

利用多功能裂合酶 CpcE/F 合成非天然重组藻胆蛋白

吝晓君¹, 王祥法¹, 葛保胜¹, 秦松²

(1. 中国石油大学(华东) 生物工程中心, 山东 青岛 266580; 2. 中国科学院 烟台海岸带可持续发展研究所, 山东 烟台 264003)

摘要: 藻胆蛋白裂合酶是催化藻胆色素与脱辅基藻胆蛋白亚基共价连接的裂合酶, 在藻胆蛋白的生物合成途径中发挥着重要作用。本实验以藻蓝蛋白裂合酶 CpcE/F 为研究对象, 采用基因工程组合表达技术, 构建了 pCDFDuet-*apcA-cpcE/F-hox1-pebS*、pCDFDuet-*pecA-cpcE/F-hox1-pebS* 等重组质粒, 并导入大肠杆菌中, 在 IPTG 的诱导下, 成功表达得到两种非天然藻胆蛋白 ApcA-PEB 和 PecA-PEB, 这表明 CpcE/F 不仅可以催化藻蓝胆素和脱辅基藻蓝蛋白的结合, 还可以催化藻红胆素(PEB)与别藻蓝蛋白 α -亚基(ApcA)和藻红蓝蛋白 α -亚基(PecA)的结合, 因此是一种多功能的裂合酶。根据重组产物的光谱特征峰分析发现, ApcA-PEB 和 PecA-PEB 作为两种非天然存在的重组藻胆蛋白, 具有与对应天然藻胆蛋白有着相近的特征吸收光谱和荧光发射峰, 但同时具有明显的波长偏移并伴有色素异化现象, 其光谱学性质主要由其所携带的色素基团决定。另外, 荧光寿命衰减分析发现, 不同脱辅基蛋白对于重组藻胆蛋白的光谱稳定性具有重要的影响。

关键词: 藻胆蛋白; 生物合成; 非天然; CpcE/F 裂合酶

中图分类号: Q784

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2017)03-0068-07

DOI: 10.11759/hyxx20160512001

藻胆蛋白是存在于蓝藻和红藻中一类重要的捕光色素蛋白。根据色基的种类及其与蛋白质的相互作用, 藻胆蛋白可分为: 藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白^[1]。近年的研究表明, 藻胆蛋白除了参与光合作用外, 还具有抗氧化、抗肿瘤、消炎等生物功效^[2-5], 并且作为优良的荧光探针已被广泛应用于免疫荧光检测等领域^[6-7]。

藻胆蛋白裂合酶是催化藻胆色素与脱辅基藻胆蛋白亚基共价连接的裂合酶, 在藻胆蛋白的生物合成途径中发挥着重要作用^[8-10]。其中 CpcE/F 是催化藻蓝胆素和脱辅基藻蓝蛋白亚基连接的裂合酶^[11-14]。研究发现 CpcE/F 可以催化不同色素基团连接到脱辅基藻蓝蛋白亚基上^[15-16], 但目前对于 CpcE/F 是否为一种真正的多功能裂合酶, 可以催化不同色素和不同脱辅基蛋白的连接, 尚不太清楚。该问题的解析将为进一步阐明藻胆蛋白的生物合成机理, 人工合成并改造藻胆蛋白荧光分子奠定重要的理论基础。

本文以藻蓝蛋白裂合酶 CpcE/F 为研究对象, 构建了 pCDFDuet-*apcA-cpcE/F-hox1-pebS*、pCDFDuet-*pecA-cpcE/F-hox1-pebS* 等重组质粒, 并导入大肠杆菌中, 采用基因工程组合表达技术, 重组表达得到两种非天然的藻胆蛋白 ApcA-PEB 和 PecA-PEB, 根

据重组产物的光谱特征峰分析发现, ApcA-PEB 和 PecA-PEB 均具有与天然藻胆蛋白相近的特征吸收光谱和荧光发射峰, 同时伴有一些色素异化现象和波长偏移。色素蛋白的 SDS-PAGE 电泳经醋酸锌染色后, 在紫外光照射下发出荧光, 证明色素与蛋白的连接方式为共价偶联, 从而证明 CpcE/F 确实是一种多功能裂合酶, 具有催化合成多种非天然藻胆蛋白的应用潜力。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

E. coli BL21(DE3)、DH5 α 感受态细胞购自天根生物工程公司。DNA 回收试剂盒为天根生物工程公

收稿日期: 2016-05-12; 修回日期: 2016-11-24

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2014AA093505); 国家自然科学基金项目(No. 41176144)

[Foundation: National High Technology Research and Development Program of China (863 project) (No. 2014AA093505); national natural science fund project (No. 41176144)]

作者简介: 吝晓君(1992-), 女, 山东聊城人, 硕士, 主要从事藻胆蛋白的生物合成及人工进化, 电话: 0532-86981132, E-mail: xiaojunlin81@126.com; 葛保胜, 通信作者, 电话: 0532-86981132, E-mail: ggester@126.com

司产品, DNA 限制性内切酶和 Taq 酶、T4 DNA 连接酶等均为 TaKaRa 产品。

1.2 构建重组质粒

根据 NCBI 中集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中别藻蓝蛋白 α -亚基基因(*apcA*, Genebank: CP012832.1)和亚铁血红素氧合酶基因(*hox1*, GenBank: CP012832.1), 念珠藻 *Nostoc* sp. PCC 7120 中藻红蓝蛋白 α -亚基

因(*pecA*, Genebank: BA000019.2)和藻红素铁氧还蛋白还原酶基因(*pebS*, GenBank: BA000019.2), 以及顿顶螺旋藻中藻蓝蛋白裂合酶基因(*cpcE/F*, GenBank: DQ453478.1)序列, 设计适当引物(表 1), 经 PCR 扩增后, 克隆到质粒 pCDFDuet-1 的适当位点(图 1), 得到重组质粒 pCDFDuet-*apc-cpcE/F-hox1-pebS* 和 pCDFDuet-*pecA-cpcE/F-hox1-pebS*, 将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单克隆, 经测序验证正确后备用。

表 1 重组载体构建过程中所使用的引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in the construction of recombinant vectors

引物名称	引物序列
<i>apcA</i>	F: 5'-GCGGATCCGATGAGTATCGTCACGAAATC-3' R: 5'-ATGAGCTCCTAGCTCATTTTTCCGAT-3'
<i>pecA</i>	F: 5'-GCGGATCCGATGAAAACACCTTTGACC-3' R: 5'-ATGAGCTCTTAACTTAAAGCGTTAATTGCA-3'
<i>cpcE/F</i>	F: 5'-TCGAGCTCATGCAGGATTCTGAATCA-3' R: 5'-ATGCGGCCGCATGCAGGATTCTGAATC-3'
<i>hox1</i>	F: 5'-TACATATGAGTGTCAACTTAGCTTCCCAG-3' R: 5'-CCGATATCCTAGCCTTCGAGGTTGGC-3'
<i>pebS</i>	F: 5'-TGGATATCGATGACGAAGAACCCGCGT-3' R: 5'-GACTCGAGTTACTTGTAGGAGAACAGAA-3'

*注: 表中下划线部分为限制性内切酶酶切位点

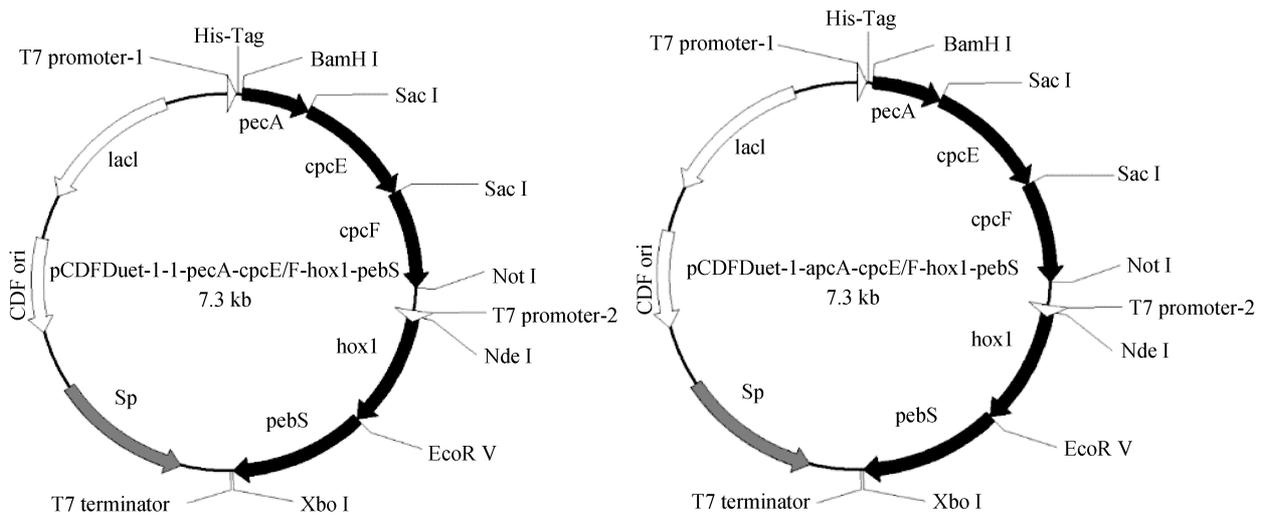


图 1 重组质粒 pCDFDuet-*apcA-cpcE/F-hox1-pebS* 和 pCDFDuet-*pecA-cpcE/F-hox1-pebS* 的构建示意图

Fig. 1 Recombinant plasmid schematic diagrams of pCDFDuet-*apc-cpcE/F-hox1-pebS* and pCDFDuet-*pecA-cpcE/F-hox1-pebS*

1.3 重组色素蛋白的表达与纯化

重组色素蛋白以大肠杆菌 BL21 为宿主细胞进行表达。在含有 50 μ g/mL 壮观霉素的 TB 培养基中, 首先 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600} =0.8~1.0, 降温至 18 $^{\circ}$ C, 然后加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 18~20 h 后, 离心收集细胞, -20 $^{\circ}$ C 保存。纯化时, 将冻存的细胞

重新悬于 PBS 缓冲液中, 并加入终浓度为 0.5 mmol/L 的蛋白酶抑制剂 PMSF 及溶菌酶(0.05 g/100 mL 悬浮液)使用高压细胞破碎仪在 1 000~1 500 bar 压力下进行破碎, 破碎液经 12 000 g 离心 30 min, 取上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤。因表达载体 pCDFDuet-1 中第一个 T7 启动子下游有 6 个组氨酸密码子, 故所表达重

组蛋白也带有 6×His 标签, 可以采用镍离子螯合层析柱进行纯化。

1.4 重组色素蛋白的光谱测定

天然的藻胆蛋白是捕光色素蛋白, 能够吸收特定波长的光。通过检测重组后的色素蛋白的光谱, 可以确定其色素的类型以及相关的物理特征。吸收光谱采用岛津 UV-2450 紫外可见光谱仪测定(扫描范围 400~700 nm, 狭缝宽 1 nm); 荧光光谱采用 HORIBA JY 公司的 FluoMax-4 荧光光谱仪测定($\lambda_{ex}=510$ nm, $\lambda_{em}=520\sim750$ nm, 扫描速度 1 nm/s, 狭缝宽度(E_x : 2 nm, E_m : 2 nm)。测定均在室温下进行。

1.5 SDS-PAGE 检测与锌离子染色

取提纯得到的色素蛋白溶液 18 μ L, 加入 7 μ L 上样缓冲液(5 μ L 溴酚蓝, 2 μ L 巯基乙醇), 混匀, 95 $^{\circ}$ C 热变性 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳分析(胶浓度为 10%)。电泳结束后, 电泳胶经醋酸锌溶液浸泡 5 min, 在紫外灯下成像检测, 然后再用考马斯亮蓝染色, 脱色并用 Alpha 凝胶成像仪成像。

1.6 重组色素蛋白的荧光衰减动力学测定

重组色素蛋白的荧光稳定性在 FluoMax-4 荧光光谱仪(HORIBA JY)上进行。荧光衰减动力学检测条件为: 激发波长 $\lambda_{ex}=510$ nm, 检测波长 $\lambda_{em}=575$ nm, 狭缝宽度 E_x 为 2 nm, E_m 为 2 nm, 采样间隔为 120 s/次。检测在室温条件下进行。

2 结果

2.1 重组色素蛋白的纯化

将含有 pCDFDuet-*apcA-cpcE/F-hox1-pebS* 和 pCDFDuet-*pecA-cpcE/F-hox1-pebS* 两种重组质粒的大肠杆菌经 IPTG 诱导表达以后, 菌体呈现橙红色, 表明 PEB 色素被成功表达。菌体收集后, 4 $^{\circ}$ C 经高压细胞破碎仪破碎并离心, 细胞上清液经过镍离子亲和层析柱纯化, 得到的重组蛋白样品, 蛋白样品呈现亮红色, 可以判定藻红胆素(PEB)与脱辅基蛋白 ApcA 和 PecA 成功连接。

由于文献报道 ApcA 具有自催化作用^[17], 可以靠自身催化作用偶联 PCB, 从而形成 ApcA-PCB。为了验证上述连接是自催化作用的结果, 还是源于裂合酶 CpcE/F 的催化作用, 我们重新构建了不含 CpcE/F 的对照质粒 pCDFDuet-*apcA-hox1-pebS* 和 pCDFDuet-*pecA-hox1-pebS*, 并转入大肠杆菌内进行

表达。结果发现, 尽管菌体呈现为橙红色, 但是经菌体破碎提取重组蛋白, 重组蛋白并没有显示红色, 红色组分主要集中于流穿液, 另有少部分非特异性吸附于色谱柱中。这表明, 菌体所显示的红色为藻红胆素表达的结果, 但是由于缺少 CpcE/F 的催化, 藻红胆素并没有与脱辅基蛋白 ApcA 和 PecA 相偶联。这也进一步说明了, ApcA 和 PecA 与 PEB 的连接是在 CpcE/F 的催化作用下形成的。

2.2 重组色素蛋白的 SDS-PAGE 蛋白电泳及锌染鉴定

将纯化后的重组色素蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测, 由图 3B 可以看出, 经过考马斯亮蓝染色, 两种重组蛋白在 19 kDa 有明显的条带, 这与带有 His tag 标签的 ApcA 和 PecA 的理论分子质量大小基本一致。经过一步镍亲和色谱纯化后, ApcA 的纯度可以达到 90%以上, PecA 的纯度略差, 在 75%~80%之间。根据藻胆色素可与 Zn^{2+} 形成螯合物, 在一定波长光激发下可以发射荧光的特性, 从而可以通过锌离子电泳鉴定藻胆色素与蛋白亚基的连接情况。由图 2A 可以看出, 在紫外光照射下, 锌电泳中重组蛋白条带发出橙红色荧光, 这证明在裂合酶 CpcE/F 体内催化下脱辅基蛋白 ApcA 与 PecA 均与色素成功地共

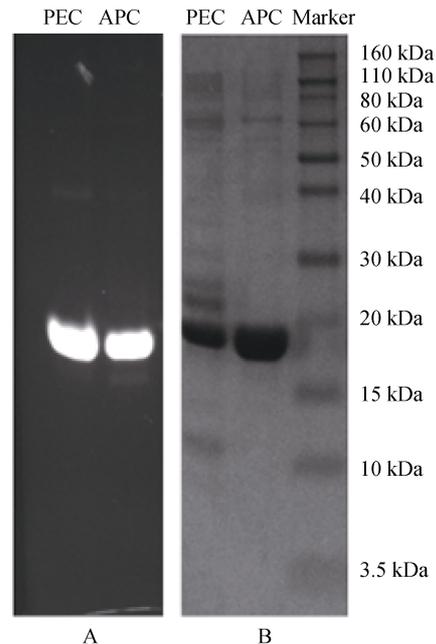


图 2 重组蛋白的 SDS-PAGE 谱图

Fig. 2 SDS-PAGE of recombinant proteins

A. 锌染的 SDS-PAGE 谱图; B. 考染的 SDS-PAGE 谱图
A. Zn^{2+} -induced fluorescence of recombinant proteins; B. Coomassie-stained

价偶联, 生成了 ApcA-PEB 和 PecA-PEB 重组色素蛋白分子。

2.3 重组蛋白的光谱测定与分析

将纯化后的 PecA-PEB 和 ApcA-PEB 两种色素蛋白交换到 PBS 溶液中, 利用吸收光谱和荧光光谱进行对比分析(图 3 和图 4)可以看出, 重组蛋白 PecA-PEB 在 497 nm 和 589 nm 处有两个典型的特征吸收峰, 在 564 nm 和 613 nm 处具有对应的特征荧光发射峰。这与天然藻红蓝蛋白在 500 nm 和 570 nm 处具有特征吸收类似, 但是本研究并未发现明显的可逆光致变换现象, 说明重组 PecA-PEB 虽然具有两个特

征吸收波长, 但是不具有可逆光致变换活性。对比光谱分析可知, 497 nm 处的吸收峰和 564 nm 的荧光发射峰, 应该是由 PEB 异构化生成的藻尿胆素 PUB 造成的, 而 589 nm 的吸收峰和 613 nm 的荧光发射峰应该归因于 PtvB^[17]。与天然 PecA(特征吸收峰在 500 nm 和 570 nm, 特征荧光发射峰在 520 nm 和 590 nm)和天然藻红蛋白(最大吸收峰在 565 nm, 荧光发射峰在 578 nm)相比, 重组 PecA-PEB 更接近于天然藻红蓝蛋白的光谱学性质, 但由于色素及其脱辅基蛋白微环境的变化, 本文中重组 PecA 的吸收和荧光发射均发生了显著的红移。

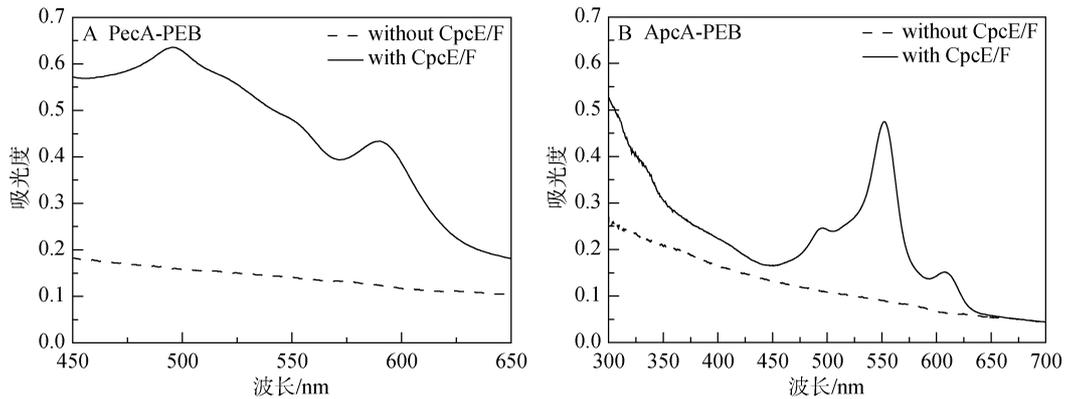


图 3 重组色素蛋白的吸收光谱

Fig. 3 Absorption spectra of recombinant proteins

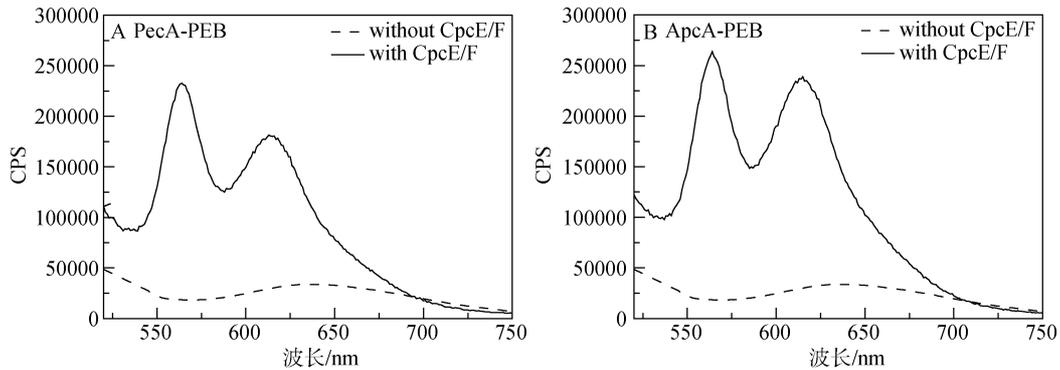


图 4 重组蛋白的荧光谱图

Fig. 4 Fluorescence spectra of recombinant proteins

天然的 ApcA 亚基蛋白应该结合 PCB 色素, 最大吸收在 645 nm, 最大荧光发射在 656 nm。本文中重组 ApcA-PEB 也是一种非天然的藻胆蛋白分子, 其在 552 nm 有最大吸收峰, 且在 496 nm 和 608 nm 处分别具有两个肩峰, 在 564 nm 和 615 nm 处有两个荧光发射峰。经分析可知, 496 nm 的吸收峰可能是由于 PEB 异构化所生成 PUB 的吸收, 608 nm 处的吸收

可能是 ApcA-PEB 所形成六聚体的吸收峰^[16]。552 nm 处的吸收峰为 ApcA 结合 PEB 的吸收峰。可以看出, 脱辅基蛋白 ApcA 在结合 PEB 后, 其吸收和荧光光谱也会发生很大的变化, 本文中构建的 ApcA-PEB 更接近于 R-PeA 的吸收和荧光等光谱学特征, 但是由于脱辅基蛋白微环境的变化以及重组色素的异构化, 使该色素蛋白的光谱也发生了一定的蓝移或红移现象。

由以上结果可以看出, CpcE/F 是一种多功能的裂合酶, 不仅可以催化 PCB 连接到藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白亚基上, 还可以催化 PEB 连接到别藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白亚基上, 从而生产一些非天然的藻胆蛋白分子, 该非天然藻胆蛋白分子可以具有与天然藻胆蛋白相近或截然不同的光谱学性质。但是需要指出的是, CpcE/F 作为一种多功能裂合酶, 对于催化 PEB 连接反应的时候, 特异性略差, 容易产生色素的异构化, 衍生出 PUB 或者 PtVB (phytyviolobilin)^[9]等色素, 从而导致了重组色素蛋白荧光峰和吸收峰的偏移。

2.4 重组蛋白的荧光稳定性分析

根据以上的实验结果表明, APC 和 PEC 均可共价结合 PEB, 形成荧光蛋白。但是它们在稳定性方面存在显著的差异。重组蛋白的稳定性是与其荧光强度相关的, 即稳定性越好, 那么其荧光强度越稳定。荧光寿命衰减动力学试验表明, 重组蛋白 ApcA-PEB 的光谱学稳定性明显优于 PecA-PEB(图 5)。在所测量的时间范围内, 色素蛋白 ApcA-PEB 的荧光强度几乎不变, 而 PecA-PEB 的荧光强度, 在前 2 500s 内, 迅速衰减, 随后衰减速率慢慢减小。从重组蛋白的表象来看, 随着时间的推移重组蛋白 ApcA-PEB 其颜色随着时间延长未发生明显变化, 在 4℃ 条件下可以存放数周, 颜色未见明显褪色。但是重组蛋白 PecA-PEB 的颜色随着时间的延长逐渐变浅, 即使在 4℃ 条件下, 3d 后即褪至无色或微红色。

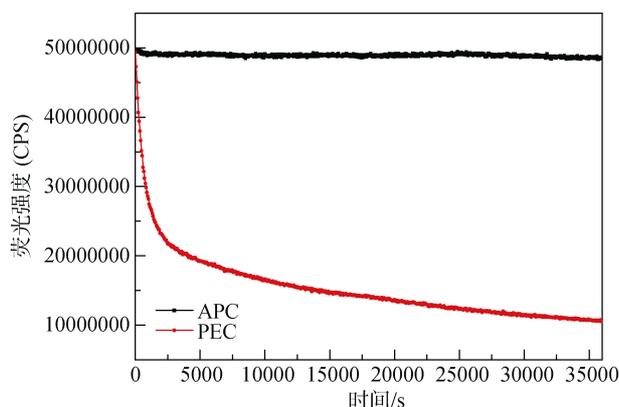


图 5 荧光衰减寿命分析图

Fig. 5 Diagram of the fluorescence decay of recombinant proteins

3 讨论

藻胆蛋白是一种重要的荧光探针分子, 已在荧光免疫检测中广泛应用。但天然藻胆蛋白主要有藻

红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白等几种, 种类及光谱学性质较为单一, 如果能通过基因工程或蛋白质工程手段生产一些具有优良光谱学性质的非天然藻胆蛋白, 那么就能大大拓宽这一重要荧光分子的应用范围。

随着藻类基因组学的发展, 对藻胆蛋白的生物合成途径的理解已经取得了重要进展。这使得利用基因工程技术生产重组藻胆蛋白成为可能, 并被迅速广泛应用。藻胆蛋白色素裂合酶主要催化脱辅基藻胆蛋白和藻胆色素的连接, 在藻胆蛋白的生物合成过程中发挥着重要的作用。CpcE/F 裂合酶最早被发现是应用于藻蓝胆素和藻蓝蛋白 α 亚基脱辅基蛋白的结合。前期, Alvey 等证明, CpcE/F 可以催化 CpcA 共价偶联不同的藻胆色素, 如 PEB, PCB, PUB, PVB 等^[18]。本实验结果表明 CpcE/F 裂合酶还可以催化脱辅基蛋白 ApcA 和 PecA 共价偶联藻红胆素 PEB, 形成具有特定光学性质的色素蛋白。由此可见, CpcE/F 是一种多功能裂合酶, 可以催化不同脱辅基蛋白和不同藻胆色素之间的共价偶联反应, 因此在利用藻胆蛋白基因工程获得新型藻胆蛋白分子方面具有广阔的应用前景。

本文中所制备的 ApcA-PEB 和 PecA-PEB 均为非天然藻胆蛋白, 其吸收光谱和荧光光谱与天然 ApcA 和 PecA 有显著的差异, 这为进一步构建新型非天然藻胆蛋白分子奠定了重要的基础。由于两种非天然藻胆蛋白分子脱辅基蛋白相差较大, 但是都带有 PEB 色素或异化色素, 从吸收光谱和荧光光谱来看, 它们所携带色素的光谱学性质更为接近, 这说明藻胆蛋白的光谱学性质主要取决于所偶联的色素基团, 但是脱辅基蛋白通过提供不同的色素微环境, 也会为该藻胆蛋白分子的光谱学性质造成显著的影响。通过对该两种色素蛋白的荧光衰减动力学分析, 发现两种色素蛋白的光谱学稳定性有很大差别。这表明不同脱辅基蛋白尽管对色素蛋白的光谱学性质没有决定性的作用, 但是它们通过提供不同的色素微环境, 可以对色素蛋白的光谱学稳定性产生重要影响。因此, 在将来藻胆蛋白基因工程改造新型藻胆蛋白分子过程需要综合考虑脱辅基蛋白和色素两方面的因素, 以期获得光谱学性质优良且光稳定性较好的荧光分子。

参考文献:

[1] Glazer A N. Phycobilinproteins-a family of valuable,

- widely used fluorophores[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1994, 6(2): 105-112.
- [2] 程超, 薛峰, 汪兴平, 等. 藻胆蛋白提取纯化及生理活性研究进展[J]. *食品科学*, 2012, 33(9): 251-259.
Cheng Chao, Xue Feng, Wang Xingping, et al. Research progress in extraction, purification and physiological activity of phycobiliprotein[J]. *Food Science*, 2012, 33(9): 251-259.
- [3] 林凡, 周小龙, 秦松, 等. 螺旋藻脱辅基异藻蓝蛋白的表达及其抗肿瘤活性的研究[J]. *福建中医药大学学报*, 2014, 24(4): 20-23.
Lin Fan, Zhou Xiaolong, Qin Song. Expression and Anti-tumor activity of apo-allophycocyanin in *Spirulina*[J]. *Journal of fujian university of traditional Chinese medicine*, 2014, 24(4): 20-23.
- [4] 杨立红, 王晓洁, 钟旭升, 等. 鱼腥藻藻蓝蛋白的抗氧化作用[J]. *食品科学*, 2006, 27(12): 208-212.
Yang Lihong, Wang Xiaojie, Zhong Xusheng, et al. Detecting the anti-oxidative effect of *Anabaena* Phycocyanin[J]. *Food Science*, 2006, 27(12): 208-212.
- [5] 夏冬, 孙军燕, 刘娜娜, 等. 藻蓝蛋白抗氧化作用及其药理活性研究进展[J]. *海洋科学*, 2015, 39(7): 130-135.
Xia Dong, Sun Junyan, Liu Nana, et al. Research progress of the antioxidant activity of phycocyanin and its application[J]. *Marine Sciences*, 2015, 39(7): 130-135.
- [6] Vernon T O, Glazer A N, Stryer L. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1982, 93(6): 981-986.
- [7] Mel N K, Paul D. Grossman. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates[J]. *Clinical Chemistry*, 1983, 29(9): 1582-1586.
- [8] Zhao K H, Wu D, Wang L, et al. Characterization of phycoviolobin phycoerythrocyanin α -84-cysteine-lyase-(isomerizing) from *Mastigocladus laminosus*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(18): 4524-4550.
- [9] Zhao K H, Wu D, Zhang L, et al. Chromophore attachment in phycocyanin: Functional amino acids of phycocyanobilin- α -phycocyanin lyase and evidence for chromophore binding[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2006, 273(6), 1262-1274.
- [10] Zhao K H, Deng M G, Zheng M, et al. Novel activity of a phycobiliprotein lyase: both the attachment of phycocyanobilin and the isomerization to phycoviolobin are catalyzed by the proteins PecE and PecF encoded by the phycoerythrocyanin operon[J]. *FEBS Letters*. 2000, 469(1): 9-13.
- [11] 衣俊杰. 螺旋藻藻蓝蛋白的自催化重组及藻蓝胆素裂合酶功能比较研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
Yi Junjie. Studies on autoassembly of phycocyanin of *Spirulina platensis* and functional comparison of some phycocyanobilin lyases[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010.
- [12] Fairchild C D, Glazer A N. Oligomeric structure, enzyme kinetics, and substrate specificity of the phycocyanin alpha subunit phycocyanobilin lyase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269 (12): 8686-8694.
- [13] Fairchild D, Zhao J, Zhou J, et al. Phycocyanin α -subunit phycocyanobilin lyase[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 1992, 89: 7017-7021.
- [14] 马圣媛, 王广策, 孙海宝, 等. 藻胆蛋白的研究概况. 蓝藻藻胆蛋白合成的分子机制及调控[J]. *海洋科学*, 2002, 26(8): 40-43.
Ma Shengyuan, Wang Guangce, Sun Haibao, et al. Outlines of studies on phycobiliproteins(III) The molecular mechanism and regulation of synthesis for phycobiliproteins from *Cyanobacteria*[J]. *Marine Sciences*, 2002, 26(8): 40-43.
- [15] 陈芳, 周明, 赵开弘, 等. 鱼腥藻 PCC 7120 藻蓝蛋白 α 亚基体内重组研究[J]. *武汉植物学研究*, 2006, 24(5): 387-391.
Chen Fang, Zhou Ming, Zhao Kaihong, et al. Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycocyanin holo- α subunit in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2006, 24(5): 387-391.
- [16] 李梅, 武栋, 周明, 等. 藻蓝蛋白裂合酶基因的表达与酶活性研究[J]. *华中科技大学学报*, 2004, 32(2): 77-79.
Li Mei, Wu Dong, Zhou Ming, et al. The expression of PcE/F of phycocyanin operon and the study of lyase PcE/F activity of *Mastigocladus laminosus*[J]. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 2004, 32(2): 77-79.
- [17] Yang Y, Ge B S, Guan X Y, et al. Combinational biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial holo- α -allophycocyanin in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30: 1001-1004.
- [18] Alvey R M, Biswas A, Schluchter W M, et al. Attachment of noncognate chromophores to CpcA of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus* sp. PCC 7002 by heterologous expression in *Escherichia coli*[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(22): 4890-4902.

Biosynthesis of unnatural phycobiliproteins using universal bilin lyase CpcE/F

LIN Xiao-jun¹, WANG Xiang-fa¹, GE Bao-sheng¹, QIN Song²

(Center for Bioengineering and Biotechnology, China University of Petroleum (east China), Qingdao 266580, China; Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Received: May 12, 2016

Key words: phycocyanobiliproteins; biosynthesis; unnatural; CpcE/F lyase

Abstract: Phycobilin lyase enzymes can attach phycobilins to their cognate apoproteins, which play an important role in the biosynthesis of phycobiliproteins. To verify the universal function of lyase cpcE/F, two recombinant plasmids: pCDFDuet-*apcA-cpcE/F-hox1-pebS* and pCDFDuet-*pecA-cpcE/F-hox1-pebS* were constructed using genetic engineering methods, and then two unnatural phycobiliproteins, ApcA-PEB and PecA-PEB, were successfully expressed in *Escherichia coli*, which indicated that cpcE/F could catalyze not only the ligation of PCB with different apoproteins, but also that of PEB and different apoproteins, and thus are universal bilin lyases. The absorption and fluorescence spectrum analysis showed that both unnatural proteins exhibit similar characteristic peaks to those of natural phycobiliproteins with some peaks of isomers and wavelength shifts, and their spectroscopic characteristics were mainly determined by the bilin type carried on them. Furthermore, different apoproteins could also regulate the absorption spectrum and show important influences on the photostability of phycobilins. Our work will provide important information to better understand the biosynthetic mechanism of the phycocyanobiliproteins and production of unnatural phycobiliproteins with a better fluorescence quality.

(本文编辑: 康亦兼)