

藻蓝蛋白裂合酶 CpeS 半胱氨酸的定点突变及功能研究

胡勋 周明 苏平 赵开弘

(华中科技大学环境科学与工程学院, 武汉 430074)

SITE-DIRECTED MUTATION OF THE CPES OF PHYCOCYANIN AND THE STUDY ON THE FUNCTION

HU Xun, ZHOU Ming, SU Ping and ZHAO KaiHong

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

关键词: CpeS; 半胱氨酸; 定点突变; 体外重组; 体内重组

Key words: CpeS; Cysteine; Site-directed mutation; Reconstitution *in vitro*; Reconstitution *in vivo*

中图分类号: Q343.1+5 文章标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)01-0129-05

藻蓝蛋白 β 亚基(简称 β -CPC)中有2个色素结合位点(Cys-84和Cys-155)分别以硫醚键与藻蓝胆素(PCB)连接^[1,2]。通过同源性分析,发现了一种能催化鱼腥藻PCC7120中 β -CPC 84位半胱氨酸残基与PCB连接的裂合酶基因 $cpes$,其编号为 $abr0617$ 。

PCB来源于血红素。血红素被氧化而共轭环断裂形成胆绿素IX_a(BV),这一过程是由相应的血红素氧化酶(HO)催化^[3]。胆绿素IX_a(BV)被胆绿素还原酶PcyA还原成PCB^[4,5]。通过构建含 hol 和 $pcyA$ 的质粒 $pACYCDuet-hol-pcyA$,可以在大肠杆菌内生成PCB^[5]。在体外重组实验中,由于 β -CPC有两个色素结合位点,其与色素的偶联产物较复杂。同时,由于它们共价连接两个相同的PCB,对 β -CPC的光谱解析和生物合成的研究,比单色素藻胆蛋白复杂^[6,7]。通过构建突变体 $CpeB(C155I)$,可以在大肠杆菌内诱导表达藻蓝蛋白 β 亚基155位半胱氨酸突变体^[8],便于PCB和脱辅基蛋白的结合。

本实验利用定点突变技术构建裂合酶CpeS的两个半胱氨酸突变体,将这两个半胱氨酸分别突变为苏氨酸(经分析显示突变体二级结构变化很小),并通过转化大肠杆菌表达蛋白而进行相应的体外和体内重组,以研究这两个半胱氨酸残基对酶催化活性的影响,确定半胱氨酸是否在CpeS酶催化活性中起到关键作用,从而为CpeS结构和功能的研究

提供相关有用的信息。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂 大肠杆菌菌株TG1、BL21为本实验室保存;克隆载体pBluescript SK(+)为Stratagene公司产品;表达载体pET 30a(+),pACYCDuet-1,pETDuet-1购自Novagen公司。重组质粒pBlucpeS,pET-cpeS,pET-cpeB(C155I),pACYCDuet-hol-pcyA为本实验室构建保存。DNA回收试剂盒、T₄DNA连接酶和限制性内切酶SmaIv,XhoIv,EcoRIv,BamHIv,PstIv为MBI公司产品;Taq酶为Biostar公司产品;IPTG为SABC公司产品;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。引物和测序由北京奥科生物技术有限责任公司完成。

1.2 引物设计与合成 为构建 $cpes(C63T)$ 和 $cpes(C51T)$ 两个突变体,根据 $cpes$ 已知的序列,设计了4条引物,以pBlucpeS为模板进行PCR扩增:

引物P1: 5'-GGCCCCGGATGATATCGAAGAGTITTTTT-3'

引物P2: 5'-TTCAGCTAACCCFCGCACCAGTAGAA-3'

引物P3: 5'-GCACTAGCAGGAACCTCGTACAACFCGTC AAC-3'

引物P4: 5'-GGGCTCGAGGTTTAACTGACGCAGAAIT-3'

其中引物1、2、4用于构建突变体 $cpes(C63T)$,引物1、3、4用于构建突变体 $cpes(C51T)$ 。

收稿日期: 2006-03-14; 修订日期: 2007-01-07

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30540070)资助

作者简介: 胡勋(1977-),男,汉族,硕士研究生;从事蓝藻生物化学与生物技术的研究。E-mail: hooxun@163.com

通讯作者: 周明

为了检测 *CpeS* (C63T) 和 *CpeS* (C51T) 两个突变体活性, 构建载体表达 *CpcB* (C155I) 进行体内重组。设计了两条 PCR 引物 P5、P6, 以 pET-*qpeB* (C155I) 为模板扩增出 *qpeB* (C155I):

引物 P5: 5'-TTAGGATTTCGCATACGATGTATTTCACG-3'

引物 P6: 5'-CGCCTGCAGAGTAAAATTTAAGCAACAGC-3'

1.3 突变体的克隆 利用 mega primer PCR 法, 扩增出 *qpeS* (C63T) 和 *qpeS* (C51T) 两个突变体的基因片段^[9]。该基因片段经 *Sma* I 与 *Xho* I 酶切后, 与同样双酶切的克隆载体 pBluescript SK (+) 连接, 转化到 *E. coli* TG1, 用含有氨苄青霉素的平板筛选。根据质粒大小、酶切图谱和 PCR 检验初步鉴定阳性重组子。重组质粒经 *Sma* I 与 *Xho* I 酶切后得到的外源片段与经 *Eco*R (H) 与 *Xho* I 酶切的表达载体 pET 30a (+) 连接, 转化到 *E. coli* BL21, 用含有卡那霉素的平板筛选。根据酶切和 PCR 检验, 以及 IPTG 诱导表达的外源融合蛋白的分子量, 进一步鉴定阳性重组子。

1.4 pETDuet-*cpcB* (C155I) 的构建 经 PCR 扩增得到的 DNA 片段 *cpcB* (C155I) 经过 *Bam*H I 与 *Pst*I 酶切后, 与同样双酶切的克隆载体 pETDuet-1 连接, 转化至 *E. coli* BL21, 用氨苄青霉素平板进行筛选, 挑取菌落。根据酶切和 PCR 检验, 以及 IPTG 诱导表达的外源融合蛋白的分子量, 进一步鉴定阳性重组子 pETDuet-*qpeB* (C155I)。

1.5 多个质粒的转化 将 3 种质粒 pET-*qpeS* (C63T)、pETDuet-*qpeB* (C155I) 和 pACYCDuet-*hol-*pcyA** 转化 *E. coli* BL21, pET-*qpeS* (C51T)、pETDuet-*qpeB* (C155I) 和 pACYCDuet-*hol-*pcyA** 转化 *E. coli* BL21。同时增加两个对照组: 野生型 pET-*qpeS*、pETDuet-*qpeB* (C155I) 和 pACYCDuet-*hol-*pcyA** 转化 *E. coli* BL21; 两种质粒 pETDuet-*qpeB* (C155I) 和 pACYCDuet-*hol-*pcyA** 转化 *E. coli* BL21。前 3 组均用含适量浓度的卡那霉素、氨苄青霉素和氯霉素平板共同筛选菌落。第 4 组用适量浓度的氨苄青霉素和氯霉素平板共同筛选菌落。

1.6 蛋白的表达与纯化 表达载体 pET 30a (+) 和 pETDuet-1 中 T7 启动子下游有 6 个组氨酸的密码子, 由此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, 故可采用亲和层析法提纯。含各种质粒的 *E. coli* BL21 分别在 250mL 含 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ = 0.6-0.7, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 诱导 12h 后, 离心收集细胞, 双蒸水洗两次, -20 $^{\circ}$ C 保存。将冻存的细胞重悬于 0.5mol/L NaCl、20mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2) 中, 超声 10min, 离心得到上清。上清液采用镍离子螯合层析柱纯化。

1.7 光谱测定 吸收光谱用 Perkin Elmer Lambda 25 型紫外可见光谱仪, 紫外可见光谱扫描范围 300-800nm, 扫描速度 960nm/min, 狭缝宽度 1.0nm; 荧光光谱用 Perkin Elmer LS45 型荧光光谱仪, 荧光光谱扫描速度 1200nm/min, 狭缝宽度 5.0nm。

1.8 SDS-PAGE 检测与色素蛋白电泳 取 1mL 菌液离心 3min (10000r/min, 4 $^{\circ}$ C)。加入上样缓冲液和巯基乙醇 (9:1) 制样, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min, 用 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳分析。

提纯得到的色素蛋白加入三氯乙酸至终浓度为 10%, 离心 2min (8000r/min, 4 $^{\circ}$ C), 沉淀用丙酮洗涤 3 次, 加入上样缓冲液和巯基乙醇 (9:1), 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。完成后, 电泳胶室温下经 1.5mol/L 醋酸锌溶液浸泡 30min, 在 280nm 紫外灯下检测^[10]。

2 结果

2.1 突变体的克隆、表达和鉴定

通过 Mega primer PCR, 分别用引物 1 和引物 2、引物 1 和引物 3 首先通过一次 PCR 扩增出大小分别为 218bp 和 188bp 的基因片段。扩增片段经琼脂糖凝胶电泳回收后, 分别作为大片段引物和引物 4 进行二次 PCR 扩增出大小都为 588bp 的基因片段。扩增片段经琼脂糖凝胶电泳、试剂盒回收后, 用 *Sma* I 和 *Xho* I 酶切得到大小都为 574bp 的基因片段, 与同样双酶切的克隆载体 pBluescript SK (+) 连接, 然后转化至 *E. coli* TG1。通过 PCR 扩增和 *Sma* I、*Xho* I 双酶切进行检验, 初步鉴定片段大小正确并进一步通过核苷酸测序检验 (图 1)。通过测序, 证明所得两个突变体核苷酸序列与预期完全一致。

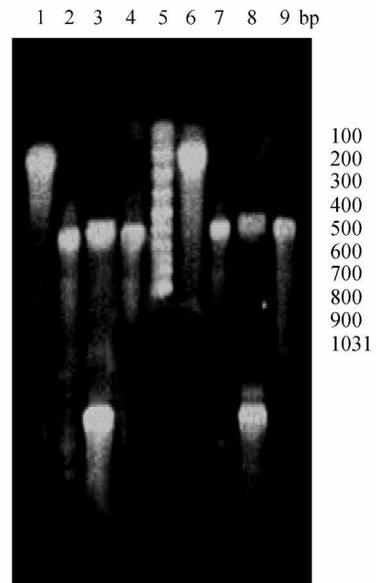


图 1 *qpeS* 突变体的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *qpeS*

1. *qpeS* (C63T) 一次 PCR 产物; 2. *qpeS* (C63T) 二次 PCR 产物;
3. 经 *Sma* I、*Xho* I 消化的质粒 pBluescript-*qpeS* (C63T); 4. PCR 检测质粒 pBluescript-*qpeS* (C63T); 5. DNA 分子量标准; 6. *qpeS* (C51T) 一次 PCR 产物; 7. *qpeS* (C51T) 二次 PCR 产物; 8. 经 *Sma* I、*Xho* I 消化的质粒 pBluescript-*qpeS* (C51T); 9. PCR 检测质粒 pBluescript-*qpeS* (C51T)
1. First PCR of *qpeS* (C63T); 2. Second PCR of *qpeS* (C63T); 3. pBluescript-*qpeS* (C63T) digested by *Sma* I and *Xho* I; 4. PCR from pBluescript-*qpeS* (C63T); 5. DNA ladder; 6. First PCR of *qpeS* (C51T); 7. Second PCR of *qpeS* (C51T); 8. pBluescript-*qpeS* (C51T) digested by *Sma* I and *Xho* I; 9. PCR from pBluescript-*qpeS* (C51T)

突变体 pET-*qpeS* (C63T) 和 pET-*qpeS* (C51T) 以 *E. coli*

BL21 为宿主菌进行表达。表达产物通过 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝 R-250 染色检测,目的蛋白的大小与预期的蛋白分子量吻合。由 SDS-PAGE 电泳图可以看出 CpeS(C63T) 为可溶

蛋白,其活性除了可以通过体内重组进行检测之外,还可以通过体外重组进行检测;CpeS(C51T) 为不溶蛋白,其活性可以通过体内重组进行检测(图 2)。

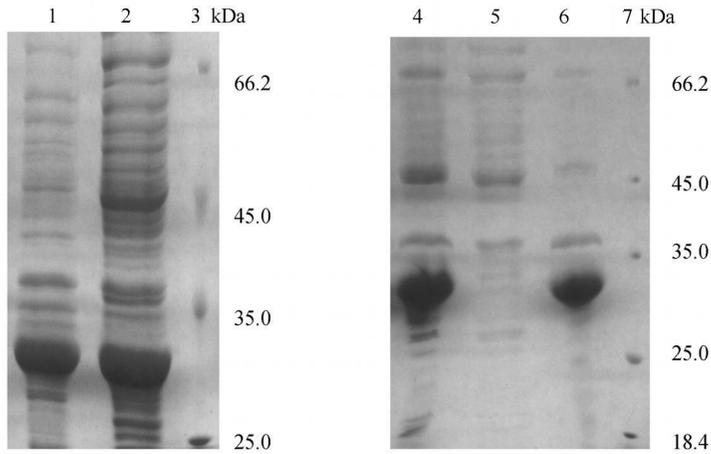


图 2 CpeS 两个突变体基因表达产物的 SDS-PAGE 谱图

Fig 2 SDS-PAGE of protein from CpeS

1. CpeS (C63T) 表达细胞制样; 2. CpeS (C63T) 表达上清制样; 3. 蛋白质分子量标准; 4. CpeS (C51T) 表达细胞制样; 5. CpeS (C51T) 表达上清制样; 6. CpeS (C51T) 表达沉淀制样; 7. 蛋白质分子量标准

1. Protein from CpeS (C63T) expressed in *E. coli* BL21; 2. Protein from the supernatant of CpeS (C63T); 3. Protein molecular weight standard; 4. Protein from CpeS (C51T) expressed in *E. coli* BL21; 5. Protein from the supernatant of CpeS (C51T); 6. Protein from the precipitate of CpeS (C51T); 7. Protein molecular weight standard

2.2 CpeB (C155I) 的克隆、表达和鉴定

由引物 P5 和 P6 扩增出大小为 540bp 左右的基因片段,扩增片段经琼脂糖凝胶电泳、试剂盒回收后,用 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切,与同样双酶切的克隆载体 pETDuet-1 连接。转化后挑取的单克隆所提取的质粒 pETDuet-*cpeB* (C155I) 以酶切和 PCR 进行检测。用 *Bam*H I 和 *Pst* I 消化质粒 pETDuet-*cpeB* (C155I), 应得到大小约 540bp 的片段。电泳结果与预期符合(图 3)。pETDuet-*qcb* (C155I) 以 *E. coli* BL21 为宿主菌进行表达。菌种在 37°C, 1mmol/L IPTG 的诱导条件下, 150r/min 振荡培养 12h。菌体通过 SDS-PAGE 电泳分析, 目的蛋白的表达正确(图 4)。

2.3 突变体 CpeS (C63T) 酶活性的体外重组检测

CpeS (C63T) 为可溶蛋白,其活性可以通过体外重组进行检测。将 pEF-*qcs* (C63T) 和 pEF-*qcb* (C155I) 分别在 *E. coli* BL21 中表达以后得到各自的上清用于体外重组。将得到的酶 CpeS 突变蛋白和脱辅基蛋白 CpeB (C155I) 各 150μL 加入到终浓度为 500mmol/L 的 KPP (pH 7.4) 缓冲液中, 并加入终浓度为 1mmol/L 的 EDTA, 最后加入一定量的 PCB, 于 37°C 温育 1h 后以 12000r/min 离心 15min, 提纯后测重组产物的吸收和荧光光谱(图 5)。

由从吸收光谱和荧光光谱可知, CpeS (C63T) 能催化 PCB 正确偶连到 CpeB (C155I) 上, 产物的最大吸收峰和荧光发射峰分别在 619 nm 和 645 nm 左右, 所获得的是天然产物。

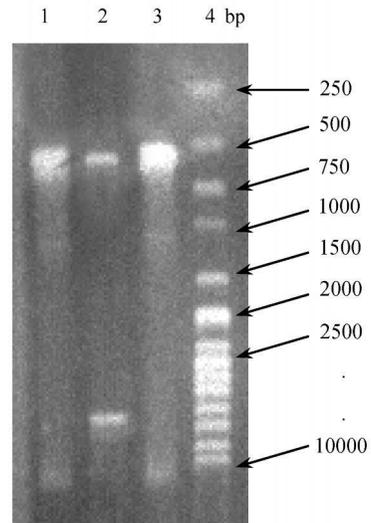


图 3 *qcb* (C155I) 琼脂糖凝胶电泳谱图

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of *qcb* (C155I)

1. PCR 产物; 2. 经 *Bam*H I 和 *Pst* I 消化的质粒 pETDuet-*qcb* (C155I); 3. PCR 检测质粒 pETDuet-*qcb* (C155I); 4. DNA 分子量标准

1. PCR of *qcb* (C155I); 2. pETDuet-*qcb* (C155I) digested by *Bam*H I and *Pst* I; 3. PCR from pETDuet-*qcb* (C155I); 4. DNA ladder

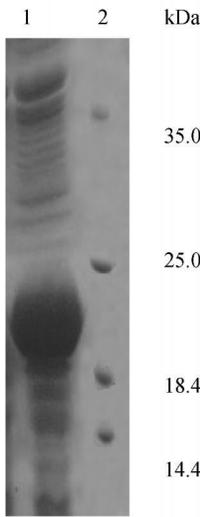


图4 CpcB(C155I)的SDS-PAGE谱图

Fig 4 SDS-PAGE of protein CpcB (C155I)

1. CpcB (C155I) 表达蛋白; 2. 蛋白质分子量标准

1. Protein from CpcB (C155I); 2. Protein molecular weight standard

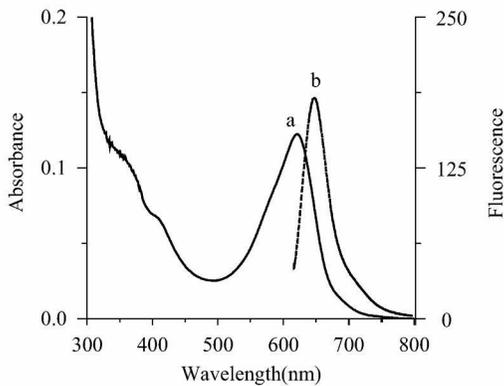


图5 PCB-CpcB(C155I)体外重组吸收光谱和荧光光谱

Fig.5 Absorption and fluorescence spectra of PCB-CpcB

(C155I) obtained by *in vitro* reconstitution

a. PCB-CpcB(C155I) 提纯后的吸收光谱; b. PCB-CpcB (C155I) 提纯后的荧光光谱

a. Absorption spectra of PCB-CpcB (C155I); b. Fluorescence spectra of PCB-CpcB (C155I)

2.4 突变体 CpeS(C63T) 和 CpeS(C51T) 酶活性的体内重组检测

将多个质粒转化的菌株用同 1.5 的方法得到表达上清, 然后采用镍离子螯合层析柱纯化。通过野生型 CpeS 和突变型 CpeS(C63T) 分别在体内催化 PCB 和 CpcB(C155I) 的连接的吸收光谱和荧光光谱的比较可以看出, 突变体 CpeS(C63T) 有催化活性, 色素蛋白最大吸收波长为 619nm 左右, 最大荧光发射峰为 645nm 左右。但和野生型 CpeS 比较其相对活性有所降低。可以通过提纯后的最大荧光发射光谱计算突变体 CpeS(C63T) 酶的相对活性。酸性尿素变性后, 检测变性后的色素蛋白质最大吸收峰为 662nm, 可以判断连接上的色素是

PCB。突变型 CpeS(C51T) 经光谱检测, 与不加该酶的对照比较, 其荧光产率很低, 几乎没有活性存在(图 6)。

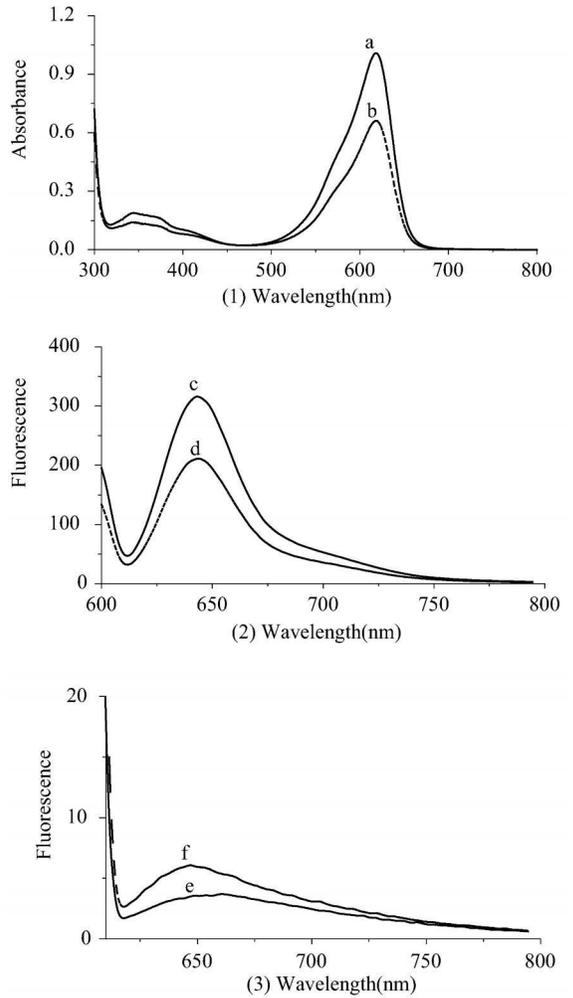


图6 PCB-CpcB(C155I)体内重组吸收光谱和荧光光谱

Fig 6 Absorption and fluorescence spectra of PCB-CpcB

(C155I) obtained by *in vivo* reconstitution

a. 由野生型 CpeS 催化的吸收光谱; b. 由 CpeS(C63T) 催化的吸收光谱; c. 由野生型 CpeS 催化的荧光光谱; d. 由 CpeS(C63T) 催化的荧光光谱; e. 由 CpeS(C51T) 催化的荧光光谱; f. 没有 CpeS 催化的荧光光谱

a. Absorption spectra of PCB-CpcB (C155I) catalyzed by CpeS; b. Absorption spectra of PCB-CpcB (C155I) catalyzed by CpeS (C63T); c. Fluorescence spectra of PCB-CpcB (C155I) catalyzed by CpeS; d. Fluorescence spectra of PCB-CpcB (C155I) catalyzed by CpeS (C63T); e. Fluorescence spectra of PCB-CpcB (C155I) catalyzed by CpeS (C51T); f. Fluorescence spectra of PCB-CpcB (C155I) lacking of CpeS

2.5 体内重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳和锌电泳鉴定

多个质粒共同转化 *E. coli* BL21 后得到的体内重组细胞经 IPTG 诱导表达。将经镍离子螯合层析柱纯化的超声上清分别通过 SDS-PAGE 电泳。由于色素可与 Zn^{2+} 形成螯合物, 该螯合物在一定波长紫外光激发下发射荧光。通过重组蛋白锌电泳的实验, 可以发现在紫外光照射下, 锌电泳中重组蛋白发

出橙红色荧光;其相对应的 SDS-PAGE 电泳,有目的蛋白的表达,表明有脱辅基蛋白 CpcB(C155I)存在。这证明在体内重组过程中脱辅基蛋白与色素共价连接成功,并得到色素蛋白(图7)。通过与野生型 CpeS 锌电泳相比较,在等量提纯产物的情况下,CpeS(C63T)催化 PCB 和 CpcB(C155I)的连接产生的荧光比野生型 CpeS 的荧光要低。这也再次证明了该突变体酶的相对活性的降低。CpeS(C51T)的体内重组锌电泳中未见橙黄色荧光,该突变体未能使脱辅基蛋白与色素连接。

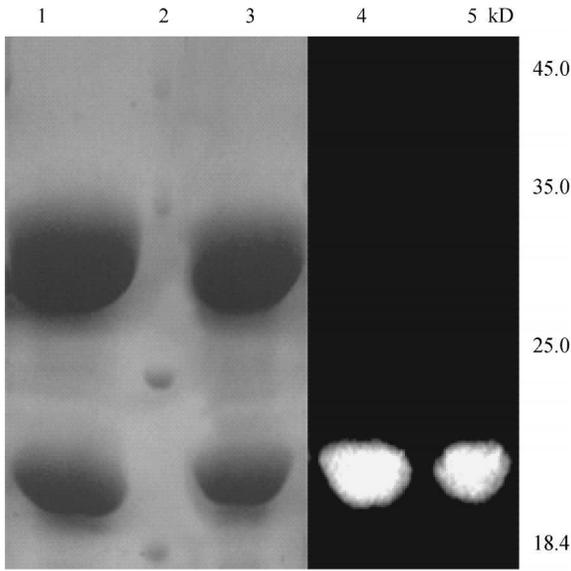


图7 PCB-CpcB(C155I)体内重组 SDS-PAGE 电泳和色素蛋白锌电泳

Fig 7 SDS-PAGE of PCB-CpcB(C155I) detected by Coomassie staining

1. CpeS 体内重组表达蛋白; 2 蛋白质分子量标准; 3. CpeS(C63T)体内重组表达蛋白; 4 CpeS 体内重组表达蛋白锌电泳; 5. CpeS(C63T)体内重组表达蛋白锌电泳

1. catalyzed by CpeS; 2. Protein molecular weight standard; 3. Catalyzed by CpeS(C63T) and Zn²⁺-induced fluorescence; 4. Catalyzed by CpeS; 5. Catalyzed by CpeS(C63T) obtained by *in vivo* reconstitution

3 讨论

由于巯基在藻胆色素的连接中具有很重要的作用,设计实验对 CpeS 中的两个半胱氨酸残基分别进行了定点突变,构建了突变体 CpeS(C63T)和 CpeS(C51T)。Gor 分析显示,突变体 CpeS(C63T)和 CpeS(C51T)二级结构变化很小。由于 Thr 是中性氨基酸,对蛋白质的结构影响很小。因此,得到的突变体的结构应基本不变。

从实验结果来看,构建的 CpeS 的 63 位半胱氨酸的突变体为可溶的,因此可以通过体外重组检测其活性。而 CpeS 的 51 位半胱氨酸的突变体为不溶蛋白,用体外重组检验活性比较困难。所以实验中构建 pETDuet cpcB(C155I),与 pACYCDuet hol-pcyA 和 pET cpeS(C51T)在体内共同表达,用于

体内重组检验突变体 CpeS(C51T)的活性。这种方法同样也可以用于突变体 CpeS(C63T)的活性检测。

藻蓝蛋白 β 亚基上面的色素接受部位就是 84 位和 155 位的半胱氨酸残基,这从另一方面暗示半胱氨酸残基在酶 CpeS 中的重要作用。CpeS 中的两个半胱氨酸残基可能在催化 CpcB(C155I)的 84 位半胱氨酸和 PCB 的连接中起到很重要的作用。CpeS 的 63 位半胱氨酸的突变没有使酶丧失活性。与野生型相比较,其酶相对活性约为 70%。突变体酶活性的降低可能与突变体中半胱氨酸残基的改变使该酶转移 PCB 与脱辅基蛋白结合的能力降低有关;或者也可能是半胱氨酸残基的改变使酶空间结构发生了部分的改变,酶的结合能力降低。而 CpeS 的 51 位半胱氨酸的突变却导致了酶活性几乎完全丧失。因此推断 CpeS 第 51 位半胱氨酸残基可能位于酶活性中心部位,该位点对 PCB 与脱辅基蛋白的连接起着很重要的作用,从而该位点的突变导致了酶活性的丧失,以至于 PCB 与脱辅基蛋白不能成功偶联。

参考文献:

- [1] Zhao K H, Haessner R, Cniel E, Scheer H. Type I reversible of phycoerythrocyanin involves Z/E-isomerization of 84 pycoviolobilin chromophore [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1228**: 235—243
- [2] Zhao K H, Zhu J P, Song B, *et al.* Nonenzymatic chromophore attachment in biliproteins: Conformational control by the detergent Triton X-100 [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, **1657**: 131—145
- [3] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, **227**: 680—685
- [4] Brown S B, Holroyd J A. Biosynthesis of the chromophore of phycoerythrocyanin: a study of mesohaem and mesobiliverdin as possible intermediates and further evidence for an algal haem oxygenase [J]. *Biochem. J*, 1984, **217**: 265—272
- [5] Landgraf F T, Forreiter C, Hurtado Pico A, *et al.* Recombinant holophytochrome in *Escherichia coli* [J]. *FEBS Letters*, 2001, **508**: 459—462
- [6] Willbanks S M, Glazer A N. Rod-structure of a phycoerythrin containing phycobilisome. Complete sequence and bilin attachment site of a phycoerythrin gamma subunit [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 1236—1241
- [7] Scheer H, Kufer W. Conformational studies on G-phycoerythrin from *Spirulina platensis* [J]. *Z Naturforsch*, 1977, **32**: 513—519
- [8] Song B, Zhu J P, Zhou M, *et al.* Site-directed mutation of the β -subunit of phycoerythrin and phycoerythrocyanin and the study of reconstitution *in vitro* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(4): 344—348 [宋波,朱菁萍,周明,等.藻蓝蛋白和藻红蛋白 β 亚基半胱氨酸的定点突变及体外重组研究.水生生物学报, 2004, **28**(4): 344—348]
- [9] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* Short protocols in molecular biology[M]. John Wiley & Sons, Inc, 1995, 268—271
- [10] Shim C M, Yang J Y, Kang S S, *et al.* Chromophore-apoprotein interactions in *Synechocystis* sp. PCC6803 phytochrome Cph1 [J]. *Biochemistry*, 2000, **39**: 6349—6356