

集胞藻 PCC6803 细菌光敏色素体外重组和光化学活性研究

董依然¹ 冉勇² 赵开弘¹ 周明^{1*}

(¹ 华中科技大学环境科学与工程学院, ² 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘 要 采用聚合酶链式反应(PCR)从集胞藻 PCC6803 总 DNA 中扩增出细菌光敏色素全片段 *cph1* 及 *cph1*(C-435), 克隆于 pBluescript SK(+) 然后插入表达载体 pET30a 进行高效表达。获得的脱辅基蛋白 Cph1、Cph1(C-435) 在合适的缓冲体系下分别与藻蓝胆素(PCB)进行体外重组。光化学研究表明, 两种脱辅基蛋白都能与 PCB 进行正确的重组, 重组产物表现出 650~700nm 可逆光致变色效应。锌电泳证实得到的细菌光敏色素辅基色素为 PCB, 酸性尿素变性实验证明可逆光致变色效应来源于 PCB 在不同波长光照下的顺反异构化。

关键词 细菌光敏色素, 可逆光致变色, 体外重组

中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0238-07

光敏色素(Phytochrome)是存在于植物、蓝藻和红藻中的功能色素蛋白质。研究表明光敏色素具有组氨酸激酶和磷酸转移酶等功能, 在植物和细菌的光形态生成中发挥重要作用。原核生物中存在的光敏色素一般统称为细菌光敏色素。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)。因此, 它的发现拓展了对植物光敏色素起源和作用模式的认识。

藻胆色素(Phycobilin)通过硫醚键与光敏色素脱辅基蛋白的巯基共价结合, 其种类及其与脱辅基蛋白的相互作用决定光敏色素的光谱性质。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 650~750nm 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]。

在天然藻蓝蛋白(Phycocyanin, 简称 PC)中, 藻蓝蛋白脱辅基蛋白 84 位半胱氨酸上的巯基通过硫醚键与其辅基色素——藻蓝胆素(Phycocyanobilin, 简称 PCB)结合。裂合酶 CpcE/CpcF 的催化作用能使藻蓝蛋白(PC)上结合的藻蓝胆素(PCB)断裂^[2]。

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。集胞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的原核生物之一。本实验选用集胞藻 PCC6803, 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

集胞藻(*Synechocystis* sp. 6803)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 SABC 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服务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 PCR 扩增

集胞藻 PCC6803 总 DNA 序列来源于 GenBank 报道 (D64001), 以其为模板设计 PCR 引物 P₁、P₂、P₃。引物 P₁、P₂ 的扩增条件为: 94℃ 预变性 40s, 然后 94℃, 60s; 48℃, 90s; 74℃, 120s; 30 个循环, 最后 74℃ 延伸 300s。引物 P₁、P₃ 扩增条件为: 94℃ 预变性 40s, 然后 94℃, 60s; 48℃, 90s; 74℃, 90s; 30 个循环, 最后 74℃ 延伸 300s。

引物 P₁: 5'-AAA CCC GGG ATG GCC ACC ACA GTA CAA CTC A-3'

引物 P₂: 5'-AAT CTC GAG TTA GTT GCC AAT GGG GAT G-3'

引物 P₃: 5'-AAT CTC GAG TTA GCT AAA CAC CAC CCG ACC A-3'

1.3 分子克隆与序列测定

按文献 [3] 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。

1.4 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 约为 0.5, 20℃ 水浴中放置 1h, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 20℃ 低温诱导 6h, 取 1mL 菌液 10 000 × g 离心。加入 1 × 上样缓冲液和巯基乙醇(9:1), 100℃ 5min, 用 8% 的分离胶进行 SDS-PAGE 分析。方法见文献 [3, 4]。

1.5 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 个组氨酸的亲亲和标记, 简称 His-tag, 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。

1.6 体外重组

重组体系 I: 实验 1.4 得到的细菌光敏色素脱

辅基蛋白直接用于体外重组实验。表达得到的细菌光敏色素脱辅基蛋白菌液 30mL 离心, 沉淀用二次蒸馏水洗净, 向其中加入 1mL 预冷的缓冲液 R(50 mmol/L TrisCl, 300mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.2mmol/L β-巯基乙醇, 0.1% Triton X-100, pH 7.8)^[5]。重组采用两种方法: A. 加入藻蓝胆素(PCB)后, 重组体系共同超声 1min, 将超声产物在室温暗环境条件下反应 3h, 离心取上清测定吸收光谱; B. 重组体系其它组分不变, 超声后向上清中加入藻蓝胆素(PCB), 迅速混匀体系, 用吸收光谱测定重组反应进程。

重组体系 II: 取实验 1.4 所得到的细菌光敏色素脱辅基蛋白直接用于体外重组实验。重组体系中加入 0.5mol/L NaCl、500mmol/L 磷酸钾缓冲液、1mol/L Tris·HCl(pH = 8)、细菌光敏色素脱辅基蛋白、裂合酶 CpcE/CpcF、藻蓝蛋白(PC)以及其它必要的辅助因子: β-巯基乙醇、Mg²⁺, 其中 Tris·HCl、NaCl、磷酸钾、Mg²⁺、β-巯基乙醇终浓度分别为 100mmol/L、50mmol/L、5mmol/L、5mmol/L、5mmol/L, pH = 7.0 ~ 7.5, 二次蒸馏水补齐至总体积 0.6mL^[6]。分别选用 25℃ 反应 12h 和 37℃ 暗处反应 3h; 对照反应体系中不加入 CpcE/CpcF, 其体积用 0.5mol/L NaCl、50 mmol/L 磷酸钾缓冲液补齐, 用吸收光谱比较不同条件下的重组效率。

1.7 光谱测定活性

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。色素蛋白质可逆光化学性质的测定, 按文献 [7] 介绍的方法操作。荧光光谱测定采用日立 F-4500 型荧光光谱仪, 荧光光谱扫描速度为 1200nm/min, 狭缝宽度 5.0nm/5.0nm。

1.8 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。

1.9 色素蛋白电泳

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℃ 5min, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。电泳完成后, 电泳胶室温下经 1mol/L 醋酸锌溶液浸泡 1h, 在 280nm 紫外灯下检测^[7]。

1.10 藻蓝蛋白(PC)的制备

藻蓝蛋白(PC)采用 DEAE 纤维素层析从层理鞭枝藻(UTEX 1931)获得,将其溶解在 pH = 7.1 的 100mmol/L 磷酸钾(KPP)缓冲液中。PC 溶液对 pH = 7.1 的 1mol/LKPP 溶液透析 3 次后在 12 000 × g 离心 10min,得到的沉淀产物即是纯的 PC^[8]。

1.11 裂合酶 CpcE、CpcF 的制备

裂合酶 CpcE、CpcF 是由本实验室李梅同学通过克隆表达层理鞭枝藻 PCC 7603 相应基因而得到的蛋白质纯化产物。

2 结果

2.1 *cph1*、*cph1*(C-435)基因的 PCR 扩增、克隆和重组质粒的鉴定

引物 P₁、P₂ 扩增 *cph1* 基因,引物 P₁、P₃ 扩增 *cph1*(C-435)基因。设计引物时,在引物 5'端、3'端分别引入了 *Xho* I、*Sma* I 识别位点和 3 个保护碱基,分别扩增出大小为 2247bp 和 942bp 的基因片段(图 1a)。DNA 回收试剂盒回收扩增的 PCR 产物,分别构建重组质粒 pBlu-cph1、pBlu-cph1(C-435)。根据质粒的大小初步判断阳性重组子,并采用 PCR 方法及限制性内切酶酶切图谱分析作进一步鉴定(图 1b)。琼脂糖凝胶浓度为 1.0%。通过测序证明所得的 *cph1* 和 *cph1*(C-435)和报道的基因序列一致,分别为 2247bp、942bp。

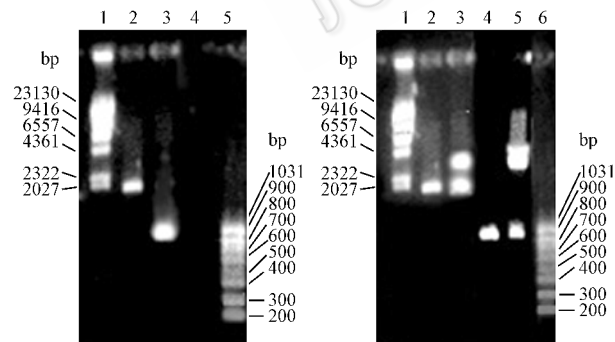


图 1 PCR 产物(a)重组质粒 PCR 检验与用 *Sma* I、*Xho* I 酶切消化检测(b)的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR product, recombinant plasmids examined by PCR and digested by *Sma* I and *Xho* I (a) 1: λDNA/*Hind* III marker; 2: PCR product of *cph1*; 3: PCR product of *cph1*(C-435); 4: negative control of PCR; 5: DNA ladder (b) 1: λDNA/*Hind* III marker; 2: pBlu-cph1 examined by PCR; 3: pBlu-cph1 digested by *Sma* I, *Xho* I; 4: pBlu-cph1(C-435) examined by PCR; 5: pBlu-cph1(C-435) digested by *Sma* I, *Xho* I; 6: DNA ladder

2.2 重组质粒在大肠杆菌中的表达

重组获得的 pBlu-cph1 和 pBlu-cph1(C-435)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),低温表达后进行 SDS-PAGE 分析,如图 2 所示。经过 IPTG 诱导, pET-cph1、pET-cph1(C-435)有明显的蛋白质表达带。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 His-tag 的亲标记, His-tag-Cph1、His-tag-Cph1(C-435)蛋白质分子量分别为 89.2kD 和 40.3kD,蛋白质 marker 显示外源蛋白表达带大小与预计大小符合(如图 2)。

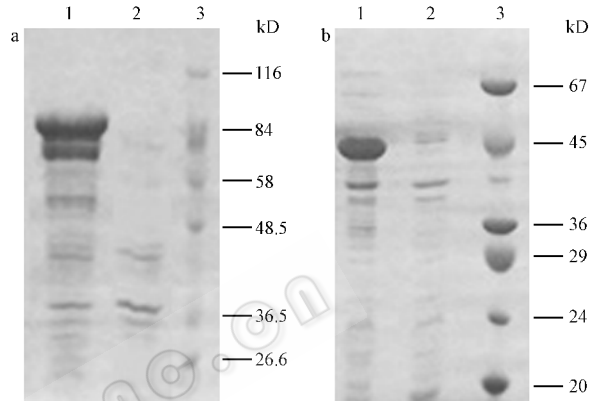


图 2 Cph1、Cph1(C-435)基因表达产物的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE of the overexpressed Cph1 and Cph1(C-435)

(a) 1: Cph1 induced with IPTG; 2: Cph1 not induced with IPTG; 3: protein molecular weight marker; (b) 1: Cph1(C-435) induced with IPTG; 2: Cph1(C-435) not induced with IPTG; 3: protein molecular weight marker

2.3 光谱分析

2.3.1 重组体系 I: 在重组体系 I 中,细菌光敏色素脱辅基蛋白 Cph1 和 Cph1(C-435)直接与 PCB 进行重组反应,在材料与方法 1.6 所述重组条件下,反应能够高效自发进行。吸收光谱检测反应动力学表明,伴随 PCB 与脱辅基蛋白反应的进行, 660nm 处的峰值不断升高, 370nm 和 700nm 处的吸收值不断降低。Cph1 与 PCB 的反应在 35min 能够进行完全,达到稳定值,色素蛋白最大吸收光谱为 657nm; Cph1(C-435)与 PCB 的反应较之稍慢, 1h 后达到稳定,色素蛋白质最大吸收光谱为 648nm(图 3)。

重组反应完全后,对重组蛋白进行红光/红外光循环照射。色素蛋白光敏色素经过红外光 700nm 单色光照射 8min,得到的蛋白质最大吸收光谱为 650nm; 当用 650nm 单色光对其照射 5min 后, 650nm 处吸收光谱显著降低, 700nm 处吸收光谱升高。对该重组体系采用两种重组方法(如材料与方法 1.6 所述),实验结果表明不同重组方法对重组效率没有

影响。重组后色素蛋白的吸收光谱如图 4。

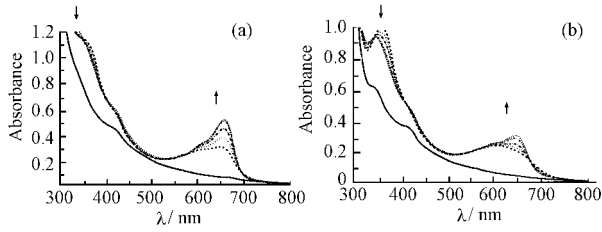


图 3 CphI (a) CphI(C-435) 脱辅基蛋白和 PCB 自催化重组反应随时间变化的吸收光谱

Fig. 3 Autoassembly with PCB. Changes in absorption spectra during autoassembly of CphI (a) and CphI(C-435) (b)

The directions of the absorption changes are indicated by the arrows. (a) Solid line : the apoprotein CphI ; The other curves indicate the absorption spectra of 1min , 3min , 5min , 15min , 35min after mixing , respectively. (b) Solid line : the apoprotein CphI(C-435) ; The other curves indicate the absorption spectra of 1min , 5min , 10min , 30min , 60min after mixing , respectively

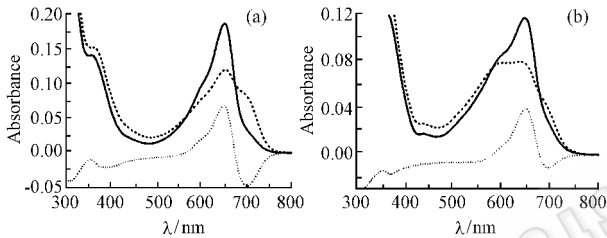


图 4 CphI (a) CphI(C-435) 脱辅基蛋白和藻蓝胆素 PCB 重组生成产物的吸收光谱

Fig. 4 Absorption spectra of the reconstitution products with PCB P_r (dashed curve) , P_{fr} (solid curve) and difference spectrum (dotted curve) forms of CphI (a) , CphI(C-435) (b)

细菌光敏色素具有两种不同的存在形式 : 红光吸收型 (P_r) 和远红外光吸收型 (P_{fr}) , 这两种形式在不同的光作用下可以相互转化 , 具有不同的光学性质。它们的光谱性质的变化是其发色团和脱辅基蛋白相互作用的结果 , 其结构基础是在不同波长光 (650nm 或 700nm) 作用下 , 发色团的双键发生顺反异构。由于发色团是与蛋白质部分紧密相连的 , 因而发色团在发生顺反异构时 , 蛋白质的构象随之变化。

色素蛋白经过尿素变性后 , 由于色素蛋白质中 PCB 色素与脱辅基蛋白相互作用很弱 , 其吸收光谱与游离的 PCB 相似。这样 , 在暗处尿素变性色素蛋白后 , 就可以观察到发色团结构的顺反异构变化 (见图 5) 。色素蛋白 CphI、CphI(C-435) 经 700nm 光照后在暗处变性 , PCB 最大吸收峰分别在 656nm、655nm 处 , 表明这时细菌光敏色素脱辅基蛋白所连

色素为顺式构象的 PCB ; 二者经 650nm 光照后在暗处变性 , PCB 最大吸收峰分别在 606nm 和 597nm 处 , 表明这时细菌光敏色素脱辅基蛋白所连色素为反式构象的 PCB。因此 , 细菌光敏色素可逆光致变色的结构基础是发色团 (本工作中是 PCB) 在光作用下的顺反异构。

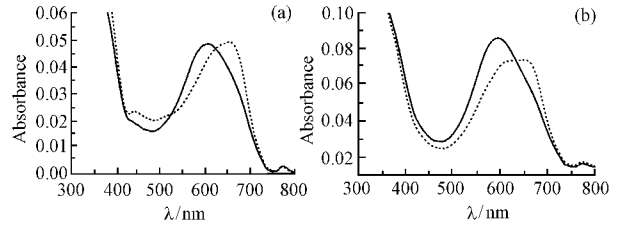


图 5 色素蛋白 CphI (a) CphI(C-435) 在暗处经 8mol/L 尿素 (pH = 2) 变性后的吸收光谱

Fig. 5 Absorption spectra of holo-CphI (a) and holo-CphI(C-435) (b) after denaturation in the dark with urea (8 mol/L) in the presence of hydrochloric acid (pH = 2)

Solid line corresponds to denaturation after saturating irradiation of native sample with 650 nm light , and dot line to denaturation after saturating irradiation of native sample with 700 nm light

荧光光谱进一步研究与细菌光敏色素脱辅基蛋白所连色素的性质。色素蛋白 CphI、CphI(C-435) 经 700nm 光照后细菌光敏色素脱辅基蛋白所连色素为顺式构象的 PCB , 经 630nm 处激发 , 荧光光谱检测产物为单一吸收峰 , 二者吸收峰峰值均为 660nm ; 经 650nm 光照后 , 细菌光敏色素脱辅基蛋白所连色素为反式构象的 PCB , 但是比起顺式结构的 PCB , 其荧光相当弱 , 没有明显的荧光吸收峰 (图 6) 。说明在室温条件下 , 藻蓝胆素 (PCB) 的顺式结构比反式结构稳定。

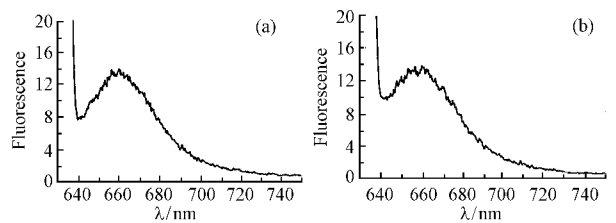


图 6 脱辅基蛋白 CphI (a) CphI(C-435) 与藻蓝胆素 (PCB) 直接重组生成产物在 700nm 光照后的荧光光谱 (630nm 激发)

Fig. 6 Fluorescence emission spectrum of reconstituted products of CphI (a) and CphI(C-435) (b) after irradiation with 700 nm light (excitation wavelength 630nm)

2.3.2 重组体系 II : 采用不同的条件进行重组 (材料与方法 1.6 所述) , 各反应条件及重组效率见表

1. 结果表明, 25℃ 条件下脱辅基蛋白和裂合酶 CpcE/CpcF 共同在重组缓冲液中预处理 12h, 再加入藻蓝蛋白(PC)反应 6h, 重组效果为最佳(图 7)。如吸收光谱, 可逆光致变色性质与 Cph1、Cph1(C-435)脱辅基蛋白与 PCB 直接重组相似。作为对照组的重组体系在相同反应条件下, 重组反应不明显, 仅有微弱的光致可逆效应。表明在该重组体系中, 裂合酶 CpcE/CpcF 能够催化藻蓝蛋白(PC)与其辅基色素——藻蓝胆素(PCB)断裂, 释放出 PCB, 进而提高细菌光敏色素脱辅基蛋白与 PCB 的重组效率, 得到具有可逆光致变色效应的胆素蛋白细菌光敏色素。

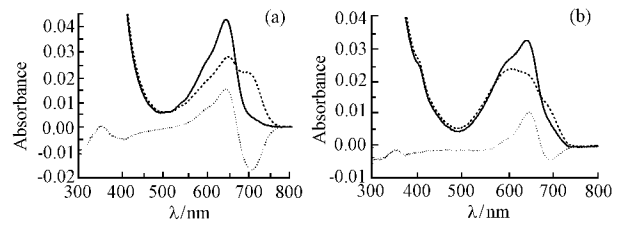


图 7 Cph1(a)、Cph1(C-435)(b)脱辅基蛋白在裂合酶 CpcE/CpcF 的催化下与藻蓝蛋白(PC)体外重组生成产物的吸收光谱

Fig. 7 Absorption spectra of reconstituted products of Cph1(a) and Cph1(C-435)(b) with PC respectively, catalyzed by CpcE/CpcF. P_n (dashed curve); P_n (solid curve) and difference spectrum (dotted curve)

表 1 Cph1、Cph1(C-435)在裂合酶催化作用下与藻蓝蛋白(PC)不同条件下重组效率比较

Table 1 Different reconstitution efficiency catalyzed by CpcE/CpcF

	Cph1/%				Cph1(C-435)/%			
	a*	b	c	d	a	b	c	d
$\Delta A_{\max} - \Delta A_{\min}$	100	66.7	60.0	3.3	100	86.7	73.3	13.3

a: reconstitution with PC for 6h after pre-treatment of apoprotein and CpcE/CpcF at 25℃ overnight;

b: reconstitution with apoprotein for 6h after pre-treatment of PC and CpcE/CpcF at 25℃ overnight;

c: reconstitution of PC and apoprotein catalyzed by CpcE/CpcF at 37℃ for 3h;

d: reconstitution of PC and apoprotein without CpcE/CpcF. * For clarity, we set the relative reconstitution efficiency of Cph1 and Cph1(C-435) of method(a) as 100%, respectively.

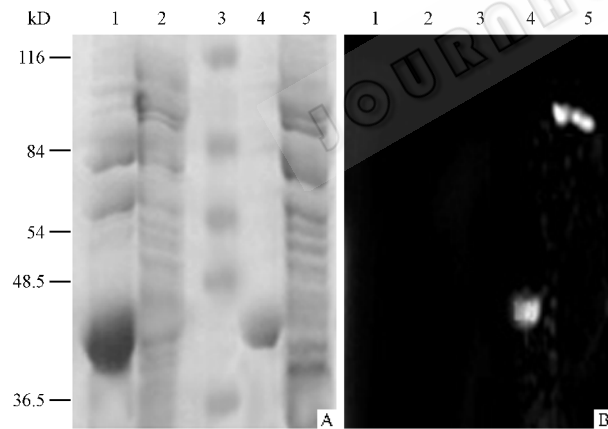


图 8 Cph1、Cph1(C-435)脱辅基蛋白和考马斯亮蓝染色(a)重组产物锌染色(b)

Fig. 8 Coomassie staining(a) and Zn^{2+} -induced fluorescence under UV(b) of Cph1, Cph1(C-435)

1: purified His-tag-Cph1(C-435); 2: purified His-tag-Cph1; 3: protein molecular weight marker; 4: purified reconstitution product of His-tag-Cph1(C-435) with PCB; 5: purified reconstitution product of His-tag-Cph1 with PCB

2.4 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。通过分别作脱辅基蛋白

Cph1 重组蛋白的锌电泳, 可以发现, 在紫外光照射下, 锌电泳中重组蛋白发出桔色荧光, 而脱辅基蛋白处没有。相对应的 SDS-PAGE 电泳, 表明有脱辅基蛋白 Cph1 存在。这证明在重组过程中脱辅基蛋白与色素在裂合酶的作用下共价连接成功, 并得到色素蛋白。

3 讨论

目前, 对光敏色素的作用机理和途径还处在初步研究阶段。集胞藻细菌光敏色素 Cph1 是较早被证实具有组氨酸激酶和磷酸转移酶功能的细菌光敏色素, 它的发现使得科学家重新审视植物光敏色素的酶效应。因此, 集胞藻光敏色素的研究为研究植物光敏色素调控光信号提供了有效的模型。

光敏色素脱辅基蛋白能够在 *E. coli* 中高效表达, 与藻胆色素进行体外重组, 得到具有特征光化学活性的色素蛋白, 色素蛋白经锌染色 SDS-PAGE 电泳、吸收光谱、荧光光谱得以证实。本实验中光敏色素脱辅基蛋白和藻蓝胆素直接重组反应所得结果显示, Cph1 重组效率较 Cph1(C-435) 好, 由二者的吸收光谱得到的 $\Delta A_{\max} - \Delta A_{\min}$ 分别为 0.11 和 0.055; 此

外, Cph1-PCB 和 Cph1(C-435)-PCB 的 $\Delta A_{\max}/\Delta A_{\min}$ 值差别较大, 分别为 1.22 和 4.05。其原因可能是由于 Cph1(C-435) 与光敏色素全片段相比 C 端缺失了 435 个氨基酸片段, 影响了蛋白质的正常构象。文献报道 Cph1-PCB 的 $\Delta A_{\max}/\Delta A_{\min}$ 值为 1.03^[5]。

本实验利用裂合酶 CpcE/CpcF 的催化作用, 促进藻蓝蛋白(PC)和细菌光敏色素脱辅基蛋白的重组反应, 为细菌光敏色素重组提供了新的思路。不同重组条件实验结果显示, 25℃条件下, 脱辅基蛋白和裂合酶混合预处理过夜, 再加入藻蓝蛋白(PC)反应 6h 重组效率最高。其原因可能是较其他几种反应条件, 脱辅基蛋白与裂合酶在预处理过程中充分作用, 在后续反应中裂合酶能够充分发挥催化作用, 使后续反应进行充分。没有裂合酶 CpcE/CpcF 参与的反应条件下, 脱辅基蛋白结合藻蓝胆素(PCB)的能力不强, 重组效率分别为最佳条件的 3.3%(Cph1)和 13.3%(Cph1(C-435)), 较其他有裂合酶参与反应条件的重组效率也较低。其原因可能为没有裂合酶的作用下, 光敏色素从 PC 上夺取 PCB 的能力有限, PCB 很难从 PC 上断裂, 参与和细菌光敏色素结合的 PCB 大大减少, 因此生成的胆素蛋白也减少, 表现在光谱上显示出较低的重组效率。

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。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Richard DV, Seth JD. Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction. *Seminars in Cell & Development Biology*, 2000, **11**: 551 - 521
- [2] Schluchter WM, Glazer AN. Biosynthesis of phycobiliproteins in Cyanobacteria. In: *The Phototrophic Prokaryotes* (Peschek Loe elhardt W, Schmetterer G, eds), New York, Kluwer Academic/ Plenum Press, 1999
- [3] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed), New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001
- [4] Lamparter T, Mittmann F, Gaertner W *et al.* Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 11792 - 11797
- [5] Shim CM, Yang JY, Kang SS *et al.* Chromophore-apoprotein interactions in *Synechocystis* sp. PCC6803 phytochrome Cph1. *Biochemistry*, 2000, **39**: 6349 - 6356
- [6] Storf M, Parbel A, Meyer M *et al.* Chromophore attachment to biliproteins: specificity of PccE/PccF, a lyase-Isomerase for the photoactive 3'-Cys- α 84-phocoviolobin chromophore of phycoerythrocyanin. *Biochemistry*, 2001, **40**: 12444 - 12456
- [7] Zhao KH, Scheer H. Type I and type II reversible photochemistry of phycoerythrocyanin α -subunit from *Mastigocladus laminosus* both involve Z, E isomerization of phycoviolobin chromophore and are controlled by sulfhydryls in apoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1228**: 244 - 253
- [8] Fueglistaller P, Widmer H, Sidler W *et al.* Isolation and characterization of phycoerythrocyanin and chromatic adaptation of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Arch Microbiol*, 1981, **129**: 268 - 274

Study on the Reconstitution *in vitro* and Photochemical Activities of Phytochrome from the *Synechocystis* sp. PCC6803

DONG Yi-Ran¹ RAN Yong² ZHAO Kai-Hong¹ ZHOU Ming^{1*}

¹(School of Environmental Science & Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

²(School of Life Science & Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract Genomic DNA sequence analysis of phytochrome like photoreceptors in a number of bacteria revealed several open reading frames (ORFs) encoding proteins with amino acid sequences homologous to plant phytochromes. The phytochrome like photoreceptors, collectively called bacteriophytochromes, contain an N-terminal domain homologous to the chromophore-binding

Received: 07-21-2003

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China (No. 90201001, 30270326).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87541634; Fax: 86-27-87541634; E-mail: yongran@hust.edu.cn; http://journals.im.ac.cn

domain (CBD) of higher plants and a C-terminal domain of histidine kinase domain (HKD). Due to their simple structure , bacteriophytochromes broaden the view of phytochrome evolution and provide us with a simple model to investigate phytochrome-mediated light signal in higher plants .

In this report , the bacteriophytochromes from *Synechocystis* sp. PCC6803 were investigated. The gene *cph1* and its fragment *cph1*(C-435) were isolated from the *Synechocystis* sp. PCC6803 genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers . Then , the genes were cloned with the vector pBluescript , yielding plasmids pBlu-cph1 and pBlu-cph1(C-435) , before they are subcloned with the vector pET30 , using the *EcoRV* and *XhoI* restriction sites . pBlu-cph1 , pBlu-cph1(N-435) were cleaved with *SmaI* and *XhoI* , and the released genes were ligated to the pET30a fragment . The *E. coli* [strain BL21 (DE3)] cells containing recombinant pET30a were grown in medium RB at 20°C , and harvested 6 h later after induction with isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG). Then , reconstitution systems were employed to study the characteristics of the genes . In the reconstitution system , autoassembly of a protein of phytochrome with PCB was investigated . The chromophore addition was an autocatalytic process . Reconstitution products were red/infrared (R/IR) photochromic , which was similar to that of the phytochrome in higher plants . However , the spectral change ratios ($\Delta A_{\max} / \Delta A_{\min}$) of the two fragments differed from each other . It was also shown that PCB was covalently bound to apo-protein via Zn^{2+} fluorescence SDS-PAGE . After irradiation by light of 700nm , the maximum absorption spectrum of holo-Cph1 was 650nm . The absorption of it after denaturation in the dark with urea in the presence of hydrochloric acid (pH = 2) was 660nm , which was similar with that of *cis*-PCB . In addition , after irradiation by light of 650nm , the maximum absorption spectrum of holo-Cph1 was 700nm . The absorption of it after denaturation in the dark with urea in the presence of hydrochloric acid (pH = 2) was 600nm , which was similar with that of *trans*-PCB . The result showed that the photochromism of phytochrome resulted from the isomerization of chromophore (PCB in this report) . The reconstitution of Cph1(C-435) under the same condition supported the conclusion . Fluorescence emission spectrum of the products suggested that bacteriophytochrome structure with *cis*-PCB was more stable than that with *trans*-PCB .

The new reconstitution system in this report sets a base for the application of phytochrome as photochromic biomaterials in biosensors . In addition , phytochrome shows great potential in food , cosmetic and biological engineering , etc .

Key words bacteriophytochromes , photochromism , reconstitution *in vitro*