

鱼腥藻 PCC7120 细菌光敏色素缺失突变体的自催化重组研究

甘春晖, 冉勇, 赵开弘

(华中科技大学环境科学与工程学院, 武汉 430074)

摘要: 采用聚合酶链式反应(PCR)从鱼腥藻 PCC7120 DNA 中扩增出细菌光敏色素缺失突变体基因 *aphA*(26-320)、*aphA*(27-320)、*aphA*(28-320)、*aphA*(29-320)和 *aphA*(32-320), 利用表达载体 pET30a 进行高效表达, 获得的 AphA 缺失突变体脱辅基蛋白在一定的反应体系下与藻蓝胆素进行了体外重组的研究。研究表明: AphA(26-320)体外重组获得的色素蛋白具有与植物光敏色素相似的可逆光致变色效应, 同时酸性尿素变性实验和 Zn^{2+} 荧光电泳实验显示藻蓝胆素和以上蛋白质发生共价连接。AphA(26-320)与藻蓝胆素重组产物的 Pr/Pfr 吸收峰处于 660/610 nm。其他 4 个缺失突变体, AphA(27-320)、AphA(28-320)、AphA(29-320)、AphA(32-320)和藻蓝胆素的重组产物中则没有发现可逆光致变色信号, 表明这些缺失突变体不能和藻蓝胆素发生自催化重组。维系细菌光敏色素 AphA 与色素自催化连接的裂合酶结构域位于 AphA(26-320)包含的肽链之中。

关键词: 细菌光敏色素; 聚合酶链式反应(PCR); 缺失突变体; 体外重组

中图分类号: Q784

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)06-0505-06

Study on the Auto-assembly of Truncated Phytochrome from *Synechocystis* sp. PCC7120

GAN Chun-Hui, RAN Yong, ZHAO Kai-Hong

(College of Environmental Science & Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Five truncated fragments of *aphA* gene were amplified from the genomic DNA of *Synechocystis* sp. PCC7120 by PCR, including *aphA*(26-320), *aphA*(27-320), *aphA*(28-320), *aphA*(29-320) and *aphA*(32-320). After expression via the vector pET30, reconstitutions of the expressed mutated apo-proteins with phycocyanobilin (PCB) were studied *in vitro* under certain conditions. The results showed: The chromoprotein that obtained from the reconstitution of AphA(26-320) had similar photochemical properties of plant phytochrome. The covalent binding of PCB with the chromoprotein was verified further by acid-urea denaturation and UV-induced fluorescence by Zn^{2+} -SDS gel tests. The maximal Pr/Pfr absorption of AphA(26-320) was at 660/610 nm. The other four truncated fragments, AphA(27-320), AphA(28-320), AphA(29-320), AphA(32-320) could not auto-assembly with PCB in the similar conditions, as no reversible photochemistry was detected. The results implicates that the lyase domain of AphA existing in AphA(26-320).

Key words: Bacteriophytochromes; Polymerase chain reaction(PCR); Truncated fragment; Reconstitution

细菌光敏色素是原核生物中存在的光敏色素, 在细菌的光形态生成中发挥重要作用。藻胆色素与脱辅基蛋白共价结合形成特定的构象, 使得细菌光敏色素主要吸收 650~750 nm 范围内的可见光, 并表现出与植物光敏色素相似的红光/红外光光致可

逆变色效应^[1]。对不同种属原核生物的研究表明, 细菌光敏色素具有与高等植物光敏色素相似的核心区域, 其 N 端 150 个氨基酸区域和高等植物光敏色素的色素结合区域(CBD)具有较高的同源性, C 端具有组氨酸激酶区域(HKD)。

收稿日期: 2005-04-14, 修回日期: 2005-06-19。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(90201001 和 30270326)。

作者简介: 甘春晖(1977-), 男, 湖北省十堰市竹溪县人, 硕士研究生, 从事环境生物技术研究。

较之植物光敏色素,细菌光敏色素具有结构和机理相对简单的特点,因此对细菌光敏色素的研究为进一步研究高等植物光敏色素的性质提供了有效的手段,并且在生物光电器件和光电材料的研究中具有重要作用。鱼腥藻是较早被发现具有与植物光敏色素相似激酶和磷酸转移酶活性的光敏色素原核生物之一。其光敏色素 AphA、AphB 于 20 世纪 90 年代末发现,现今见报道的研究只有美国、德国等少数几个国家,主要是基于光敏色素结构和功能的研究。国内除本实验室有相关实验工作以外,其它实验室未见报道。本实验选用鱼腥藻 PCC7120,通过对其光敏色素可逆光致变色性质的研究,为分子设计光敏色素类生物光电材料打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鱼腥藻(*Anabaena* sp. PCC7120)购自中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB),克隆载体 pBluescript SK(+)为 Stratagene 公司产品,表达载体 pET30a 购自 Novagen 公司。DNA 回收试剂盒、T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 *Sma* I、*Xho* I、*Eco*RV 为 MBI 公司产品,*Taq* 酶为 Biostar 公司产品,IPTG、X-gal 为 SABCO 产品,亲和层析介质购自 Amersham Pharmacia 公司。色素 PCB 由德国慕尼黑大学 Hugo Scheer 教授惠赠。引物由中国科学院上海生物化学研究所合成。基因片段由上海生工生物技术有限公司用荧光测序试剂盒进行核苷酸序列分析。

1.2 基因片段的扩增与克隆

以 PCC 7120 总 DNA 序列(Genebank; D64001)为模板设计引物 P₁、P₂、P₃、P₄、P₅、P₆。引物 P₁: 5'-GTA CCC GGG ATG ATT CAA CCA CAT GGT GTG CTT T-3'; 引物 P₂: 5'-GCT CCC GGG CAA CCA CAT GGT GTT CTT TTA GTT-3'; 引物 P₃: 5'-ATC CTC GAG TTC TGT TTA CTC TCT GGC GGA GAT A-3'; 引物 P₄: 5'-CAT CCC GGG CCA CAT GGT GTG CTT TTA GTT TT-3'; 引物 P₅: 5'-ATT CCC GGG CAT GGT GTC CTT TTA GTT TTG -3'; 引物 P₆: 5'-TAA CCC GGG ATG CTT TTA GTT TTG GAA GAA CC-3'。

按文献[2]操作,经 PCR 扩增得到的 DNA 片段经过 *Sma* I、*Xho* I 酶切后,与同样双酶切的克隆载体 pBluescript 连接,转化至大肠杆菌 TG1,在含有 IPTG 和 X-gal 的氨苄青霉素平板进行筛选,挑

取白色菌落。根据 PCR 和酶切检验鉴定阳性重组质粒。重组质粒经 *Sma* I、*Xho* I 酶切后得到的外源片段与经 *Eco*RV、*Xho* I 酶切的表达载体 pET30a 连接,转化至大肠杆菌 BL21(DE3),用含有卡那霉素的平板进行筛选。所得的基因片段经上海生工生物技术有限公司用荧光测序试剂盒进行核苷酸序列分析验证。

1.3 蛋白质表达与 SDS-PAGE 检测

含外源片段的表达载体以 BL21(DE3) 为宿主菌进行表达。表达菌在 RB 液体培养基(酵母提取物 0.5%、胰蛋白胨 1%、NaCl 0.5%、葡萄糖 0.2%、pH 7.6,抗生素适量)37℃ 培养至 OD₆₀₀ 0.5,20℃ 水浴中放置 1 h,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,20℃ 低温诱导 6 h,取 1 mL 菌液 10 000×g 离心。加入 1× 上样缓冲液和巯基乙醇(9:1),100℃ 5 min,用 8% 的分离胶进行 SDS-PAGE 分析。方法见文献[2,3]。

1.4 重组蛋白的纯化

由表达载体 pET30a 构建的重组质粒在大肠杆菌中诱导表达得到的外源融合蛋白 N 端都带有 6 个组氨酸的亲和标记,简称 Histag,故可采用金属螯合亲和层析法提纯。重组蛋白上清液采用镍螯合层析柱纯化。

1.5 体外重组

取 12 mL 低温诱导表达的菌液离心回收菌体,双蒸水清洗 2 次,透析液(50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L 巯基乙醇, 0.1% Triton X-100, pH 7.8)清洗一次。加入 594 μL 重组缓冲溶液(50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L 巯基乙醇, 0.1% Triton X-100, pH 7.8),最后加入 6 μL PCB 并混匀。避光条件下冰浴中超声 1 min(工作 1 s,间隔 3 s)。混合悬浊液室温避光反应 3 h。12 000×g, 4℃ 条件离心 15 min,取上清液测定可逆吸收光谱。然后用镍离子螯合亲和层析法提纯,并再次测定光谱,计算色素蛋白产物浓度。

1.6 光谱测定活性

吸收光谱用 Perkin-Elmer Lambda 25 型紫外可见光谱仪,扫描范围 300~800 nm,扫描速度 960 nm/min,狭缝宽度 1.0 nm。色素蛋白质可逆光化学性质的测定,按文献[4]介绍的方法操作。

1.7 色素蛋白质变性实验

为进一步确定重组产物中色素的种类和性质,采用酸性尿素(8 mol/L, pH=2)条件使其变性,紫外可见光谱检测变性后的色素蛋白质。

1.8 色素蛋白锌电泳

样品重组反应完全后加入三氯乙酸至终浓度为10%,离心,沉淀用丙酮洗涤2次,加入1×上样缓冲液和巯基乙醇(9:1),100℃ 5 min,进行SDS-PAGE电泳分析。电泳完成后,电泳胶室温下经1 mol/L 醋酸锌溶液浸泡1 h,在280 nm紫外灯下检测^[4]。

2 结果

2.1 *aphA* (26-320)、*aphA* (27-320)、*aphA* (28-320)、*aphA* (29-320)、*aphA* (32-320)基因的PCR扩增、克隆和重组质粒的鉴定

引物 P₁、P₃ 扩增 *aphA* (26-320) 基因,引物 P₂、P₃ 扩增 *aphA* (27-320) 基因,引物 P₄、P₃ 扩增 *aphA* (28-320) 基因,引物 P₅、P₃ 扩增 *aphA* (29-320) 基

因,引物 P₆、P₃ 扩增 *aphA* (32-320) 基因。引物 5' 端、3' 端分别引入了 *Xho* I、*Sma* I 识别位点,扩增出大小分别为 885 bp、882 bp、879 bp、876 bp、867 bp 的基因片段(图 1:a~e)。

2.2 重组质粒在大肠杆菌中的表达

重组获得的 pBlu-*aphA* (26-320)、pBlu-*aphA* (27-320)、pBlu-*aphA* (28-320)、pBlu-*aphA* (29-320) 和 pBlu-*aphA* (32-320) 重组质粒按照材料与方法 1.3、1.4 所述与载体 pET30a 连接,转化大肠杆菌 BL21 (DE3),20℃ 表达后进行 SDS-PAGE 分析(见图 2)。由表达载体 pET30a 构建的重组质粒在大肠杆菌中诱导表达得到的外源融合蛋白 N 端都带有 Histag 的亲标记,蛋白质 marker 显示外源蛋白表达带大小与预计大小符合(见图 2)。

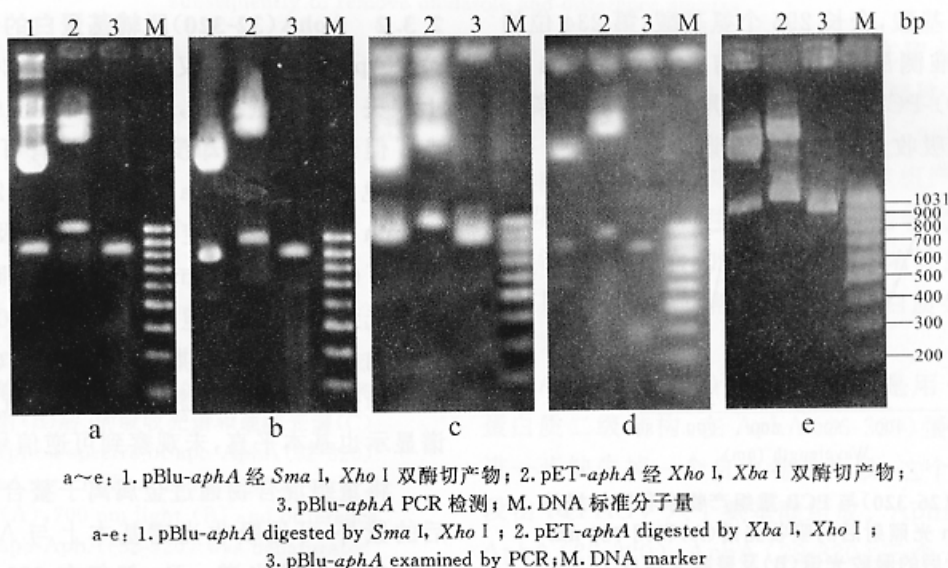
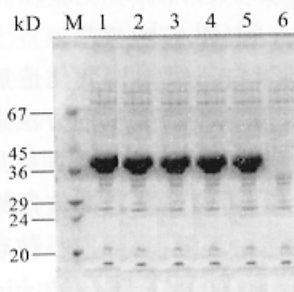


图 1 重组质粒 PCR 检测与用 *Sma* I, *Xho* I 及 *Xho* I, *Xba* I 酶切消化检测的琼脂糖凝胶电泳谱图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids examined by PCR, digested by *Sma* I, *Xho* I and digested by *Xho* I, *Xba* I



M: Protein marker. 1: pET-AphA (26-320) induced with IPTG; 2: pET-AphA (27-320) induced with IPTG; 3: pET-AphA (28-320) induced with IPTG; 4: pET-AphA (29-320) induced with IPTG; 5: pET-AphA (32-320) induced with IPTG; 6: pET induced with IPTG

图 2 pET-*aphA* (26-320)、pET-*aphA* (27-320)、pET-*aphA* (28-320)、pET-*aphA* (29-320)、pET-*aphA* (32-320) 基因表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of the overexpressed pET-*aphA* (26-320), pET-*aphA* (27-320), pET-*aphA* (28-320), pET-*aphA* (29-320), pET-*aphA* (32-320)

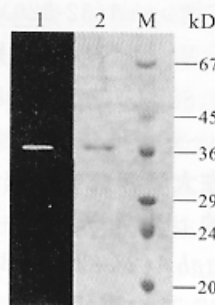
提纯后的 AphA (26-320)-PCB 色素蛋白的锌电泳荧光和考马斯亮蓝染色照片(见图 3),荧光拍照条件为光圈 2.0,曝光时间 30 s,结果显示在紫外线激发下,有明显的荧光产生,荧光位置和考马斯亮蓝着色位置吻合。重组混合物 AphA (27-320)-PCB、AphA (28-320)-PCB、AphA (29-320)-PCB 和 AphA

(32-320)-PCB 经提纯后进行锌电泳,肉眼观察和照片拍摄均没有发现荧光斑点,考马斯亮蓝染色仍然有正确的蛋白质条带。

2.3 光谱分析

2.3.1 缺失的突变体 AphA (26-320) 的重组

aphA (26-320) 基因同时在 5' 端和 3' 端进行了



M: Protein marker

图3 pET-AphA(26-320)的SDS-PAGE及锌电泳

Fig. 3 SDS-PAGE of reconstituted pET-AphA(26-320) detected by Coomassie staining (lanes 2) (38 kD) and Zn^{2+} -induced fluorescence under UV (lanes 1)

缺失突变,其编码蛋白质 AphA(26-320)与全片段 AphA 相比,氨基端缺失了 25 个氨基酸,羧基端缺失了 445 个氨基酸,全长 295 个氨基酸,第 234 位的半胱氨酸为推测的辅基色素结合位点。图 4 为 AphA(26-320)-PCB 色素蛋白在用镍离子螯合亲和层析提纯后的吸收光谱与差减光谱。

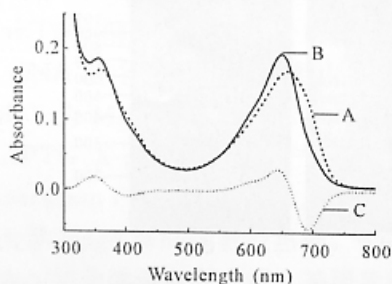


图4 AphA(26-320)与 PCB 重组产物亲和层析提纯后用 650 nm 光照射后的吸收光谱(A)和用 700 nm 光照射后的吸收光谱(B)及差减光谱(C)

Fig. 4 Absorption spectra of the reconstitution products of AphA(26-320) with PCB, after irradiation with 650 nm light (A), 700 nm light (B) and difference spectra (C) (Mixture was purified over a Ni^{2+} -chelating column and dialyzed subsequently to remove imidazole)

成功重组的细菌光敏色素 AphA(26-320)-PCB 进一步通过酸性尿素变性实验来检验共价结合的色素种类和光吸收形态。将提纯的 AphA(26-320)-PCB 按材料与方法 1.6、1.7 所述方法进行酸性尿素变性实验和光谱检测,图 5 即为得到的吸收光谱。

变性得到的 Pr 态的 AphA(26-320)-PCB 色素蛋白吸收峰位于 660 nm 左右, Pfr 态的 AphA(26-320)-PCB 吸收峰在 610 nm 左右。实验结果与植物光敏色素的结果一致。表明 PCB 胆色素确实和 AphA(26-320)肽链共价连接,并在不同波长单色光照射时发生了光致异构。

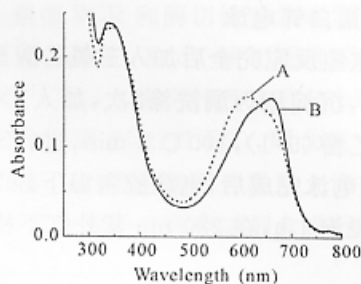


图5 AphA(26-320)与 PCB 重组产物经酸性尿素(8 mol/L)/HCl(pH2)变性后用 700 nm 光饱和照射后的吸收光谱(A)及用 650 nm 光饱和照射后的吸收光谱(B)

Fig. 5 Absorption spectra of AphA(26-320) reconstituted with PCB, after denaturation with urea(8 mol/L)/HCl(pH2). The sample denatured after irradiation with 700 nm light (A), 650 nm light (B)

2.3.2 AphA(32-320)脱辅基蛋白的体外重组实验

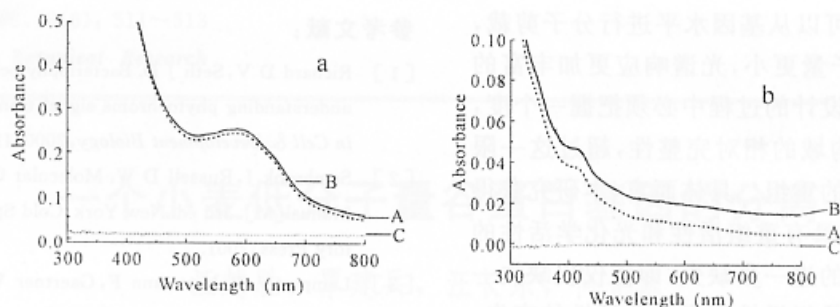
AphA(32-320)仅仅在 AphA(26-320)的基础上缺失了 6 个氨基酸,仍然包含推测的色素结合位点。但体外重组中却没有发现具有可逆光致变色效应的色素蛋白,图 6:a 是重组 3 h, $12000 \times g$ 离心 15 min 后上清液测定的紫外-可见吸收光谱,同样经过了 650 nm 或 700 nm 单色光饱和照射,试图获取可逆光致变色信号,但吸收光谱中 650 nm 到 700 nm 区域内没有明显的预期吸收峰出现,600 nm 左右的吸收峰是由溶液中的游离藻蓝胆素造成的。差减光谱显示也基本平直,未观察到可逆信号。

将重组混合物通过金属离子螯合亲和层析提纯后的紫外-可见吸收光谱基本上与 AphA(32-320)脱辅基蛋白的光谱一致,仅仅在 600 nm 区域有极微弱的吸收,这是由残留的游离色素 PCB 吸收造成的,650 nm 到 700 nm 区域内仍然没有吸收峰,差减光谱也与上述的情况一样(图 6:b)。

为了排除脱辅基蛋白三级结构变化造成的影响,我们对样品采用了尿素变性复性的方法进行处理。向细胞超声后得到的悬浊液中加入固体尿素使尿素终浓度为 4 mol/L,再加巯基乙醇使期终浓度为 10 mmol/L,4℃冰箱中缓慢搅拌过夜,使悬浊液中的蛋白质充分溶解。 $12000 \times g$ 离心 15 min 后取上清液对 100 倍体积的重组缓冲液透析 3 次,以去除尿素。

得到的蛋白质混合溶液用于重组,重组溶液的吸收光谱和差减光谱见图 7,没有观察到预期的吸收峰和可逆光致变色信号。

重组混合物经提纯后进行锌电泳,肉眼观察和



a: 重组混合物用 650 nm 光照射(A)和用 700 nm 光照射(B)后的吸收光谱及差减光谱(C);
b: 亲和层析提纯后的重组混合物用 650 nm 光照射(A)和用 700 nm 光照射(B)后的吸收光谱及差减光谱(C)
a: Absorption spectra of mixture after irradiation with 650 nm light (A) and 700 nm light (B) and difference spectra (C);
b: Mixture were purified over a Ni^{2+} -chelating column and dialyzed subsequently to remove imidazole, Absorption spectra of mixture, after irradiation with 650 nm light (A), 700 nm light (B) and difference spectra (C)

图 6 AphA(32-320)与 PCB 重组混合物及其亲和层析提纯后的吸收光谱及差减光谱

Fig. 6 Absorption spectra of AphA(32-320) reconstituted with PCB and the mixture which were purified over a Ni^{2+} -chelating column and dialyzed subsequently to remove imidazole and difference spectra

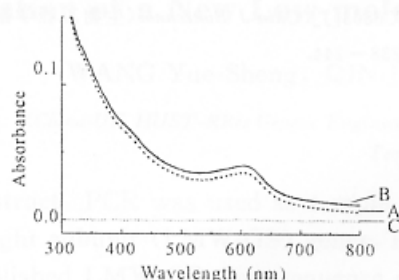


图 7 AphA(32-320)脱辅基蛋白(8 mol/L)尿素变性复性后与 PCB 的重组产物[用 650 nm 光照射(A)和用 700 nm 光照射(B)后]的吸收光谱和差减光谱(C)

Fig. 7 Absorption spectra of apo-AphA(32-320) reconstituted with PCB, after irradiation with 650 nm light (A), 700 nm light (B) and difference spectra (C). apo-AphA(32-320) was denatured with urea (8 mol/L) and then renatured

照片拍摄均没有发现荧光斑点,考马斯亮蓝染色仍然有正确的蛋白质条带(结果未显示)。

以上重组结果表明,AphA(32-320)脱辅基蛋白的体外重组在本研究实验条件下没有细菌光敏色素蛋白产生,AphA(32-320)不能和 PCB 色素发生共价结合。这说明缺失掉的氨基酸可能参与色素与肽链共价结合的自催化过程,是维持细菌光敏色素自催化裂合酶功能的必需组成成分。

2.3.3 AphA(29-320)、AphA(28-320)和 AphA(27-320)脱辅基蛋白的体外重组

AphA(26-320)的体外重组实验有完整的色素蛋白产生,而 AphA(32-320)的重组实验却没有,为了进一步调查细菌光敏色素自催化连接裂合酶的结构域,结合二者的实验结果,我们又设计了 AphA(29-320)、AphA(28-320)和 AphA(27-320) 3 个缺

失突变体。设计的 3 个缺失蛋白在宿主菌中同样获得了大量的表达,也具有好的溶解性。

实验结果表明 AphA(27-320)、AphA(28-320)和 AphA(29-320)脱辅基蛋白的重组产物中确实没有预期的色素蛋白生成。重组混合物经提纯后进行锌电泳,肉眼观察和照片拍摄均没有发现荧光斑点,考马斯亮蓝染色仍然有正确的蛋白质条带(结果未显示)。

AphA(32-320)脱辅基蛋白,是用 GOR N 分析蛋白质二级结构,在 AphA(26-320)蛋白的基础上进一步缺失掉一个自由卷曲片段,这个自由卷曲片段由 IQPHGV 六个氨基酸组成。AphA(27-320)、AphA(28-320)、AphA(29-320)三个片段则是在 AphA(26-320)的基础上依次缺失掉 1~3 个氨基酸获得的。我们可以初步断定这一结构在光敏色素裂合酶结构域中很有可能发挥着重要的作用。

3 讨论

采用酸性尿素(8 mol/L, pH=2)条件使重组产物变性,紫外可见光谱检测变性后的色素蛋白质。这时蛋白质与色素间的作用很弱,色素基本呈游离时的结构状态,色素蛋白质的吸收光谱与游离色素的吸收光谱很相似,因此从吸收峰最大值可以判断色素的种类和性质。

以上结果表明,细菌光敏色素 AphA 同植物光敏色素、细菌光敏色素 Cph1 具有密切联系,不仅在基因序列、蛋白质一级结构上具有高度的同源性,而且在体外重组功能、重组产物光谱特征等方面极为相似。实验中获得阴性重组结果与阳性结果的比

较分析表明, AphA 可以从基因水平进行分子剪裁, 获得比天然蛋白分子量更小, 光谱响应更加丰富的突变蛋白, 但是分子设计的过程中必须把握一个度, 必须保持裂合酶结构域的相对完整性, 超过这一限度, 将不能获得成功的重组。具体而言, 本研究获得的最小片段, 在氨基端的进一步缺失, 即使仅仅缺失一个氨基酸, 也将导致重组活性和光化学活性的丧失。

光敏色素是一种具有可逆光致变色性质的色素蛋白质。随着材料科学、信息科学、微电子科学、薄膜技术和激光技术的发展, 这类生物分子材料应用于光电探测、人工神经网络、视觉模拟系统、非线性光学材料、光学信息储存与处理等方面的探索十分活跃。细菌光敏色素新型可逆光致变色体系的建立, 为应用光敏色素可逆光致变色生物材料, 设计生物光电器件打下了基础。此外, 作为胆素蛋白的一种, 光敏色素在食品、化妆品、医药和生物工程等领域具有良好的发展前景^[5]。

参考文献:

- [1] Richard D V, Seth J D. Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction[J]. *Seminars in Cell & Development Biology*, 2000, **11**: 511—521.
- [2] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.
- [3] Lamparter T, Mittmann F, Gaertner W. Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium[J]. *Synechocystis Proc Natl Acad Sci*, 1997, **94**: 11 792—11 797.
- [4] Zhao K H, Scheer H. Type I and type II reversible photochemistry of phycoerythrocyanin α -subunit from *Mastigocladus laminosus* both involve Z,E isomerization of phycoviolobilin chromophore and are controlled by sulfhydryls in apoprotein[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1228**: 244—253.
- [5] Dong Y R(董依然), RAN Y(冉勇), Zhao K H(赵开弘), Zhou M(周明). Study on the reconstitution *in vitro* and photochemical activities of phytochrome from the *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. *Chin J Biotechnol*(生物工程学报), 2004, **2**(20): 238—244.