

藻胆体核亚基 ApcD 定点突变及体内重组功能研究*

汪星¹⁾ 张茜¹⁾ 杨蓓¹⁾ 赵开弘^{1, 2)} 周明^{2, 3)**}

¹⁾ 华中科技大学环境科学与工程学院, 武汉 430074; ²⁾ 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070;

³⁾ 华中农业大学生物物质与生物能源研究中心, 武汉 430070)

摘要 在对 *Anabaena* sp. PCC 7120 藻胆体核亚基 ApcD 结合色素 PCB 的体内重组中, 发现色素蛋白在提纯前后最大吸收峰和荧光峰发生了红移, 从提纯前的 605 nm 及 633 nm 变为提纯后的 650 nm 及 665 nm. 为了研究该现象的原因, 构建了 ApcD 的 8 个突变体, 重组结果显示: 突变体 ApcD (Y88I) 色素蛋白在提纯后的吸收光谱和荧光光谱较提纯前均多出一个峰, 分别为 668 nm, 690 nm; ApcD(W59Q)、ApcD(Y73A)、ApcD(W87E) 色素蛋白在提纯前后的吸收光谱和荧光光谱一致; ApcD (M126S)、ApcD (Y116S)、ApcD (M160T) 色素蛋白在提纯前后的吸收光谱一致, 而提纯后的荧光峰位置较提纯前分别红移了 5 nm、7 nm 和 10 nm; ApcD (M115I) 色素蛋白在提纯前后的吸收光谱和荧光光谱均发生了红移, 从提纯前的 605 nm 和 633 nm 变为提纯后的 638 nm 和 655 nm. 这些色素蛋白在酸性尿素溶液变性条件下的最大吸收峰始终在 662 nm, 表明辅基色素仍然是藻蓝胆素; 在对 PCB-ApcD、PCB-ApcD (Y116S) 及 PCB-ApcD (M160T) 的圆二色谱分析发现, 该两个氨基酸的突变均对脱辅基蛋白所连接的色素构象产生了一定的影响, 而对重组蛋白的二级结构没有影响.

关键词 ApcD, 定点突变, 体内重组

学科分类号 Q5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00599

别藻蓝蛋白 (APC) 是藻胆体 (PBS) 的重要组成部分, 它位于 PBS 的核心位置, 外连天线杆内连类囊体膜, 因而是能量传递的关键环节. α -APC-B 作为 PBS 的终端发射基团, 将激发能传递给光合作用反应中心^[1]. 因此, α -APC-B 光谱性质的研究, 对于研究蓝藻光合作用能量传递具有重要意义.

我们的研究结果发现, 一种编号为 *alr0617* 基因的编码蛋白是 β -CPC 和 β -PEC 中第 84 位 Cys, α -APC 和 β -APC 中第 82 位 Cys 与 PCB 连接的裂合酶, 被命名为藻胆蛋白裂合酶 CpcS/CpeS^[2]. 在生物体内, PCB 的生成源于亚铁血红素, 在亚铁血红素氧化酶 HO(编码基因为 *hol*) 的催化下, 亚铁血红素转变为胆绿素 IX α ^[3], 胆绿素 IX α 在 PCB 氧化还原酶 PcyA(编码基因为 *pcyA*) 的催化下, 得到 4 个电子, 生成藻蓝胆素 PCB^[4]. 将两种基因 *hol* 和 *pcyA* 在大肠杆菌中共表达, 可以实现 PCB 的生物合成^[5].

α -APC-B 的脱辅基蛋白由 *apcD* 编码, 其表达的蛋白质为 ApcD. 本实验将 pET-*apcD* 表达质粒

与 pCDFDuet-*cpeS*, pACYCDuet-*hol-pcyA* 转化于大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行体内重组. 通过对 ApcD 进行体内重组和光谱测定分析, 发现其与藻蓝胆素 PCB 体内重组产物的光谱在提纯前后发生了明显的红移现象. 酸性尿素变性实验的结果证明, 得到的色素蛋白的辅基蛋白仍为 PCB, 为了研究产生上述提纯过程峰红移现象的原因, 通过同源比较及保守序列的分析, 我们选择 8 个可能对 ApcD 结构产生影响的氨基酸.

通过定点突变技术构建了 *apcD* 的 8 个定点突变体(W59Q、Y73A、W87E、Y88I、M115I、Y116S、M126S、M160T) 的 pET 表达质粒, 再将 pET 表达质粒与 pCDFDuet-*cpeS*, pACYCDuet-*hol-pcyA* 转化于大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行体内重组, 通过

* 国家自然科学基金 (30870519, 30870541) 和教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (20060487018) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 027-87284301, E-mail: happyhundan@tom.com

收稿日期: 2009-10-14, 接受日期: 2010-01-25

光谱分析, 试图找出 *apcD* 上这些氨基酸的突变对其体内重组产物结构所产生的影响.

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌菌株 TG1、BL21 为华中科技大学环境科学与工程学院保存; 克隆载体 pBluescript KS(+) 为 Stratagene 公司产品; 表达载体 pET30a(+)、pACYCDuet-1、pCDFDuet-1 购自 Novagen 公司; 重组质粒 pBlue-*apcD*、pET-*apcD*、pACYCDuet-*hol-*pcyA**、pCDFDuet-*cpeS* 为华中科技大学环境科学与工程学院构建保存; DNA 回收试剂盒、

T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 *Sma* I、*Xho* I、*Bgl* II、*EcoR* I、*Pst* I、*Bam*H I 购自 MBI 公司; Taq DNA 聚合酶为 Biostar 公司产品; IPTG 为 SABC 公司产品; 亲和层析介质购自 Amersham Pharmacia 公司; 引物合成以及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

为构建突变体, 根据 *apcD* 已知的序列, 设计了表 1 中引物. *apcD* 目标片段的上游引物和下游引物由华中科技大学环境科学与工程学院设计保存, 各突变位点所在的引物由北京奥科生物公司合成, 具体如下:

Table 1 The primers of the mutagenesis

Mutagenesis point	The primers of the mutagenesis
ApcD	UP: 5' ATACCCGGGATGACTGTAATTAGCCAAGTT 3' Low: 5' ACTCTCGAGGGCTTTGTATTAGGACATTGC 3'
ApcD (W59Q)	5' CAGGACGTTTTCTGCTGCAGTTGTTG 3'
ApcD (W87E)	5' TGTGTATCCGTGACTTTGGCCAGTACTT 3'
ApcD (Y88I)	5' TTGGCTGGATCCTACGGCTAATTACCTATG 3'
ApcD (M115I)	5' TGGTGTGCGGGAGATCTACAATTCTT 3'
ApcD (Y116S)	5' GGTGTGCGGGAGATGTCGAATTCCTTG 3'
ApcD (M126S)	5' CCTGTACCCGGATCCGTAGAAGCCATCA 3'
ApcD (M160T)	5' CTTCTCGAGGTATTAAGACGTTGCCTGAATG 3'
ApcD (Y73A)	UP: 5' GGCGAGCGTCAGCGTGCCTGTGTATCC 3' Low: 5' TGCAGCGTTGCCACCAGGTGCGATAAAA 3'

表 1 中带下划线的碱基序列包含突变的氨基酸, 作为检测突变是否成功的酶切位点, 除 ApcD (Y73A) 利用 TaKaRa MutanBEST Kit 试剂盒的方法设计上下游引物外, 其余 7 个突变体均按照 mega primer PCR[®]的方法来设计中间引物.

1.3 突变体的克隆与序列测定

利用 mega primer PCR 及 TaKaRa MutanBEST Kit 试剂盒的方法, 以重组质粒 pBlue-*apcD* 为模板扩增出两个突变体的基因片段.

上述基因片段经过 *Sma* I 与 *Xho* I 酶切后, 与经过同样双酶切的克隆载体 pBluescript KS(+) 连接, 然后转化于大肠杆菌 TG1 中, 用含有氨苄青霉素的 LB 培养基平板进行筛选. 根据质粒酶切图谱初步鉴定阳性重组子. 重组质粒经 *Sma* I 与 *Xho* I 酶切后回收的外源片段, 与经过 *EcoR* V 与 *Xho* I 酶切后回收的表达载体 pET30a(+) 进行连接反应, 再转化于大肠杆菌 BL21 中, 用含有卡那霉素的 LB 培养基进行筛选. 根据 DNA 电泳、蛋白质电

泳进行检测, 进一步鉴定阳性重组子. 将初步鉴定正确的菌种进行测序.

1.4 质粒的转化与体内重组菌种的筛选

将 pET-*apcD*、pACYCDuet-*hol-*pcyA** 与 pCDFDuet-*cpeS* 三种质粒, pET-*apcD* (mutant)、pACYCDuet-*hol-*pcyA** 与 pCDFDuet-*cpeS* 三种质粒分别共同转化于大肠杆菌 BL21(DE3)体内. 用含有卡那霉素、氯霉素和链霉素的平板进行筛选.

1.5 蛋白质的表达与纯化

表达载体 pET30a(+) 和 pETDuet-1 的 T7 启动子下游均含有 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 端都带有组氨酸标签, 故可采用亲和层析法进行提纯.

将含三种质粒的 *E. coli* BL21 菌液接种在 250 ml LB 培养基中, 37°C 培养至 $A_{600}=0.5\sim 0.6$, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 摇床速率为 150 r/min, 20°C 过夜诱导表达, 离心 5 min (6 500 r/min, 4°C)

收集细胞, 蒸馏水洗 1 次, -20°C 保存. 将冻存的细胞重悬于 6 ml 柱平衡洗脱液, 超声 100 次(功率 200 W), 离心 15 min ($12\ 000\ g$, 4°C) 取上清, 弃去沉淀, 重组蛋白上清液采用 Ni^{2+} 螯合层析柱纯化. 洗脱杂蛋白采用含 50 mmol/L 咪唑的柱平衡洗脱液、收集色素蛋白采用含 500 mmol/L 咪唑的柱平衡洗脱液. 过柱提纯的产物用透析液(0.5 mol/L NaCl, 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 7.2)透析过夜, 以除去小分子杂质.

1.6 光谱测定与尿素变性

对色素蛋白上清液和层析柱提纯的产物进行吸收光谱和荧光光谱测定, 取部分透析后的产物用酸性尿素(8 mol/L, pH 2.0)变性, 测定变性后色素蛋白的吸收光谱.

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 300~800 nm, 扫描速度 960 nm/min, 狭缝宽度 1.0 nm. 荧光光谱测定采用 LS-45 型荧光光谱仪(Perkin-Elmer), 光谱扫描速度 500 nm/min, 狭缝宽度 10.0 nm.

1.7 SDS-PAGE 与色素蛋白锌电泳

取提纯产物, 加入终浓度为 10% 三氯乙酸, 于 -20°C 放置 15 min, 使提纯的蛋白质沉淀. 沉淀用丙酮洗 3 次, 晾干后加入上样缓冲液和巯基乙醇(9:1), 100°C 煮沸 5 min, 离心后, 各样品取等量上清进行 SDS-PAGE. 电泳完毕后, 于室温下将电泳凝胶用 1.5 mol/L 醋酸锌溶液浸泡 15 min, 在 280 nm 紫外灯下检测并照相^[7]. 之后用考马斯亮蓝 R250 染色液进行染色, 脱色后进行扫描.

1.8 圆二色光谱(CD)分析

为了排除咪唑在 CD 测量的干扰, 将提纯收集的样品用透析缓冲液(20 mmol/L KPB, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.2)透析 3 次, 然后收集样品和透析缓冲液, 以透析缓冲液为参照, 测样品的 CD, 考虑到 ApcD 与色素的连接及蛋白质二级结构的影响, 同时测提纯后色素蛋白 PCB-ApcD 的可见光和紫外光部分的 CD. 圆二色光谱用 Jasco 810 型圆二色光谱仪测定, 可见 CD 光谱扫描范围 300~800 nm, 狭缝宽度为 1.0 nm, 扫描速度为 50 nm/min, 响应时间 8.0 s, 扫描次数为 1 次, 紫外 CD 光谱扫描范围 200~300 nm, 狭缝宽度为 0.5 nm, 扫描速度为 1 000 nm/min, 点响应时间 0.5 s, 扫描次数为 4 次.

2 结 果

2.1 野生型 ApcD 体内重组的光谱检测

如图 1 所示, ApcD 重组产物在提纯前上清液的最大吸收波长为 605 nm 左右, 最大荧光发射峰为 633 nm 左右, 而提纯后重组产物的最大吸收波长为 650 nm 左右, 最大荧光发射峰为 665 nm 左右, 较提纯前发生明显的红移.

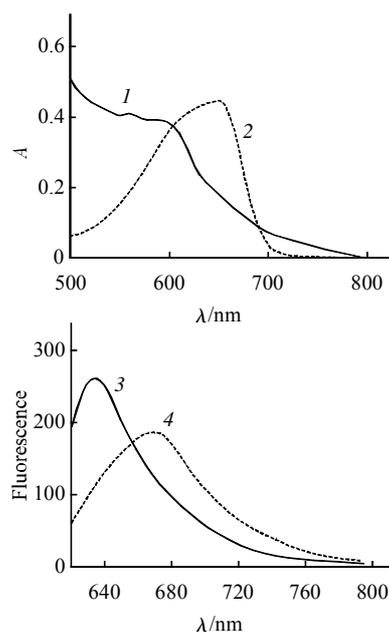


Fig. 1 Absorption and fluorescence spectra of reconstituted products in *E. coli*

1: Absorption spectrum of PCB-ApcD before purification; 2: Absorption spectrum of PCB-ApcD after purification; 3: Fluorescence spectrum of PCB-ApcD before purification; 4: Fluorescence spectrum of PCB-ApcD after purification.

2.2 野生型 PCB-ApcD 色素蛋白变性实验结果

从图 2 可以看到, 紫外可见光谱检测变性后的色素蛋白, 其最大吸收峰在 660 nm 左右, 证明连

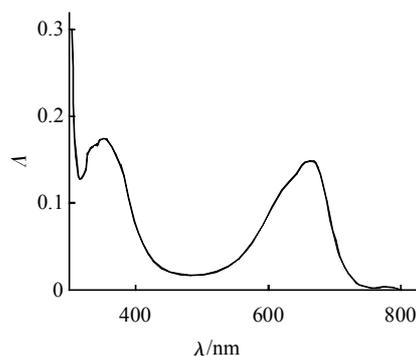


Fig. 2 Absorption spectrum of reconstituted product *in vivo* after denaturation by urea

接的色素为 PCB[®], 色素 PCB 的种类和性质没有被破坏, PCB 在提纯的过程中未被氧化.

2.3 突变体的克隆、表达和鉴定

构建得到的突变体质粒 pBlue-*apcD* (W59Q) 用 *Sma* I 和 *Xho* I 双酶切检测得到大小为 499 bp 的基因片段, 用突变位点所设计的相应酶切位点来单酶切检测, 得到单条带的片段, 与预期结果一致, 如图 3a 所示. 其他 7 个定点突变体的构建及检测片段大小同 pBlue-*apcD* (W59Q).

突变体基因 *apcD* (W59Q) 分别以大肠杆菌 BL21 为宿主菌进行表达, 目的蛋白 ApcD (W59Q) 的分子质量为 17.8 ku, pET 30a(+) 表达载体的 T7 启动子下游有 6 个组氨酸的密码子和相应的酶切位点, 产生的融合蛋白相应增加了 5.1 ku, 得到总蛋白大小为 22.9 ku. 表达产物通过 SDS-PAGE, 目的蛋白的大小与预期相吻合, 如图 3b 所示. 其他 7 个定点突变体的构建及检测蛋白大小同 pET-*apcD* (W59Q).

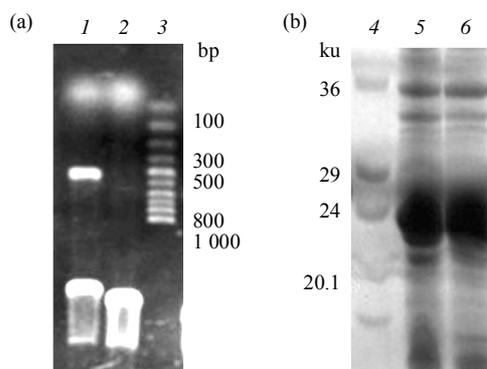


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis(a) and SDS-PAGE(b) of pBlue-*apcD*(mutant)

1: pBlue-*apcD*(W59Q) digested by two enzymes; 2: pBlue-*apcD*(W59Q) digested by single enzyme; 3: DNA ladder; 4: Protein molecular mass standard; 5: Protein from ApcD (wild type); 6: Protein from ApcD (W59Q).

2.4 色素蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳与锌电泳结果

通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 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 PCB-ApcD (W59Q) 和

PCB-ApcD, 如图 4a、4b, 图 4b 中 3、4 泳道目的蛋白下的条带可能是由于提纯过程中混有的小分子杂蛋白所致. 其他 7 个定点突变体的色素蛋白锌电泳同 PCB-ApcD (W59Q).

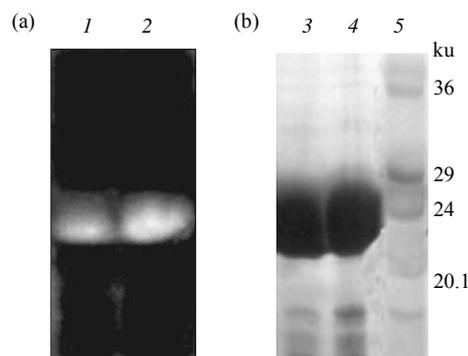


Fig. 4 Zn^{2+} electrophoresis (a) and SDS-PAGE (b) of PCB-ApcD and PCB-ApcD(W59Q)

1: PCB-ApcD(W59Q) stained by Zn^{2+} ; 2: PCB-ApcD stained by Zn^{2+} ; 3: Protein from PCB-ApcD; 4: Protein from PCB-ApcD(W59Q); 5: Protein molecular mass standard.

2.5 突变体的体内重组光谱检测

如图 5 及表 2 所示, ApcD (Y88I) 重组色素蛋白在提纯后的吸收光谱和荧光光谱均多出一个峰, 分别为 668 nm, 690 nm, 多出的这两个峰的位置较 ApcD 重组色素蛋白在提纯后的红移更为明显, 可见该位置的氨基酸可能引起了 ApcD 结构的变化, 对蛋白质构象产生的影响在所构建的 8 个突变体中最大, 与 ApcD 相比较, ApcD (Y88I) 重组色素蛋白的摩尔消光系数没有明显差异, 荧光量子产率却大大降低, 可见该位点的氨基酸对蛋白质的荧光发射能力也产生了一定的影响. 而 ApcD (W59Q)、ApcD (Y73A)、ApcD (W87E) 色素蛋白在提纯前后的吸收光谱和荧光光谱没有发生变化, 可见第 59 位色氨酸、73 位酪氨酸、87 位色氨酸对 ApcD 重组色素蛋白在提纯前后的吸收光谱和荧光光谱影响较大, 这些氨基酸的存在也可能引起了蛋白质结构的变化, 从而导致重组蛋白的构象发生改变; 在摩尔消光系数及荧光量子产率方面, ApcD (W59Q) 色素蛋白的荧光量子产率较 ApcD 有明显降低外, ApcD (Y73A)、ApcD (W87E) 色素蛋白的荧光量子产率均较 ApcD 有明显提高, 可见这 3 个位点的氨基酸对蛋白质的荧光发射能力也产生了影响. ApcD (M126S)、ApcD (Y116S)、ApcD (M160T) 色素蛋白在提纯前后的吸收光谱没有发生变化, 而

荧光峰的位置较提纯前分别红移了 5 nm、7 nm 和 10 nm, 可见 116 位酪氨酸、126 位甲硫氨酸及第 160 位甲硫氨酸对 ApcD 的结构也有一定的影响, 只是影响程度不及前述的 4 个位点的氨基酸, 这 3 个氨基酸突变体的色素蛋白的荧光量子产率较 ApcD 有所降低, 但下降程度不及前 4 个位点突变

体. ApcD(M115I) 色素蛋白在提纯前后的吸收光谱和荧光光谱均发生了红移, 从提纯前的 605 nm 和 633 nm 变化到提纯后的 638 nm 和 655 nm, 红移程度不及 ApcD 那么明显, ApcD(M115I) 色素蛋白的荧光量子产率较野生型有明显降低, 对重组产物的荧光发射产生了影响.

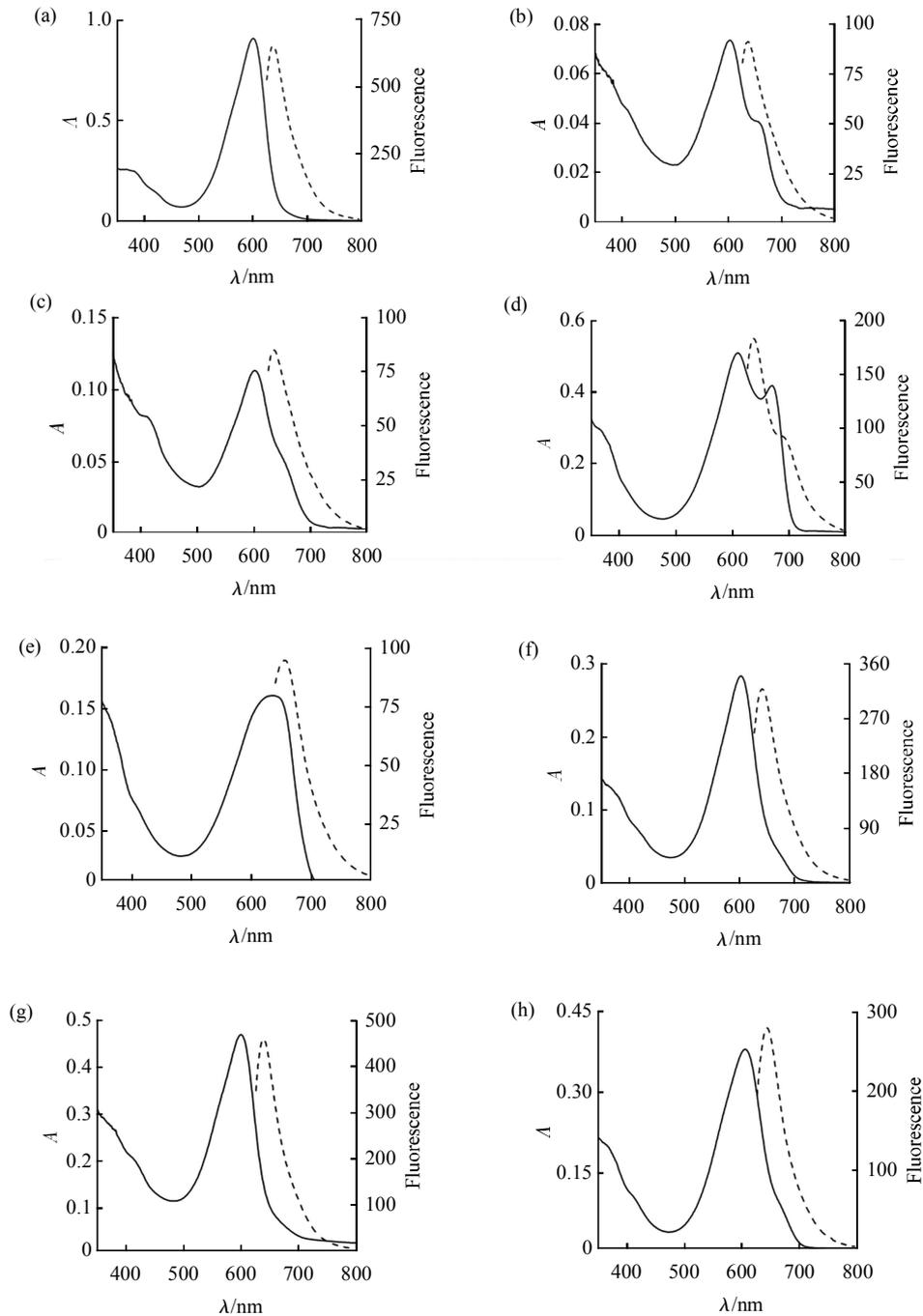


Fig. 5 Absorption and fluorescence spectra of PCB-ApcD (mutants)

(a) PCB-ApcD (W59Q). (b) PCB-ApcD (Y73A). (c) PCB-ApcD (W87E). (d) PCB-ApcD (Y88I). (e) PCB-ApcD (M115I). (f) PCB-ApcD (Y116S). (g) PCB-ApcD (M126S). (h) PCB-ApcD (M160T). (—) Absorption spectrum after purification; (---) Fluorescence spectrum after purification.

Table 2 Quantitative absorption and fluorescence data of the mutagenesis

Chromoprotein (after purification)	Absorption data		Fluorescence data	
	λ_{\max}	ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)	λ_{\max}	ϕ_f (Quantum yield)
PCB-ApcD	650	$62\,000 \pm 4\,000$	663	0.074 ± 0.002
PCB-ApcD (W59Q)	600	$78\,050 \pm 600$	635	0.040 ± 0.005
PCB-ApcD (Y73A)	602, 660	$91\,062 \pm 928$	635	0.205 ± 0.005
PCB-ApcD (W87E)	602	$100\,639 \pm 6\,000$	635	0.215 ± 0.035
PCB-ApcD (Y88I)	607, 668	$70\,161 \pm 800$	636, 690	0.045 ± 0.005
PCB-ApcD (M115I)	638	$63\,635 \pm 1\,800$	655	0.050 ± 0.000
PCB-ApcD (Y116S)	601	$55\,521 \pm 200$	640	0.095 ± 0.005
PCB-ApcD (M126S)	600	$71\,798 \pm 1\,700$	638	0.070 ± 0.010
PCB-ApcD (M160T)	605	$77\,987 \pm 900$	643	0.100 ± 0.009

2.6 突变体色素蛋白变性试验结果

如图 6 所示, PCB-ApcD (W59Q) 重组色素蛋白经过酸性尿素变性后, 经紫外可见光谱检测, 其最大吸收峰在 662 nm, 可见重组蛋白中色素 PCB 的种类和性质没有被破坏. 其余 7 个突变体的酸性尿素变性结果同 PCB-ApcD (W59Q).

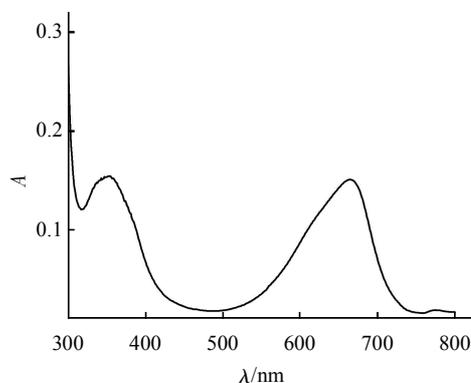


Fig. 6 Absorbance spectrum of PCB-ApcD (W59Q) after denaturation by urea

2.7 圆二色谱分析

如 PCB-ApcD 紫外部分的 CD 图谱(图 7b)所示, 所得到产物的二级结构为 α 螺旋, 与天然藻胆蛋白相符. 从图 7a、图 8a、图 9a 可以看出, PCB-ApcD (Y116S) 及 PCB-ApcD (M160T) 的可见光部分 CD 较 ApcD 都有一定程度的变化. ApcD 可见光部分 CD 中 663 nm 处的峰在 PCB-ApcD (Y116S) 及 PCB-ApcD (M160T) 中消失, 而 PCB-ApcD (Y116S)

及 PCB-ApcD (M160T) 在 600 nm 处产生一个峰, 并且与 ApcD 可见光部分 CD 中该峰的表现方向相反. 可见这两个氨基酸突变体均对脱辅基蛋白所连接的色素构象产生了一定的影响. 如图 8b、图 9b 所示, PCB-ApcD (Y116S) 及 PCB-ApcD (M160T) 紫外部分的 CD 图与 PCB-ApcD 基本一致, 所得到产物的二级结构主要为 α 螺旋, 与天然藻胆蛋白相同.

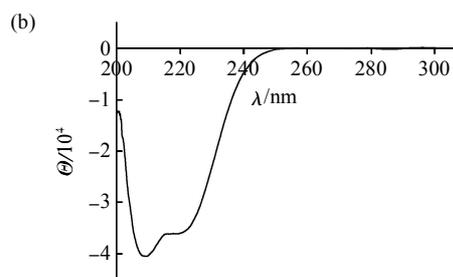
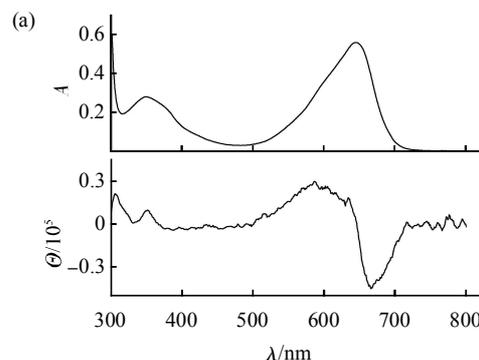


Fig. 7 CD spectra of PCB-ApcD

(a) Vis-CD spectra of PCB-ApcD. (b) UV-CD spectra of PCB-ApcD.

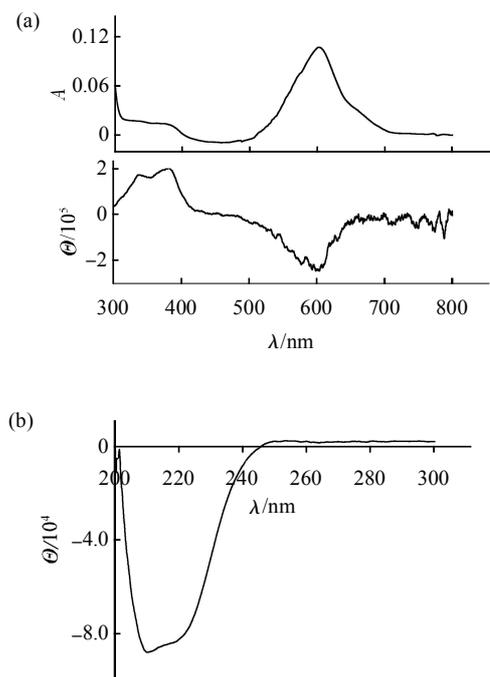


Fig. 8 CD spectra of PCB-ApcD (Y116S)
(a) Vis-CD spectra of PCB-ApcD (Y116S). (b) UV-CD spectra of PCB-ApcD (Y116S).

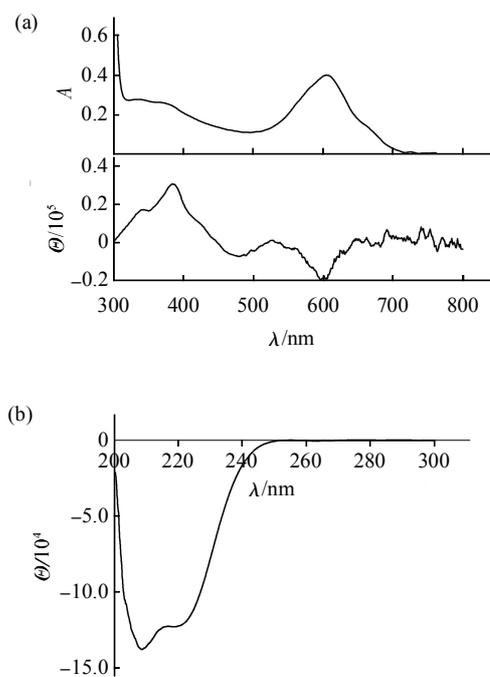


Fig. 9 CD spectra of PCB-ApcD (M160T)
(a) Vis-CD spectra of PCB-ApcD (M160T). (b) UV-CD spectra of PCB-ApcD (M160T).

3 讨 论

ApcD 重组色素蛋白的光谱在提纯前后发生了明显红移, 提纯前的最大吸收波长为 605 nm, 最大荧光发射峰为 633 nm, 提纯后的最大吸收波长变为 650 nm, 最大荧光发射峰变为 665 nm, 而从色素蛋白变性实验的结果来看, PCB 的种类和性质没有被破坏。

为了找出 ApcD 在提纯前后吸收光谱及荧光光谱发生红移的原因, 通过 BLAST 软件进行相似性蛋白质搜索^[9]和序列对比软件 CLUSTALW^[10]的蛋白质同源性比较, 对该脱辅基蛋白上第 59 位色氨酸 (Trp)、73 位酪氨酸 (Try)、87 位色氨酸 (Trp)、88 位酪氨酸 (Try)、115 位甲硫氨酸 (Met)、116 位酪氨酸 (Try)、126 位甲硫氨酸 (Met) 及第 160 位甲硫氨酸 (Met) 进行了定点突变, 得到了突变体 ApcD (W59Q)、ApcD (Y73A)、ApcD (W87E)、ApcD (Y88I)、ApcD (M115I)、ApcD (Y116S)、ApcD (M126S) 和 ApcD (M160T), GorIV 分析显示, 上述突变后的谷氨酰胺 (Gln)、丙氨酸 (Ala)、谷氨酸 (Glu)、异亮氨酸 (Ile)、丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr) 对蛋白质二级结构的影响很小, 不会对重组结果产生影响, 这样, 本工作所展示的蛋白质结构变化应该是构象和聚集态方面的差异。

各突变体的体内重组产物的光谱结果显示: ApcD (Y88I) 重组产物的光谱性质变化最大, 其在提纯后的吸收光谱和荧光光谱均多出一个峰, 分别为 668 nm, 690 nm, 多出的这两个峰的位置较 ApcD 重组色素蛋白在提纯后的红移更为明显; 而 ApcD (W59Q)、ApcD (Y73A)、ApcD (W87E) 重组产物的光谱在提纯前后并未发生像 ApcD 重组产物的光谱红移; ApcD (M126S)、ApcD (Y116S) 和 ApcD (M160T) 重组产物的吸收光谱在提纯前后没有发生变化, 只是荧光峰在提纯后较提纯前有较小的红移, 分别红移了 5 nm、7 nm 和 10 nm; ApcD (M115I) 重组产物的光谱在提纯前后也像 ApcD 重组产物一样发生了较大红移, 只是红移程度不及野生型, 提纯前的最大吸收峰 605 nm 和最大荧光峰 633 nm 变为提纯后的 638 nm 和 655 nm。

选取了比较有代表性的突变体重组产物 PCB-ApcD (Y116S) 及 PCB-ApcD (M160T), 测定其圆二色光谱, 从光谱分析结果可以看出, 它们的可

见光部分 CD 较 PCB-ApcD 产生了明显的变化, 表明该两个氨基酸突变体均对脱辅基蛋白所连接色素的构象产生了一定影响; 而从紫外光部分的 CD 图可见, PCB-ApcD(Y116S)及 PCB-ApcD(M160T)与 PCB-ApcD 基本一致, 所得到产物的二级结构主要为 α 螺旋, 与天然藻胆蛋白相同。

综上所述, 通过分析比较所构建的 8 个突变体内重组产物的光谱结果发现, 该 8 个氨基酸的突变, 均对 *Anabaena* sp. PCC7120 别藻蓝蛋白 α 亚基 ApcD 体内重组蛋白中脱辅基蛋白所连接色素的构象产生了影响, 只是不同氨基酸的影响程度不同, 影响程度由高到低可做如下排列: ApcD (Y88I) > ApcD (W59Q)、ApcD (Y73A)、ApcD (W87E) > ApcD (M126S) > ApcD (Y116S) > ApcD (M160T) > ApcD (M115I)。同样地, 从重组蛋白的荧光量子产率来看, 各突变体重组产物的荧光量子产率较 ApcD 也有不同程度地升高或降低, 对重组产物的荧光发射产生了不同程度的影响。

参 考 文 献

- [1] Glazer A N. Light-harvesting by phycobilisomes. *Ann Rev Biophys Chem*, 1985, **14**: 47-77
- [2] Zhao K H, Su P, Scheer H, *et al.* Chromophore attachment to phycobiliprotein β -subunits phycocyanobilin: Cysteine- β 84 lyase activity of CpeS-like protein from *Anabaena* sp. PCC7120. *J Biol Chem*, 2006, **281**(13): 8573-8581
- [3] T. Migita C, Zhang X H, Yoshida T, *et al.* Expression and characterization of Cyanobacterium heme oxygenase, a key enzyme in the phycobilin synthesis. *Eur J Biochem*, 2003, **270**(4): 687-698
- [4] Frankenberg N, Lagarias J C. Phycocyanobilin: ferredoxin oxidoreductase of *Anabana* sp. PCC 7120. *J Biol Chem*, 2003, **3**(14): 9219-9226
- [5] Landgraf F T, Forreiter C, Picó A H, *et al.* Recombinant holophytochrome in *E. coli*. *FEBS Letters*, 2001, **508**(23): 459-462
- [6] Sarkar G, Sommer S S. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques*, 1990, **8**(4): 404-407
- [7] Shim C M, Yang J Y, Kang S S, *et al.* Chromophore-apoprotein interactions in *Synechocystis* sp. PCC6803 phytochrome Cph. *Biochemistry*, 2000, **39**(21): 6349-6356
- [8] 宋 波, 朱菁萍, 周 明, 等. 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): 344-348
Song B, Zhu Q P, Zhou M, *et al.* *J Fish Biology*, 2004, **28**(4): 344-348
- [9] NCBI BLAST program reference: Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(17): 389-3402
- [10] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J, *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(22): 4673-4680

Site-directed Mutagenesis of ApcD of Core Subunit and Their Spectral Study*

WANG Xing¹⁾, ZHANG Qian¹⁾, YANG Bei¹⁾, ZHAO Kai-Hong^{1,2)}, ZHOU Ming^{2,3)**}

¹⁾ College of Environment Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

²⁾ State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430074, China;

³⁾ HZAU Biomass and Bioenergy Research Centre, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract Absorption and fluorescence spectra of the chromoprotein changed during the ApcD of core subunit from *Anabaena* sp. PCC 7120 bound PCB with reconstitution in *E. coli*, the λ_{\max} of absorption and fluorescence spectra were 605 nm and 633 nm before purification, while the λ_{\max} of absorption and fluorescence spectra were 650 nm and 665 nm after purification. To study the phenomenon above, eight mutants were constructed. It is indicated with reconstitution in *E. coli* that: the mutant ApcD (Y88I) had one more absorbance and fluorescence peaks after purification, the λ_{\max} of absorption and fluorescence spectra were 668 nm and 690 nm. The spectra of ApcD (W59Q), ApcD (Y73A), ApcD (W87E) had no change during the purification. The absorption spectra of ApcD (M126S), ApcD (Y116S), ApcD (M160T) had no change during the purification, but the fluorescence spectra had red shifts by 5 nm, 7 nm and 10 nm after purification, respectively. The λ_{\max} of absorption and fluorescence spectra of ApcD (M115I) had changed from 605 nm and 633 nm to 638 nm and 655 nm. Under acidic urea conditions, those chromoproteins had maximal absorption at 662 nm, indicating that they had PCB chromophore. Under the study of CD spectra of PCB-ApcD, PCB-ApcD (Y116S) and PCB-ApcD (M160T), the two mutants influenced the conformation of chromophore which bound with apoprotein, but not affected the secondary structure of the reconstitution proteins.

Key words ApcD, site-directed mutagenesis, reconstitution *in vivo*

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00599

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30870519, 30870541) and The Research Fund of Higher Education Doctor Discipline Point (20060487018).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-87284301, E-mail: happyhundun@tom.com

Received: October 14, 2009 Accepted: January 25, 2010