAE1YVQGRV1A1D1NTATLACQCH
T1r0924	GDG—SG1VVAEATTLPQYS1LGQV11DPC1TKE1ARRFLEGRTLS1SDV1Q1AQLQDCY
Alr3356	WQW—HIGQVTFEAL1S1EEFS1LGSTGA1DEC1NDEY1A1YLAGRTKA1AD1ESE1P1TC1

图 4 Alr1966GAF2 的保守基序分析  
Fig. 4 Multiple sequence alignment of GAF domains of DXCF CBCRs

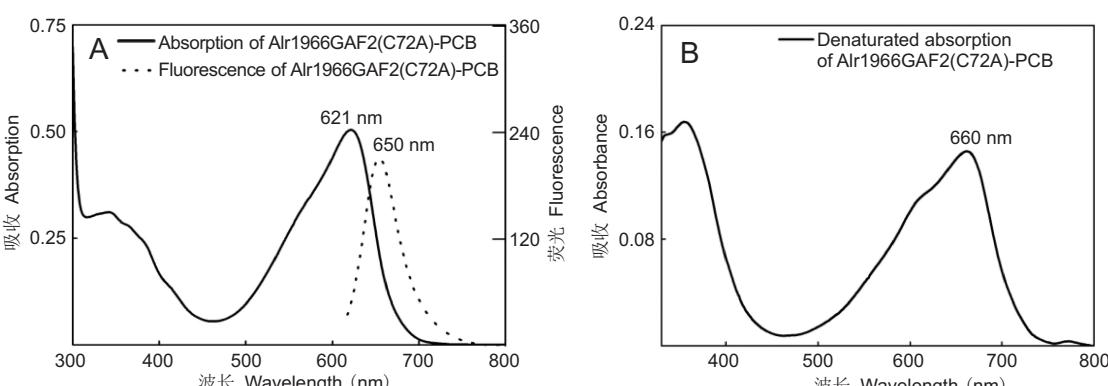


图 5 Alr1966GAF2(C72A)-PCB 的吸收光谱与荧光光谱 (A) 及其变性吸收光谱 (B)  
Fig. 5 Absorption and fluorescence spectra (A) and denatured absorption (B) of Alr1966GAF2(C72A)-PCB

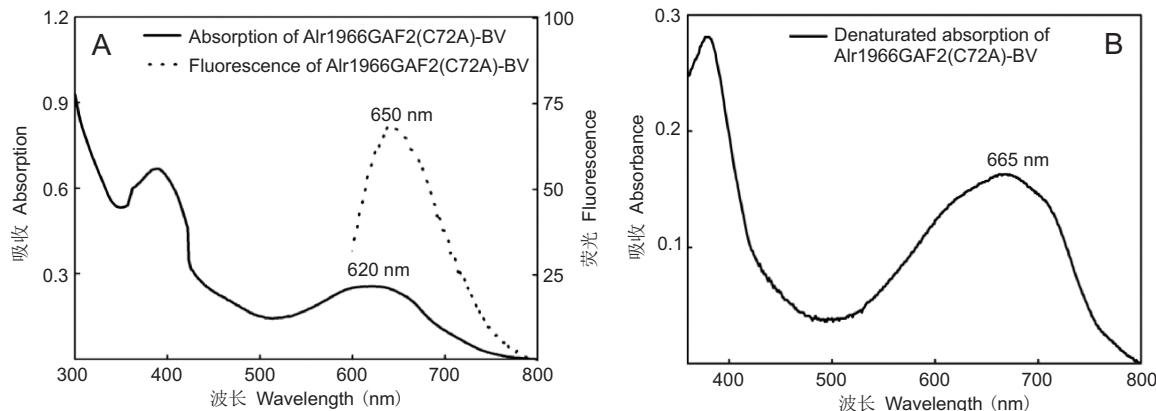


图 6 Alr1966GAF2(C72A)-BV 的吸收光谱与荧光光谱(A)及其变性吸收光谱(B)

Fig. 6 Absorption and fluorescence spectra (A) and denatured absorption (B) of Alr1966GAF2(C72A)-BV

经酸性尿素变性, 分析变性产物的吸收光谱(图 6: B), 发现变性产物在 665 nm 处具有最大吸收峰, 此为游离胆绿素的特征吸收峰, 由此进一步说明 Alr1966GAF2(C72A)共价结合色素为 BV。

#### 4 讨论

本研究将 Alr1966GAF2 与 HO1、PcyA 在 *E. coli* BL21 中共表达, 发现获得的 Alr1966GAF2 色素蛋白具有顺序可逆光效应, 变性分析结果表明 Alr1966GAF2 可以自催化结合 PCB 或 PVB, 或结合 PCB/PVB 混合色素, 由此可知 Alr1966GAF2 能够将 PCB 异构为 PVB, Alr1966GAF2 具有裂合酶和异构酶的双重功能。顺序可逆光效应在 DXCF CBCRs 中并不常见, 目前研究者仅在蓝细菌光敏色素蛋白 NpF1883 GAF2、NpF1883 GAF3、NpF1883 GAF4 及 Tlr0924 中发现了类似的顺序可逆光效应, CBCRs 的顺序可逆光效应与其在蓝细菌中的互补色适应生理功能有关<sup>[16]</sup>。

进一步利用分子突变技术对蓝细菌光敏色素 Alr1966GAF2 中 DXCF 基序中的 Cys 进行突变, 获得突变体 Alr1966GAF2(C72A)。将 Alr1966GAF2(C72A)与 HO1、PcyA 在 *E. coli* BL21 中共表达, 发现 Alr1966GAF2(C72A)仅结合 PCB, 由此表明 CBCRs 保守性基序 DXCF 中的 Cys 是自催化 PCB 异构为 PVB 的必要条件。Alr1966GAF2(C72A)-PCB 具有较强的荧光活性, 其荧光量子的产率高达 0.11, 较野生型 Alr1966GAF2 15E-P<sub>514 nm</sub> 有较大程度地提高, 这是因为 Alr1966GAF2 的 C72A 位点突变为 A72, 改变了辅基蛋白与色素结合的空间结

构, 从而改变了色素结合类型和色素结合比率。将 Alr1966GAF2(C72A)与 HO1 在 *E. coli* BL21 中共表达, 结果显示 Alr1966GAF2(C72A)能够共价结合 BV, Alr1966GAF2(C72A)-BV 也具有较强的荧光活性。因此, Alr1966GAF2(C72A)作为红色荧光蛋白可以进一步开发荧光探针。

与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)及其突变体相比, 蓝细菌光敏色素红色荧光蛋白 Alr1966GAF2(C72A)的分子量更小, 发射波长更长, 因此其在生物细胞内成像背景干扰低, 可以提供分辨率更高的图像, 能够作为一种新型的荧光蛋白探针, 应用于生物细胞成像领域。然而蓝细菌光敏色素红色荧光蛋白在生物细胞成像方面的应用尚处于起步阶段, 相信对蓝细菌光敏色素红色荧光蛋白进一步深入研究, 提高荧光蛋白细胞的产量及荧光量子产率, 必将为蓝细菌光敏色素红色荧光蛋白在生物细胞成像方面的应用开辟更广阔前景。

#### 参考文献:

- [1] Sun YF, Xu JG, Tang K, Miao D, Gärtner W, et al. Orange fluorescent proteins constructed from cyanobacteriochromes chromophorylated with phycoerythrobilin [J]. *Photochem Photobiol*, 2014, 13(5): 757-763.
- [2] Fushimi K, Enomoto G, Ikeuchi M, Narikawa R. Distinctive properties of dark reversion kinetics between two red/green-type cyanobacteriochromes and their application in the photoregulation of cAMP synthesis [J]. *Photochem Photobiol*, 2017, 93(3): 681-691.
- [3] Ma Q, Zheng XJ, Zhou Z, Zhou M. Fluorescence spectra properties of All4261 binding with phycocyanobilin in *E. coli* [J]. *J Appl Spectrosc*, 2014, 81(3): 437-441.

- [ 4 ] Sato M, Ikeuchi M. A biliverdin-binding cyanobacteriochrome from the chlorophyll d-bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*[ J ]. *Sci Rep*, 2015, 7950(5) : 1–10.
- [ 5 ] Fushimi K, Nakajima T, Aono Y, Yamamoto T, Win NN, et al. Photoconversion and fluorescence properties of a red/green-type cyanobacteriochrome AM1\_C0023g2 that binds not only phycocyanobilin but also biliverdin[ J ]. *Front Microbiol*, 2016, 26(7) : 1–12.
- [ 6 ] Rumyantsev KA, Shcherbakova DM, Zakharova NI, Verkhusha VV, Turoverov KK. Design of near-Infrared single-domain fluorescent protein GAF-FP based on bacterial phytochrome[ J ]. *Cell Tissue Biol*, 2017, 11(1) : 16–26.
- [ 7 ] Richie CT, Whitaker LR, Whitaker KW, Necarsulmer J, Baldwin HA, et al. Near-infrared fluorescent protein iR-FP713 as a reporter protein for optogenetic vectors, a transgenic cre-reporter rat, and other neuronal studies [ J ]. *J Neurosci Meth*, 2017, 284: 1–14.
- [ 8 ] Tang K, Ding WL, Höppner A, Zhao C, Zhang L, et al. The terminal phycobilisome emitter, LCM: A light-harvesting pigment with a phytochrome chromophore[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(52) : 15880–15885.
- [ 9 ] Zhang J, Wu XJ, Wang ZB, Chen Y, Wang X, Zhou M, et al. Fused-gene approach to photoswitchable and fluorescent bili-proteins[ J ]. *Angew Chem Int Edit*, 2010, 49(32) : 5456–5458.
- [ 10 ] Reichhart E, Ingles-Prieto A, Tichy AM, McKenzie C, Janovjak H, et al. A phytochrome sensory domain permits receptor activation by red light[ J ]. *Angew Chem Int Edit*, 2016, 55(21) : 6339–6342.
- [ 11 ] Bugaj LJ, Choksi AT, Mesuda CK, Kane RS, Schaffer DV. Optogenetic protein clustering and signaling activation in mammalian cells[ J ]. *Nat methods*, 2013, 10(3) : 249–253.
- [ 12 ] 王晓辉. 增强型绿色荧光蛋白在 DH5 $\alpha$  大肠杆菌中的表达 [ J ]. 食品科学, 2010, 31(21) : 200–203.
- Wang XH. Expression of enhanced green fluorescent protein in DH5 $\alpha$ [ J ]. *Food science*, 2011, 31(21) : 200–203.
- [ 13 ] Leopold AV, Chernov KG, Shemetov AA, Verkhusha VV. Neurotrophin receptor tyrosine kinases regulated with near-infrared light[ J ]. *Nat Commun*, 2019, 10: 1129.
- [ 14 ] Bugaj LJ, Spelke DP, Mesuda CK. Regulation of endogenous transmembrane receptors through optogenetic Cry2 clustering[ J ]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6898.
- [ 15 ] Xu ZQ, Han JX, Tang QY, Ding WL, Miao D, et al. Far-red light photoacclimation: Chromophorylation of FR induced  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of allophycocyanin[ J ]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, 1857(9) : 1607–1616.
- [ 16 ] 马涛, 姚明月, 刘延琳. 酿酒酵母 APA1 的定点突变以及与增强型绿色荧光蛋白 EGFP 基因的共表达 [ J ]. 食品科学, 2015, 36(23) : 200–203.
- Ma T, Yao MY, Liu YL. Site-directed mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae* APA1 and co-expression with EGFP[ J ]. *Food science*, 2015, 36(23) : 200–203.

(责任编辑: 周媛)