

鱼腥藻 PCC7120 藻红蓝蛋白 α 亚基体内重组研究

滕 吟, 周 明*, 陈 芳, 赵开弘

(华中科技大学环境科学与工程学院, 武汉 430074)

摘 要: 为了研究藻红蓝蛋白 α 亚基的生物合成途径, 通过构建相容的 4 种重组质粒 pETDuet-*pecA*、pCOLADuet-*pecE*、pCDFDuet-*pecF* 和 pACYCDuet-*hol*-*pcyA*, 将裂合酶基因 *pecE* 和 *pecF*、血红素氧化酶基因 *hol*、藻蓝胆素合成酶基因 *pcyA* 和脱辅基藻红蓝蛋白 α 亚基基因 *pecA* 共同转入大肠杆菌 BL21(DE3), 通过色素蛋白电泳和光谱检测表明产生了生物活性的 PecA-PCB。结果表明生成的色素藻胆蛋白具有藻红蓝蛋白 α -亚基所特有的光谱性质和可逆光致变色性质。而在裂合酶基因 *pecE* 和 *pecF* 不转入大肠杆菌的情况下, 大肠杆菌内只有 0.1% 的 PecA-PCB 产生。以上研究对藻胆蛋白生物构建具有重要意义。

关键词: 藻红蓝蛋白; PecA; *pecE*; *pecF*; 体内重组

中图分类号: Q784

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)06-0493-05

Biosynthesis of a Fluorescent Cyanobacterial Phycoerythrocyanin Holo- α Subunit in *Escherichia coli*

TENG Yin, ZHOU Ming*, CHEN Fang, ZHAO Kai-Hong

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

Abstract: The entire pathway for the synthesis of a fluorescent holophycobiliprotein subunit from a photosynthetic cyanobacterium (*Anabaena* sp. PCC7120) was reconstituted in *Escherichia coli*. Cyanobacterial genes for enzymes *hol* and *pcyA* were expressed from a plasmid pACYCDuet-*hol*-*pcyA*. Genes for the apoprotein (Phycoerythrocyanin α subunit; *pecA*) were expressed on a second plasmid pETDuet-*pecA*. Genes for the heterodimeric lyase (*pecE* and *pecF*) that catalyzes chromophore attachment were expressed on a third plasmid pCOLADuet-*pecE* and a fourth plasmid pCDFDuet-*pecF*. Upon induction, recombinant *E. coli* used the cellular pool of heme to produce holo-PecA with spectroscopic properties qualitatively and quantitatively similar to those of the same protein produced endogenously in cyanobacteria. However, unlike the other biliproteins, isolated PEC shows a pronounced reversible photochemistry, which has been related to the α -subunit (α -PEC). About 0.1% of the apo-PecA was converted to holo-PecA-PCB in a similarly engineered *E. coli* strain that lacks *pecE* and *pecF*.

Key words: Phycoerythrocyanin; PecA; *pecE*; *pecF*; Reconstitution *in vivo*

藻胆体(phycobilisome)是存在于蓝藻和红藻中的一类捕光蛋白复合物,它由藻胆蛋白和连接蛋白组成。而藻胆蛋白是由藻胆色素(phycobilin)与相应的脱辅基蛋白中保守性半胱氨酸的巯基以硫醚键共价结合而成。根据藻胆蛋白的吸收光谱,可分为藻蓝蛋白(phycocyanin,简称CPC)、藻红蛋白(phycoerythrin,简称PE)、别藻蓝蛋白(allophycocyanin,简称APC)和藻红蓝蛋白(phycoerythrocyanin,简称PEC)^[1]。每种藻胆蛋白通常由各自的(亚基和 β 亚基构成,每个亚基连接着1~4个辅基色素^[2]。

藻胆色素来源于血红素IX,血红素IX被氧化而

共轭环断裂形成胆绿素IV,这一过程是由相应的血红素氧化酶 hol 催化^[3]。胆绿素IV被藻蓝胆素合成酶 $pcyA$ 还原和异构化形成特定的藻胆色素^[4]。

Landgrafa等通过构建含 hol 、 $pcyA$ 的重组质粒,在大肠杆菌内实现了藻蓝胆素(简称PCB)的生物合成^[5]。最近Zhao等^[6]发现层理鞭枝藻(*Mastigocladus laminosus*,也叫*Fischerella* sp. PCC 7603)中PEC操纵子所编码的裂合异构酶PecE、PecF催化PEC α -亚基(简称 α -PEC)脱辅基蛋白与PCB的连接过程,在该酶催化下PCB异构化为PVB,并且PVB与 α -PEC脱辅基蛋白PecA偶联,形成具有天

收稿日期:2006-06-02,修回日期:2006-07-17。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30540070)。

作者简介:滕吟(1982-),女,汉族,湖北武汉人,硕士,现在华中科技大学环境学院从事生物技术研究。

* 通讯作者。

然活性的 α -PEC^[6-8]。通常 PEC 被认为在活藻体内 (*in vivo*) 只起到吸收和传递光能的作用, 分离提纯的 α -PEC 则具有独特的高效可逆光致变色性质, 这种特性表现在其吸收光谱在受到特定波长的光照射之后发生可逆互变。

本实验室通过构建质粒 pACYCDuet-*hol-psyA*, 实现了在大肠杆菌内生成 PCB。本实验通过分子克隆技术构建了质粒 pETDuet-*pecA*、pCOLADuet-*pecE*、pCDFDuet-*pecF*, 然后将鱼腥藻 PCC7120 中裂合酶基因 *pecE* 和 *pecF*、血红素氧化酶基因 *hol*、藻蓝胆素合成酶基因 *psyA* 和脱辅基藻蓝蛋白 α 亚基基因 *pecA* 共同转入大肠杆菌, 通过体内重组实验得到具有天然活性的 α -PEC, 从而为进一步研究其可逆光致变色机制, 并根据胆素蛋白结构与功能的关系开发出具有实用性的胆素蛋白分子信息功能材料打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌菌株 TG1、BL21 (DE3) 由本实验室保存。表达载体 pACYCDuet-1、pCOLADuet-1、pETDuet-1、pCDFDuet-1 购自 Novagen 公司。克隆载体 pBluescript SK(+) 为 Stratagene 公司产品质粒。pACYCDuet-*hol-psyA*、pBlu-*pecA*、pBlu-*pecE*、pBlu-*pecF* 为本实验室构建。DNA 回收试剂盒、T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 *Bam*H I、*Nco* I、*Sma* I、*Pst* I、*Xho* I、*Nde* I 为 MBI 公司产品, *Taq* 酶为 Biostar 公司产品, IPTG 为 SABC 产品, 亲和层析介质购自 Amersham Pharmacia 公司。引物合成及测序由北京奥科生物技术有限责任公司完成。

1.2 基因片段的 PCR 扩增与分子克隆

设计了 6 条 PCR 引物 P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 , 具体如下。

引物 P_1 : 5'-TAC GGA TCC TAT GAA AAC ACC ATT GAC CGA AG-3'; 引物 P_2 : 5'-CGG CTG CAG GAT TTA ACT TAA AGC GTT TAT TGC-3'; 引物 P_3 : 5'-AGG ACC ATG GCT GAA CCT ATT CTT TCT CC-3'; 引物 P_4 : 5'-CCG CTG CAG GCA TTA GAG TTG AAT TAA CAA-3'; 引物 P_5 : 5'-ATT CCC GGG ATA CAT ATG AAT CAA GCG TCA-3'; 引物 P_6 : 5'-AAT CTC GAG GCT CTC TGT TCC CTA ACT CAA-3'。

按文献[9]进行操作。PCR 使用的模板为本实验室已经构建好的, 并已经过测序和酶活性检测完

整的 pBlu-*pecA* 和 pBlu-*pecE* 以及 pBlu-*pecF* 的质粒。实验中使用的 PCR 反应体系均为: 灭菌水 16.7 μ L、带 Mg^{2+} 的 $10 \times Taq$ buffer 2.5 μ L、 Mg^{2+} 1.0 μ L、dNTP 1.0 μ L、上下游引物和模板各 1.0 μ L、*Taq* DNA 聚合酶 0.8 μ L。总体积为 25 μ L。

以 P_1 、 P_2 为上、下游引物, pBlu-*pecA* 为模板, 经 PCR 扩增得到的 DNA 片段经过 *Bam*H I、*Pst* I 酶切后, 与同样双酶切的载体 pETDuet-1 连接, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 用含氨苄青霉素的平板进行筛选。根据 PCR、酶切、蛋白质电泳检验后, 测序鉴定阳性克隆, 得到重组质粒 pETDuet-*pecA*。

以 P_3 、 P_4 为上、下游引物, pBlu-*pecE* 为模板, 经 PCR 扩增得到的 DNA 片段经过 *Nco* I、*Pst* I 酶切后, 与同样双酶切的载体 pCOLADuet-1 连接, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 用含卡那霉素的平板进行筛选。根据 PCR、酶切、蛋白质电泳检验后, 测序鉴定阳性克隆, 得到重组质粒 pCOLADuet-*pecE*。

以 P_5 、 P_6 为上、下游引物, pBlu-*pecF* 为模板, 经 PCR 扩增得到的 DNA 片段经过 *Sma* I、*Xho* I 酶切后, 与同样双酶切的载体 pBluescript SK(+) 连接, 然后转化至大肠杆菌 TG1。通过 PCR 扩增和双酶切进行检验, 初步鉴定正确后进一步通过基因测序检验。然后导入表达载体 pCDFDuet-1, 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3), 用链霉素平板进行筛选, 得到重组质粒 pCDFDuet-*pecF*。

1.3 转化与蛋白质表达

将质粒 pETDuet-*pecA*、pCOLADuet-*pecE*、pCDFDuet-*pecF* 和 pACYCDuet-*hol-psyA* 共同转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 用含氨苄青霉素、卡那霉素、链霉素和氯霉素的平板筛选。

将质粒 pETDuet-*pecA* 和 pACYCDuet-*hol-psyA* 共同转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 用含氨苄青霉素和氯霉素平板筛选。

将含各种表达质粒的 BL21 (DE3) 分别在 37℃ 培养至 OD_{600} 约为 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 12 h 后离心收集细胞, 二次蒸馏水洗 2 次, -20℃ 保存。

1.4 重组蛋白的超声破碎、提纯和透析

表达载体 pETDuet-1 中 T7 启动子下游有 6 个组氨酸的密码子, 因此构建的重组质粒 pETDuet-*pecA* 在大肠杆菌中诱导表达得到的外源融合蛋白 N 端带有 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 0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2) 中, 超声 7 min, 离心得到上清, 重组

蛋白上清液采用镍螯合层析柱纯化。柱平衡洗脱液为 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2), 洗脱杂蛋白采用 50 mmol/L 咪唑、0.5 mol/L NaCl、50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2), 收集色素蛋白采用 500 mmol/L 咪唑、0.5 mol/L NaCl、50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2)。经过过柱提纯的蛋白采用 0.5 mol/L NaCl、50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2) 透析 4 h, 以除去小分子杂质。

1.5 SDS-PAGE 检测与色素蛋白锌电泳

蛋白制样后进行 SDS-PAGE 分析以及色素蛋白锌电泳。方法见文献[9, 10]。

1.6 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 ~ 800 nm, 扫描速度 960 nm/min, 狭缝宽度 1.0 nm。荧光光谱用 Perkin Elmer LS45 型荧光光谱仪, 荧光光谱扫描速度 1 200 nm/min, 狭缝宽度 5.0 nm。

1.7 色素蛋白变性实验

为进一步确定重组产物中色素的种类和性质, 采用酸性脲 (8 mol/L, pH = 2) 使其变性, 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。

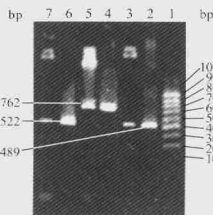
2 结果

2.1 基因的克隆与蛋白质的表达

由引物 P_1 和 P_2 扩增出大小为 489 bp 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*HI、*Pst*I 双酶切, 与同样双酶切的表达载体 pETDuet-1 连接。重组质粒 pETDuet-*peaA* 以酶切和 PCR 检测。电泳结果与预期符合 (图 1)。

由引物 P_3 和 P_4 扩增出大小为 762 bp 的基因片段, 扩增片段经琼脂糖凝胶电泳、试剂盒回收后, 用 *Nco*I、*Pst*I 双酶切, 与同样双酶切的表达载体 pCOLADuet-1 连接。重组质粒 pCOLADuet-*pecE* 以酶切和 PCR 检测。电泳结果与预期符合 (图 1)。

由引物 P_5 和 P_6 扩增出大小为 522 bp 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、*Xho*I 双酶切, 与同样双酶切的克隆载体 pBluescript SK(+) 连接。重组质粒 pBlu-*pecF* 以酶切和 PCR 检测。用 *Nde*I、*Xho*I 双酶切重组质粒 pBlu-*pecF*, 酶切片段经琼脂糖凝胶电泳、试剂盒回收后, 与同样双酶切的表达载体 pCDFDuet-1 连接。重



1: DNA 标准分子量; 2: pETDuet-*peaA* PCR 检测; 3: pETDuet-*peaA* 酶切; 4: pCOLADuet-*pecE* PCR 检测; 5: pCOLADuet-*pecE* 酶切; 6: pBlu-*pecF* PCR 检测; 7: pCDFDuet-*pecF* 酶切产物
1: DNA ladder; 2: PCR of pETDuet-*peaA*; 3: pETDuet-*peaA* digested by *Bam*HI and *Pst*I; 4: PCR of pCOLADuet-*pecE*; 5: pCOLADuet-*pecE* digested by *Nco*I and *Pst*I; 6: PCR of pBlu-*pecF*; 7: pCDFDuet-*pecF* digested by *Nde*I and *Xho*I

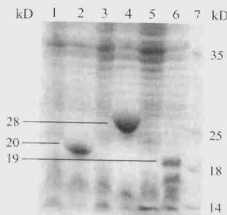
图 1 *peaA*、*pecE*、*pecF* 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *peaA*, *pecE* and *pecF*

组质粒 pCDFDuet-*pecF* 通过 *Nde*I、*Xho*I 双酶切检测。电泳结果与预期符合 (图 1)。

测序结果表明, 通过分子克隆得到的片段序列与实际序列完全一致。

pETDuet-*peaA*、pCOLADuet-*pecE*、pCDFDuet-*pecF* 均以大肠杆菌 BL21(DE3) 为宿主菌进行表达。菌种在 20℃、1 mmol/L IPTG 的诱导条件下, 振荡培养 6 h。菌体通过 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 检测到了目的蛋白的表达 (见图 2)。结果表明: pETDuet-*peaA*、pCOLADuet-*pecE*、pCDFDuet-*pecF* 转化菌经 IPTG 诱导后出现了十分明显的外源



1: pETDuet-*peaA* 未诱导表达产物; 2: pETDuet-*peaA* 诱导表达产物; 3: pCOLADuet-*pecE* 未诱导表达产物; 4: pCOLADuet-*pecE* 诱导表达产物; 5: pCDFDuet-*pecF* 未诱导表达产物; 6: pCDFDuet-*pecF* 诱导表达产物; 7: 蛋白质标准分子量
1: pETDuet-*peaA* not induced with IPTG; 2: pETDuet-*peaA* induced with IPTG; 3: pCOLADuet-*pecE* not induced with IPTG; 4: pCOLADuet-*pecE* induced with IPTG; 5: pCDFDuet-*pecF* not induced with IPTG; 6: pCDFDuet-*pecF* induced with IPTG; 7: Protein molecular weight standard marker

图 2 pETDuet-*peaA*、pCOLADuet-*pecE*、pCDFDuet-*pecF* 表达产物的 SDS-PAGE 谱图

Fig. 2 SDS-PAGE of pETDuet-*peaA*, pCOLADuet-*pecE* and pCDFDuet-*pecF*

蛋白质表达带, pETDuet-*pecA*、pCOLADuet-*pecE*、pCDFDuet-*pecF* 蛋白质分子量大小分别为 20 kD、28 kD、19 kD, 与预测分子量吻合。其中 pCDFDuet-*pecF* 表达量很小(图 2)。

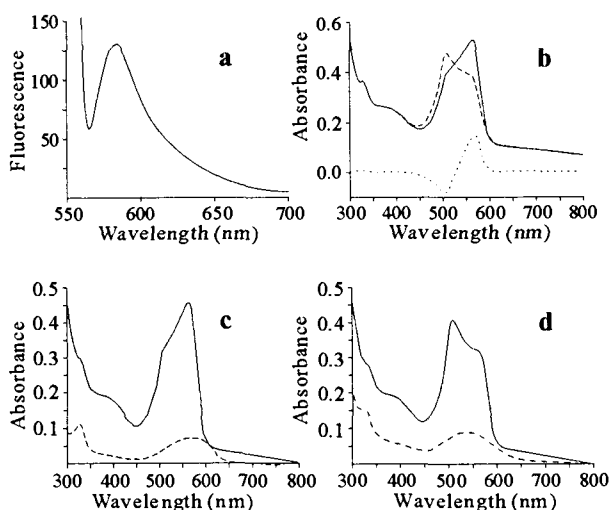
2.2 光谱分析

重组体系 I: 将 pETDuet-*pecA*、pCOLADuet-*pecE*、pCDFDuet-*pecF* 和 pACYCDuet-*hol-psyA* 共同转化大肠杆菌 BL21(DE3)。表达菌诱导培养, 离心收集细胞后按照 1.4 的方法对重组蛋白进行超声破碎、提纯和透析。对透析后的产物做吸收光谱检测, 经过 500 nm 单色光照射 5 min, 得到的色素蛋白质最大吸收光谱为 570 nm, 称为 P570。当用 570 nm 单色光照射 5 min, 得到最大吸收光谱为 500 nm, 称为 P500(图 3:b)。可逆光致变色性质与层理鞭枝藻(*Mastigocladus laminosus* PCC 7603)藻红蓝 α 亚基相同, 表明所得可逆光致变色现象是由鱼腥藻(*Anabaena* PCC 7120)藻红蓝 α 亚基所致。荧光光谱检测产物为单一吸收峰, 其荧光在 580 nm 左右(图 3:a), 荧光与层理鞭枝藻藻红蓝 α 亚基相似。由光谱可知 α -PEC 的吸收峰在 500 \leftrightarrow 570 nm 间发生位移, 活性高达 80% 以上。总之, 根据层理鞭枝藻藻红蓝 α 亚基光谱性质与鱼腥藻藻红蓝 α 亚基相似可知, 所表达的 PecA、PecE/F 为鱼腥藻藻红蓝蛋白 α 亚基 PecA、裂合异构酶 PecE/F。尿素变性后, P570 和 P500 分别在 594 nm 处和 538 nm 处出现最高吸收峰, 可以判断连接上两种分子构型不同的 PVB, 即前者为顺式构型, 后者为反式构型的 PVB(图 3:c,d)。

重组体系 II: 将 pETDuet-*pecA* 和 pACYCDuet-*hol-psyA* 共同转化大肠杆菌 BL21(DE3)。对提纯后的重组蛋白分别进行荧光光谱和吸收光谱检测, 发现很微弱的荧光光谱发射峰在 580 nm 左右, 吸收光谱未见明显的 500 \leftrightarrow 570 nm 可逆光致变色性质。说明在没有裂合异构酶的催化下, 此色素蛋白质中 PCB 色素与脱辅基蛋白相互作用很弱。

天然的层理鞭枝藻藻红蓝蛋白的荧光量子产率为 0.27, 以此为相对标准计算体内重组产物 PecA-PCB 的荧光量子产率为 0.21(± 0.01)。

根据色素蛋白在酸性尿素(pH 2.0, 8 mol/L 尿素)中的色素 PCB 的摩尔消光系数 $\epsilon_{660} = 35500 \text{ L} \cdot \text{cm}/\text{mol}$ 以及公式 $A = \epsilon \cdot L \cdot C$ 计算摩尔消光系数, 算得体内重组产物 PecA-PCB 在 P570 构型的摩尔消光系数为 $\epsilon_{570} = 0.9174(\pm 0.01) \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{cm}/\text{mol}$, 在构型 P500 的摩尔消光系数 $\epsilon_{500} = 1.035(\pm 0.01) \times$



a: 荧光光谱; b: 500 nm 光照(实线), 570 nm 光照(虚线)的吸收光谱(500~570 nm)和差减光谱(点线); c: 500 nm 光照变性前(实线)后(虚线)吸收光谱; d: 570 nm 光照变性前(实线)后(虚线)吸收光谱

a: Fluorescence emission spectrum of reconstituted product (excitation wavelength 550 nm); b: Absorption spectra after irradiation with 500 nm light (solid line), after subsequent irradiation with 570 nm light (dash line) and difference absorption of 500 nm irradiation minus 570 nm irradiation (dot line); c: Before denaturation (solid line) and after denaturation (dash line) with 500 nm light; d: Before denaturation (solid line) and after denaturation (dash line) with 570 nm light

图 3 脱辅基蛋白 PecA 在裂合异构酶 PecE/PecF 的催化下体内重组生成产物的吸收光谱

Fig. 3 Absorption spectra of reconstituted products of PecA with PecE/PecF

$10^5 \text{ L} \cdot \text{cm}/\text{mol}$ 。

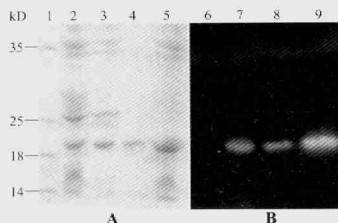
通过比较重组体系 I 和重组体系 II, 发现在大肠杆菌内鱼腥藻藻红蓝蛋白 α 亚基有一定的自催化能力, 通过荧光激发光谱计算其自催化比例为 0.1%。

2.3 色素蛋白锌电泳

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。将重组体系 I 的细胞、超声上清、提纯蛋白分别制样后进行 SDS-PAGE 电泳和色素蛋白锌电泳, 发现在蛋白 PecA 相对应的位置有桔色荧光。这证明在体内脱辅基蛋白与色素共价连接成功, 得到色素蛋白 PecA-PCB(图 4)。

3 讨论

在以前的工作中我们已经通过体外合成出了鱼腥藻藻红蓝蛋白 α 亚基脱辅基蛋白和裂合异构酶 PecE/F, 并重组得到具有天然活性的藻红蓝蛋白 α 亚基。根据不断深入的研究我们知道藻红蓝蛋白 α 亚基脱辅基蛋白是在裂合异构酶 PecE/F 的催化下



A: 重组产物考马斯亮蓝染色电泳图。1: 蛋白质标准分子量; 2: 重组细胞; 3: 重组上清; 4: 重组提纯; 5: pETDuet-*pcbA* 诱导表达产物。B: 重组产物的锌荧光。6: pETDuet-*pcbA* 诱导表达产物; 7: 重组细胞; 8: 重组上清; 9: 重组提纯
A: PCB-PecA Coomassie-stained. 1: Marker proteins; 2: Cell; 3: Solution; 4: Purified; 5: pETDuet-*pcbA* induced with IPTG. B: Zn^{2+} -induced fluorescence of PCB-PecA. 6: pETDuet-*pcbA* induced with IPTG; 7: Cell; 8: Solution; 9: Purified

图4 重组体系 I 的 SDS-PAGE 电泳(A)和
色素蛋白锌电泳(B)

Fig.4 PCB-PecA coomassie-stained (A) and
 Zn^{2+} -induced fluorescence of PCB-PecA (B)

通过第84位半胱氨酸与色素 PCB 连接并使其异构成 PVB, 重组蛋白的可逆光致现象也是由于 PVB 第15, 16位发生顺反异构的结果。为了进一步验证这一性质在蓝藻中的普遍性, 我们选取了同样具有藻红蛋白的鱼腥藻, 通过体内重组对比可知鱼腥藻藻红蛋白 α 亚基脱辅基蛋白和裂合异构酶 PecE/F 也表现了同样的性质, 进一步印证了藻红蛋白的可逆光致变色性质。本研究表明体内重组制备的 α -PEC 具有更高纯度和更好的光谱性质。

本实验为了完成 α -PEC 的生物合成, 首先要在大肠杆菌内实现藻胆素 (简称 PCB) 的生物合成, 即构建含 *hol* *pcyA* 的重组质粒; 其次为构建含裂合酶基因 *pecE* 和 *pecF* 的重组质粒; 最后就是构建含 *pecA* 的重组质粒。

因为质粒 pETDuet-1、pCOLADuet-1、pCDFDuet-1、pACYCDuet-1 含有不同的复制子, 所以它们具有相容性^[9], 我们将相应的质粒组合 pETDuet-*pcbA*、pCOLADuet-*pecE*、pCDFDuet-*pecF* 和 pACYCDuet-*hol*-*pcyA* 共同转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 体内产生的 PCB 在 PecE 和 PecF 蛋白的催化下共价连接到 PecA 第84位半胱氨酸的巯基上。

在缺少 pCOLADuet-*pecE*、pCDFDuet-*pecF* 的大肠杆菌内也检测到很少量的有生物活性的 PecA-PCB, 所以在生物体内 PecA 与 PCB 能进行一定程度的自催化连接反应并形成天然产物, 通过荧光光谱计算其自催化比例为 0.1%。

通过本实验实现了在大肠杆菌体内合成具有生物活性的藻红蛋白 α 亚基, 从而提高了对藻胆体组装过程的认识^[10,11]。

参考文献:

- [1] Mullineaux C W. Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterium[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1100**: 285–292.
- [2] Glauser M, Bryant D A, Frank G, Kang S. Phycobilisome structure in the cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Anabaena* sp. PCC 7120: a new model[J]. *Eur J Biochem*, 1992, **205**: 907–915.
- [3] Catharina T M, Zhang X H, Tadashi Y. Expression and characterization of cyanobacterium heme oxygenase, a key enzyme in the phycobilin synthesis. Properties of the heme complex of recombinant active enzyme[J]. *Eur J Biochem FEBS*, 2003, **270**: 687–698.
- [4] Nicole F, Clark L. Phycocyanobilin; Ferredoxin Oxidoreductase of *Anabaena* sp. PCC7120[J]. *JBC*, 2003, **278**: 9219–9226.
- [5] Landgraff F T, Forreiter A, Hurtado P, Glazer A N. Recombinant holophytochrome in *Escherichia coli*[J]. *FEBS Letters*, 2001, **508**: 459–462.
- [6] Zhao K H, Deng M G, Zheng M. Novel activity of a phycobiliprotein lyase: both the attachment of phycocyanobilin and the isomerization to phycocyanobilin are catalyzed by the proteins PecE and PecF encoded by the phycoerythrocyanin [J]. *FEBS Letters*, 2000, **469**: 9–13.
- [7] Tooley A J, Glazer A N. Biosynthesis of the cyanobacterial light-harvesting polypeptide phycoerythrocyanin holo- α subunit in a heterologous host[J]. *J Bacteriol*, 2002, **184**(17): 4666–4671.
- [8] 孙亚楠, 武栋, 周明, 赵开弘. 鱼腥藻 PCC7120 藻红蛋白操纵子 A、E 和 F 基因的克隆、表达和活性分析[J]. *水生生物学学报*, 2004, **28**(3): 275–279.
- [9] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.
- [10] Cai Y A, Murphy J T, Wedemayer G J. Recombinant phycobiliproteins recombinant C-phycoyanins equipped with affinity tags, oligomerization, and biospecific recognition domains[J]. *Analytical Biochemistry*, 2001, **290**: 186–204.
- [11] 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.