

藻红蓝蛋白 β 亚基体内重组及其色谱分析

王 锋^{1,2} 周 明¹ 赵金梅¹ 赵开弘¹

(1. 华中科技大学环境科学与工程学院, 武汉 430074; 2. 中国测试技术研究所, 成都 610021)

摘要: 藻胆蛋白是蓝藻中的捕光蛋白, 其生物合成的重要一步是藻胆色素与脱辅基蛋白的连接。大多数藻胆色素的正确连接都需要结合位点专一和对色素的构象有选择性的裂合酶来催化完成, 但是这方面的报道不是很多。藻红蓝蛋白由两个亚基组成, β 亚基(简称 β -PEC)含 171 个氨基酸残基及两个辅基色素藻蓝胆素(简称 PCB), 分别在 Cys-84 和 Cys-155 位以硫醚键共价相连。通过同源性分析获得的由编号为 *abr0617* 基因编码的蛋白为藻红蓝蛋白 β 亚基(β -PEC)中的 Cys-84 与 PCB 的连接催化酶。为了研究层理鞭枝藻藻红蓝蛋白(PEC) β 亚基(β -PEC)中藻蓝胆素(PCB)与脱辅基蛋白的连接机制, 通过体内重组方式得到色素蛋白 PCB-PecB(C155I), 分析表明该色素蛋白与 β -PEC 的吸收光谱和荧光光谱一致。酸性尿素变性实验证明得到的色素蛋白中的藻蓝胆素 PCB 没有被破坏。使用胃蛋白酶对天然藻红蓝色素蛋白和重组藻红蓝色素蛋白进行相同条件的水解并得到各自的色素肽, 高效液相色谱分析表明这两种色素肽相同, 由此证明了编号为 *abr0617* 基因编码的蛋白质能催化 PCB 与 PecB(C155I) 正确共价偶联。

关键词: 藻红蓝蛋白 β 亚基; 体内重组; 水解; 色谱分析

中图分类号: Q754 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)01-0074-05

藻红蓝蛋白(Phycocyanin)是藻胆蛋白的一种, 它在某些缺乏藻红蛋白而具有异形胞的藻类中代替藻红蛋白充当捕光天线色素, 具有吸收和传递光能的作用^[1]。在层理鞭枝藻中, 藻红蓝蛋白取代藻红蛋白, 将所吸收的光能传递给藻蓝蛋白, 根据 Fueglister 等人^[2]对层理鞭枝藻的研究表明: 藻红蓝蛋白由两个亚基组成, α 亚基(简称 α -PEC)含 162 个氨基酸残基及一个辅基色素藻紫胆素(简称 PVB), 在 Cys-84 位以硫醚键共价相连, 经分离提纯的 α 亚基具有可逆光致变色性质^[3]; β 亚基(简称 β -PEC)含 171 个氨基酸残基及两个辅基色素藻蓝胆素(简称 PCB), 分别在 Cys-84 和 Cys-155 位以硫醚键共价相连。在藻胆蛋白氨基酸的一级结构中多肽链中部的 Cys-84 是藻胆色素的主要结合位点。

本实验以层理鞭枝藻为研究对象, 利用定点突变技术对 β -PEC 构建半胱氨酸突变体^[4], 从而得到只在 Cys-84 与 PCB 共价结合的脱辅基蛋白 PecB(C155I)。通过同源性分析, 发现一种使层理鞭枝藻 β -PEC 中 Cys-84 与 PCB 连接的催化酶基因, 其编号

为 *abr0617*。通过构建质粒 pCDFDuet-*abr0617*, 运用体内重组技术, 得到色素蛋白 PCB-PecB(C155I)。使用胃蛋白酶(Pepsin)将该色素蛋白与天然 β -PEC 进行完全一致条件下的水解, 得到连接 PCB 的色素肽。对得到的两种色素肽进行高效液相色谱分析, 一方面说明 *abr0617* 对 β -PEC 中 Cys-84 与 PCB 连接的催化作用, 另一方面进一步定性说明天然层理鞭枝藻藻红蓝蛋白 β 亚基分别在 Cys-84 和 Cys-155 位与两个辅基色素 PCB 相连。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 大肠杆菌 BL21 由本实验室保存; 表达载体 pACYCDuet-1, pCDFDuet-1, pET30a 购自 Novagen 公司; 亲和层析介质购自 Amersham Pharmacia 公司; 胃蛋白酶, 2500—3500U/mg, Sigma 公司; Bio-Gel P-60 凝胶, Bio-Rad 公司; 高效液相色谱分析仪: Waters 2695-2487; 分析柱: 20RBAX 300SB-C18; 乙腈, 色谱纯。pET-*pecB*(C155I) 质粒, pACYCDuet-*hol-*pcyA** 质粒为本实验室构建。

收稿日期: 2006-02-13; 修订日期: 2007-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30540070)资助

作者简介: 王锋(1980—), 男, 汉族, 河南濮阳人; 硕士; 主要从事生物技术方面研究。E-mail: wangfengpy@163.com

通讯作者: 周明, Tel: 86-27-87792039; E-mail: wangfengpy@163.com

1.2 基因片段的 PCR 扩增与分子克隆 设计了两条 PCR 引物 P1、P2, 以 pEF-*alr0617* 为模板扩增 *alr0617*。

引物 P1: 5'-GGC GAT ATC CGG GAT GAA TAT TGA AGA GIT T-3'

引物 P2: 5'-AAT TCT GCG TCA AGT TAA AAC CTC GAG CCC-3'

对 PCR 扩增得到的 DNA 片段进行 *EcoR* (H) 和 *Xho*I 酶切, 与同样双酶切的克隆载体 pACYCDuet-1 连接, 转化至大肠杆菌 BL21, 用链霉素平板进行筛选, 挑取菌落。根据 PCR 和酶切检验鉴定阳性重组质粒 pCDFDuet-*alr0617*。

1.3 体内重组与蛋白表达 将这三种质粒 pEF-*pecB* (C155I)、pACYCDuet-*hol-psyA* 和 pCDFDuet-*alr0617* 转化到 *E. coli* BL21, 用含有卡那霉素、氯霉素和链霉素的平板进行筛选。将含三种质粒的 *E. coli* BL21 接种在 200mL LB 培养基中, 37℃ 培养 OD₆₀₀=0.6-0.8, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 摇床设置为 150r/min, 过夜诱导后, 离心收集细胞, 二次蒸馏水洗两次, -20℃ 保存。

1.4 蛋白质提纯 表达载体 pET30a 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。将冻存的细胞重悬于 0.5mol/L NaCl、20mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.2), 超声 7min (功率 200W), 离心 15min (10000r/min, 4℃) 得到上清, 重组蛋白上清液采用 Ni²⁺ 螯合层析柱纯化。柱平衡洗脱液为 0.5mol/L NaCl、20mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.2), 洗脱杂蛋白采用 50mmol/L 咪唑、0.5mol/L NaCl、50mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.2), 收集色素蛋白采用 500mmol/L 咪唑、0.5mol/L NaCl、50mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.2)。

1.5 SDS-PAGE 检测与色素蛋白锌电泳 取 1mL 菌液离心 3min (10000r/min, 4℃)。加入 1× 上样缓冲液和巯基乙醇 (9:1) 制样, 100℃ 煮沸 5min, 用 8% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳分析。

提纯得到的蛋白加入三氯乙酸至终浓度为 10%, 离心 2min (8000r/min, 4℃), 沉淀用丙酮洗涤 3 次, 加入 1× 上样缓冲液和巯基乙醇 (9:1), 100℃ 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^[5]。

1.6 天然色素蛋白 β -PEC 提纯 将收集的湿藻置

低温冰箱 (-20℃) 反复冻融数次, 超声 30min (功率 400W)。裂解产物离心 30min (12000r/min, 4℃), 取上清, 得藻细胞提取液。加入硫酸铵至 30% 饱和度, 离心 30min (10000r/min, 4℃), 弃沉淀。使用 DEAE 纤维素 52 层析柱对上清液进行浓度梯度 (5-250mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 为 7.1, 洗脱体积 300mL) 洗脱, 流速 12mL/h, 分别收集各洗脱组分。取富含 PEC 的组分并加入终浓度为 7mol/L 的尿素, 使用等电聚焦方法得到天然 β -PEC^[6]。

1.7 色素蛋白变性实验 为进一步确定水解产物中色素的种类和性质没有被破坏, 采用酸性脲 (8mol/L, pH=2) 使其变性, 紫外可见光谱检测变性后的色素蛋白。这时色素与蛋白间的作用很弱, 色素基本呈游离时的结构状态, 色素蛋白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^[7]。

1.8 胃蛋白酶水解条件 本实验进行蛋白水解的反应体系为: 缓冲液为 100mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 为 6.5), 蛋白浓度为 10D/mL, 胃蛋白酶浓度为 1mg/mL, 因为胃蛋白酶活性最适 pH 值为 1.5-2.0, 所以使用 6mol/L HCl 调节水解体系 pH 为 2.0, 水解温度 37℃, 时间 3h。

1.9 色素肽的提纯 水解完成后, 体系中各种多肽混杂在一起。将混合物加样于用 pH=2 的盐酸溶液平衡的 Bio-Gel P-60 凝胶层析柱中。该 pH 条件下 Bio-Gel P-60 凝胶可吸附色素肽^[8], 而无色素结合的肽段被 pH=2 的盐酸溶液洗脱下来。最后用 30% 醋酸洗脱纯的色素肽, 制成样品以备高效液相色谱分析用。

1.10 光谱测定 吸收光谱用 Lambda 25 型紫外可见光谱仪 (Perkin-Elmer) 测定, 紫外可见光谱扫描范围 300-800nm, 扫描速度 960nm/min, 狭缝宽度 1.0nm。激发和荧光光谱测定采用 LS-45 型荧光光谱仪 (Perkin-Elmer), 光谱扫描速度 500nm/min, 狭缝宽度 10.0nm。

1.11 色谱分析条件 流动相 A 为 100mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 为 2.1), 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱程序: A: B=80: 20-A: B=60: 40, 洗脱时间为 20min, 流速为 1mL/min, 柱温 33℃; 紫外检测器在 650nm 波长处检测。

2 结果

2.1 色素蛋白 SDS-PAGE 电泳与锌电泳鉴定

通过 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色,

检测到了目的蛋白的表达。由于色素可与 Zn^{2+} 形成螯合物, 该螯合物在一定波长光激发下发射荧光。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, 这证明在体内重组过程中脱辅基蛋白与色素连接成功, 并得到色素蛋白(图 1)。

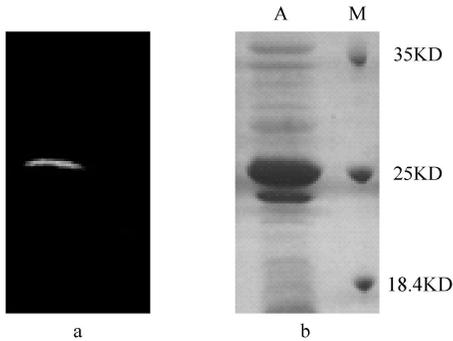


图1 体内重组产物锌染色(a)和考马斯亮蓝染色(b)电泳图

Fig 1 SDS-PAGE of reconstituted PCB-PecB(C155I) stained for the chromophore with zinc acetate (a) and for protein with Coomassie blue (b)

A: 体内重组表达的四种蛋白混合物;

M: 蛋白质标准分子量

A: the mixture of four proteins expressed by reconstitution *in vivo*; M: protein molecular weight marker

2.2 色素蛋白吸收和荧光光谱分析

经紫外可见光谱仪进行吸收测定, 得到 PCB-PecB(C155I) 色素蛋白的最大吸收在 596nm, 天然 β -PEC 的最大吸收在 598nm (图 2)。

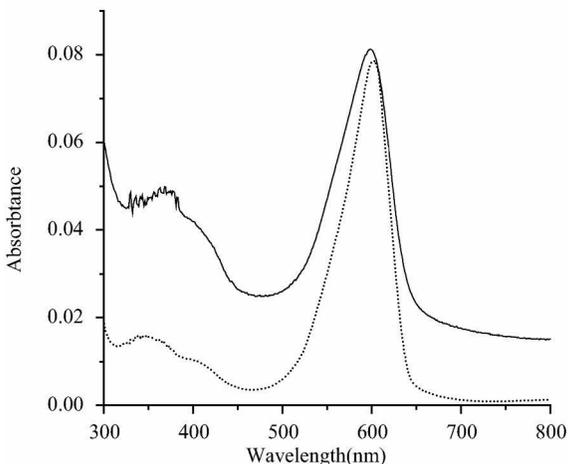


图2 吸收光谱

Fig.2 Absorption spectra

实线: 天然色素蛋白 β -PEC 吸收光谱; 虚线: 体内重组色素蛋白 PCB-PecB(C155I) 的吸收光谱

Solid line: absorption spectra of β -PEC; Broken line: absorption spectra of PCB-PecB(C155I)

对提纯后得到的体内重组色素蛋白 PCB-PecB(C155I) 和天然色素蛋白 β -PEC 进行荧光光谱测定(图 3)。两种色素蛋白在吸收了外界光源能量后, 发出的荧光波长都在 630nm 左右。

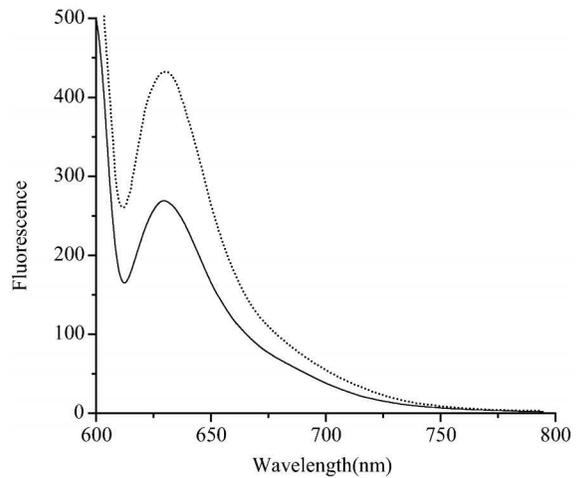


图3 荧光光谱

Fig 3 Fluorescence spectra

实线: 天然色素蛋白 β -PEC 荧光光谱(600nm 波长光源激发); 虚线: 体内重组色素蛋白 PCB-PecB(C155I) 的荧光光谱(600nm 波长光源激发)

Solid line: fluorescence spectra of β -PEC; Broken line: fluorescence spectra of PCB-PecB(C155I)

2.3 色素蛋白变性实验

紫外可见光谱检测变性后的色素蛋白, 其各自的吸收光谱(图 4)。

天然色素蛋白 β -PEC(酸性脲变性后) 吸收最大在 660nm, 重组色素蛋白 PCB-PecB(C155I) (酸性脲变性后) 吸收最大在 661nm。两者的最大吸收峰均在 660nm 左右, 可以判断色素 PCB 的种类和性质没有被破坏。

2.4 色素肽光谱分析

水解实验完成后, 将得到的多肽混合物经 Bio-Gel P-60 凝胶提纯, 得到的色素肽紫外最大吸收在 650—660nm 之间, 由于无法使用常规的方法对这种色素肽进行彻底的纯化, 因此吸收峰也表现为宽峰(图 5)。从天然色素蛋白 β -PEC 中得到的色素肽吸收最大在 654nm, 从重组色素蛋白 PCB-PecB(C155I) 中得到的色素多肽吸收最大在 656nm。

2.5 高效液相色谱分析

采用比较保留时间的方法对色谱峰进行定性鉴别。对两个色素肽进行色谱分析的结果(图 6)显示: 天然色素肽有两个色谱主峰, 体内重组色素肽只有一个色谱主峰。

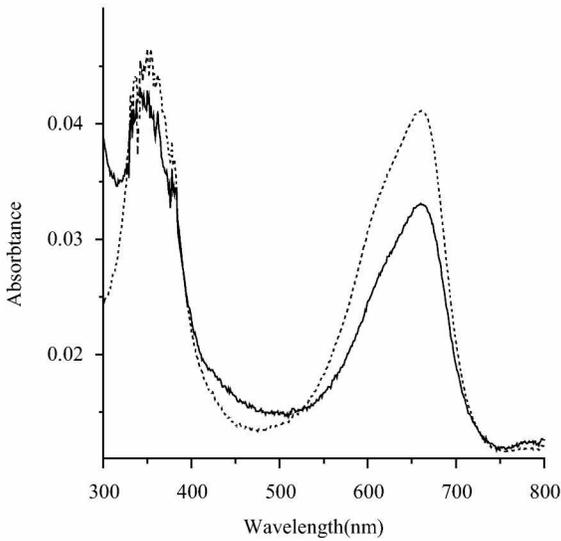


图 4 吸收光谱

Fig. 4 Absorption spectra (After denaturation in the dark with urea in the presence of hydrochloric acid (pH= 2))

实线:天然色素蛋白 β -PEC(酸性脲变性后)吸收光谱;虚线:重组色素蛋白PCB-PecB(C155I)(酸性脲变性后)吸收光谱
Solid line: absorption spectra of β -PEC; Broken line: absorption spectra of PCB-PecB(C155I)

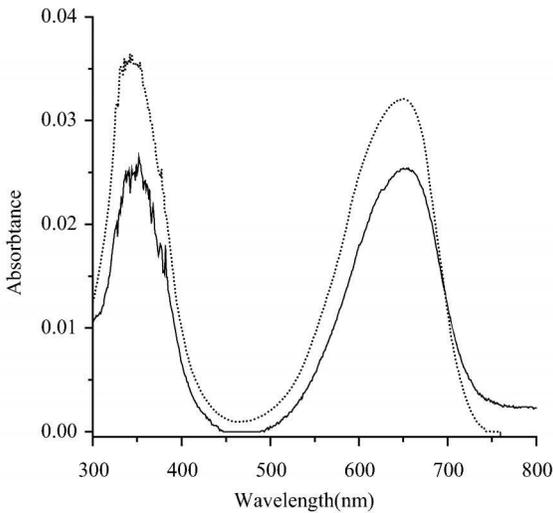


图 5 吸收光谱

Fig. 5 Absorption spectra

实线:天然色素蛋白 β -PEC经胃蛋白酶水解后得到的色素肽的吸收光谱;虚线:重组色素蛋白PCB-PecB(C155I)经胃蛋白酶水解后得到的色素肽吸收光谱

Solid line: phycocyanobilin peptide from β -PEC; Broken line: phycocyanobilin peptide from PCB-PecB(C155I)

3 讨论

根据文献[9],在血红素氧化酶HO1的作用下,

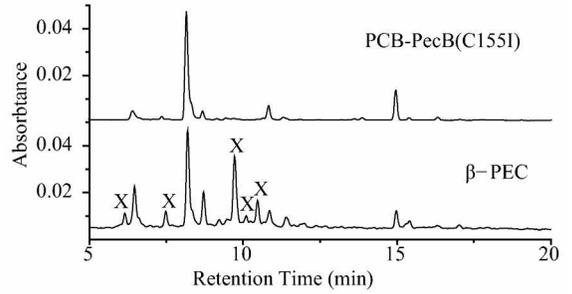


图 6 天然色素肽与重组色素肽的色谱分析对照结果

Fig. 6 Comparison of the retention time between the natural and the reconstituted peptides

大肠杆菌 BL21 中的血红素 Heme 被氧化成胆绿素 Biliverdin, 而胆绿素还原酶 PcyA 可以将胆绿素 Biliverdin 还原成藻蓝胆素 PCB。色素蛋白锌电泳、吸收和荧光光谱的结果表明:编号为 *abr0617* 基因编码的蛋白能催化 β -PEC 中 Cys-84 与 PCB 的共价连接。

从图 2 中可以看出天然色素蛋白的吸收峰要宽于体内重组色素蛋白的吸收峰,这是由于经过体内重组得到的色素蛋白,是经过对天然 β -PEC 构建 155 位半胱氨酸突变体编码而成,只在 Cys-84 位以硫醚键连接一个色素 PCB。而天然 β -PEC 中 Cys-84、Cys-155 两个位点分别以硫醚键与一个色素 PCB 相连,而两个结合的 PCB 吸收波长又相近,故在吸收光谱上这两个吸收峰重叠,只表现出一个宽峰,无法从光谱直接读出两个结合 PCB 各自的吸收波长。

根据文献[2],天然色素蛋白 β -PEC 在 Cys-84 和 Cys-155 各自连接一个 PCB,因此对应两个色谱主峰;重组色素蛋白 PCB-PecB(C155I) 只在 Cys-84 连接一个 PCB,因此对应一个色谱主峰。图 6 中显示:天然色素肽色谱分析结果中的第一个色谱主峰与重组色素肽色谱分析结果中的主峰相吻合,可以定性为该色谱主峰反映的是与 Cys-84 连接的 PCB;天然色素肽色谱分析结果中的第二个色谱主峰反映的是与 Cys-155 连接的 PCB。该结果一方面说明本实验中涉及的目标片段 *abr0617* 对 β -PEC 中 Cys-84 与 PCB 连接的催化作用,另一方面进一步定性阐述了天然层理鞭枝藻藻红蓝蛋白 β 亚基分别在 Cys-84 和 Cys-155 位与两个辅基色素 PCB 相连。

参考文献:

- [1] Glazer A N. Light harvesting by phycobilisomes [J]. *Annu Rev Biophys Chem*, 1985, 14: 47-77
- [2] Fuglistaller P, Suter F, Zuber H. Linker polypeptides of the phycobilisome from the cyanobacterium *Mastigocladus Laminosus*: amino

- acid sequences and relationships [J]. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1985, **366**(10): 993—1001
- [3] Zhao K H, Scheer H. Type iv and type \oplus reversible photochemistry of phycoerythrocyanin α subunit from *Mastigocladus laminosus* both involve Z, E isomerization of phycoviolobin chromophore and are controlled by sulfhydryls in apoprotein [J]. *Biochem. Biophys. Acta*, 1995, **1228**(2-3): 244—253
- [4] Song B, Zhu J P, Zhou M, Zhao K H. Site-directed mutation of the β -subunit of phycoyanin and phycoerythrocyanin and the study of reconstitution in vitro [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(4): 344—347 [宋波, 朱菁萍, 周明, 赵开弘. 藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白 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—347]
- [5] Shim C M, Yang J Y, Kang S S, *et al.* Chromophore apoprotein interactions in *Synochocystis* sp. PCC6803 phytochrome Cph1 [J]. *Biochemistry*, 2000, **39**: 6349—6356
- [6] Pabel A, Zhao K H, Breton J, Scheer H. Chromophore assignment in phycoerythrocyanin from *Mastigocladus laminosus* [J]. *Photosynthesis Research*, 1997, **54**: 25—34
- [7] Ma C, Zhou M, Zhang F T, *et al.* Cloning, expressing and activities study of *Mastigocladus laminosus* PecE mutated genes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(6): 614—618 [马聪, 周明, 张富铁, 等. 藻红蓝蛋白裂合异构酶 E 基因突变体的构建、表达与酶活性检测. 水生生物学报, 2003, **27**(6): 614—618]
- [8] Wang L, Zhou M, Deng M G, *et al.* Reconstitution of phycoyanobilin with the overexpressed Apo-A-phycoerythrocyanin [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2002, **20**(1): 38—42 [王鲁, 周明, 邓明刚, 等. 藻红蓝蛋白 α 亚基脱辅基蛋白与藻蓝胆素的重组. 武汉植物学研究, 2002, **20**(1): 38—42]
- [9] Tooley A J, Cai Y A, Glazer A N. Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial G-phycoyanin holoprotein subunit in a heterologous host [J]. *PNAS*, 2001, **98**(19): 10560—10565

CHROMATOGRAPHY ANALYSIS OF PEPTIDES FROM THE β -SUBUNIT OF PHYCOERYTHROCYANIN *IN VIVO* RECONSTITUTION

WANG Feng^{1,2}, ZHOU Ming¹, ZHAO Jiu-Mei¹ and ZHAO Kai-Hong¹

(1. College of Environmental Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074;

2. National Institute of Measurement and Testing Technology, Chengdu 610021)

Abstract: Phycobiliproteins are light-harvesting proteins present in cyanobacteria. The most important step in phycobilin biosynthesis is the phycobilin addition to the apophycobiliproteins. *In vivo*, the correct attachment of most chromophores is catalyzed by binding-site and chromophore-specific lyases, of which only few have hitherto been characterized. Phycoerythrocyanin have two subunits. β subunit of phycoerythrocyanin is made of 171 amino acids and the binding-sites of phycobilin addition to the apophycobiliproteins are Cys-84 and Cys-155. The protein encoded by gene *alr0617* was proved to be the lyase of Cys-84 of β -PEC. β subunit of phycoerythrocyanin (PCB-PecB(C155I)) was obtained by the *in vivo* reconstitution. The veracity was shown through the absorption spectra and the fluorescence spectra. After denaturation in the dark, with urea in the presence of hydrochloric acid ($\text{pH}=2$), the phycobilin (PCB) was not destroyed. The phycocyanobilin peptides were obtained from the natural subunit of phycoerythrocyanin (β -PEC) and reconstituted PCB-PecB(C155I) hydrolyzed by pepsin, respectively. With Chromatography analysis of high pressure liquid chromatography, we make a comparison of the retention time between the natural and the reconstituted peptides. The results showed that genes for the lyase (*alr0617*) catalyzed PCB attachment sites at Cys-84 in β -PEC.

Key words: β -PEC; Reconstitution *in vivo*; Hydrolysis; Chromatography analysis