

FNRD 在聚球藻 7002 中的表达及其性质研究

李荣贵¹ 于 昕² 赵进东²

(¹ 青岛大学生物系 青岛 266071) (² 北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘 要 :置于 Lac 启动子和 Kan 启动子控制之下的 *petHL* 基因分别转化蓝细菌 *Synechococcus* sp. PCC 7002, 从 Southern blot 分析结果推断, *petHL* 已整合到蓝细菌染色体 DNA 上。Western blot 分析表明, 转入蓝细菌体内的 *petHL* 基因得到了表达, 且 Kan 启动子启动该基因表达的效率高于 Lac 启动子。内源 FNRD 表现出与 FNR 全酶相同的稳定性。Triton X-114 相实验结果显示, 部分 FNRD 可进入 Triton X-114 相, 推测这些分子可能发生了脂酰化修饰。同时 FNRD 在体内可能参与了光合电子传递而使光合放氧速率增加。

关键词 : *Synechococcus* sp. PCC 7002, Fd : NADP⁺ 氧化还原酶, FNRD

中图分类号 : Q78 **文献标识码** : A **文章编号** : 0001-6209 (2005) 05-0716-04

Fd : NADP⁺ 氧化还原酶 (Fd : NADP⁺ Oxidoreductase EC1.18.1.2, 简称 FNR) 是光合生物体中广泛存在的一类黄素酶, 催化电子在光合电子传递链上的传递。不同生物来源的 FNR 表现出较高的同源性, 如菠菜 FNR 与螺旋藻的 FNR 约有 55% 的同源性, 但不同植物或同种植物不同品种的 FNR 在其 N-末端表现出相当大的差异性, 而 C-末端则保守的多^[1]。目前通过纯化得到的高等植物 FNR 单体的分子量约为 33 ~ 38kD, 而从蓝细菌中纯化的 FNR 或推测由 *petH* 编码的 FNR 的分子大小在 43 ~ 55kD 之间。比较高等植物与蓝细菌 FNR 的一级结构显示, 蓝细菌 FNR 的 N-末端有长约 90 个氨基酸残基组成的肽段, 该肽段与高等植物 FNR 几乎没有同源性, 但却与蓝细菌藻胆体中的连接蛋白 CpcD 有很高的同源性, 这一区域称为类 CpcD 结构域^[2], 缺少该结构域的 FNR 称为 FNRD。

关于类 CpcD 结构域的功能, Schluchter 等^[3] 首次证明了蓝细菌 *Synechococcus* sp. PCC 7002 的藻胆体中存在 FNR, 并推测 FNR 可能通过类 CpcD 结构域定位在藻胆体外周杆 (Rod) 的远离核心杆的一端 (远端)。Gomez-Lojero 等^[4] 进一步用实验验证了这一推测, 蓝细菌 *Synechococcus* sp. PCC 7002 每个藻胆体中平均含有 1.3 个 FNR 分子。van Thor 等^[5] 认为在蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的藻胆体中 FNR 结合在外周杆靠近核心杆一端的 PC 上, 但不会结合在通常为 CpcD 蛋白所占据的外周杆的远端。李荣贵等^[6] 研究了体外类 CpcD 结构域对重组

蓝细菌 FNR 活性的影响。结果表明, 类 CpcD 结构域的并不影响 FNR 对底物 NADP⁺、CtyC6 的结合及其催化活性, 但体内类 CpcD 结构域对其活性及定位影响的报道不多。本文通过在蓝细菌同时表达 FNR 与 FNRD, 研究体内 FNRD 部分性质, 为深入了解蓝细菌中的 FNR 功能及其分子进化打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种 :质粒 pUC19、pAQE19 由本实验室购买并保存, 蓝细菌 *Synechococcus* sp. PCC 7002 由美国宾州州立大学的 Don A Bryant 教授惠赠, 所用培养基为 A⁺。

1.1.2 主要材料和试剂 :DNA 操作所需工具酶购自大连宝生物公司, 硫酸链霉素、Triton X-114 购自 Sigma 公司, NC 膜为 PALL 公司产品, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为北京鼎国生物工程公司产品, 其它试剂为国产分析纯。

1.2 蓝细菌内表达 FNRD 的载体构建

用 *Xba* I 和 *Eco* R I 将编码 FNRD 的 *petHL* 基因从 pET-3aHL^[6] 上切下, 克隆到经同样酶切的 pUC19 质粒上, 构建表达质粒 pUC19HL, 使 *petHL* 置于 Lac 启动子的控制之下; pET-3aHL 经 *Bgl* II 和 *Eco* R I 酶切后, 电泳回收 *petHL* 片段, 克隆到经同样酶切的 pAQE19 质粒上, 构建表达载体 pAQE19HL, 使 *petHL* 置于 Kan 启动子控制之下。

基金项目 国家自然科学基金 (39525002, 39570067)

作者简介 李荣贵 (1969 -) 男, 山东莒县人, 副教授, 博士, 研究方向为蛋白质的结构与功能。E-mail: rongguili@yahoo.com

收稿日期 2005-01-21, 修回日期 2005-04-25

1.3 蓝细菌的培养与转化

将 *Synechococcus* sp. PCC 7002 野生型菌株接种于 A⁺ 液体培养基中, 39℃, 白炽灯光照培养, 培养时通入含 1% CO₂ 的无菌空气。

当培养至透光率为 20%(550nm), 即可用于转化, 按每毫升培养细胞加入 1~2μg 质粒, 饱和光照, 并继续通入含 1% CO₂ 的无菌空气, 培养 90min 后, 稀释转化菌液, 取少量涂布于 A⁺ 固体培养基平板上, 弱光下培养 2~3d, 然后在培养基上加盖一层含 15μg/mL 氨苄青霉素的 A⁺ 固体培养基(琼脂浓度为 0.5%) 标准光照下培养 4~6d, 生长出的菌落在含同样浓度的抗生素平板上划线培养 4~6 次。

1.4 蓝细菌总 DNA 的提取与 Southern blot 分析

蓝细菌总 DNA 的提取按照 de Lorimier 等^[7]的方法进行。

蓝细菌总 DNA 经 *Eco*R I 和 *Hind*III 酶切, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, Southern blot 的其它操作按照 Schluchter 等^[3]的方法进行, 以 α-³²P 标记的 *pet*HL 为探针。

1.5 兔抗 FNRD 的抗体制备与 Western blot 分析

重组 FNRD 的制备参照李荣贵等^[6]的方法进行, 兔抗 FNRD 的抗体制备与 Western blot 分析参照 Hennies 等^[8]的方法进行, 以纯化的重组 FNR 与 FNRD 为阳性对照^[6,9]。

1.6 转化蓝细菌 FNRD 的稳定性分析

当表达 FNRD 的蓝细菌生长到透光率为 50% 时, 向培养基中加入氯霉素至终浓度为 100μg/mL, 定期取样进行 Western blot 分析。

1.7 胞内 FNR 及 FNRD 的分部研究

参照 Schluchter 等^[3]的方法, 略有改动。500mL 生长到对数期的蓝细菌培养液, 离心收集细胞, 菌体用 TE 缓冲溶液(50mmol/L Tris·Cl, pH7.5, 10mmol/L EDTA) 洗涤后, 重悬于 10mL TE 缓冲溶液, 4℃, French Pressure Cell 破碎细胞两次, 裂解液 6000 × g 离心 10min, 上清加入硫酸链霉素至终浓度为 1.0%, 冰浴放置 10min, 4℃, 6000 × g 离心 10min 沉淀膜组分(MF), 上清为细胞可溶性组分(CF), MF 重悬于 2mL TE 缓冲溶液中。

取 MF、CF 各 600μL, 分别加入等体积的去垢剂溶液(20mmol/L Tris·Cl, pH7.5, 200mmol/L NaCl, 1.0% Triton X-114), 冰浴放置 5min 后混匀, 室温放置 10min 使分相发生, 室温 12000 × g 离心 5min, 取上层水相, 并加入等体积冰冷的丙酮, 冰浴放置 15min, 12000 × g 离心 15min 收集沉淀, 去垢剂相加

入 2 倍体积的冰冷的 TE 缓冲溶液, 再加入 3 倍体积的冷丙酮, 12000 × g 离心 15min 收集沉淀。两种沉淀分别加入 100μL 载样缓冲溶液进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。

1.8 光合放氧速率的测定

将生长到对数中期的不同蓝细菌培养液用 A⁺ 培养基稀释到 OD₆₈₀ 为 0.33(此时 OD₅₅₀ 也为 0.33), 室温条件下, 取等体积的稀释液加入到已调试好的氧电极反应池中, 避光, 缓缓吹入氮气, 使反应池中菌液的溶氧量为 40% 饱和度, 然后施以饱和光照, 以单位时间内溶氧饱和度的升高为放氧速率。

2 结果

2.1 转基因蓝细菌的 Southern blot 检测

在含氨苄青霉素的固体培养基上筛选到了分别转化 pUC19HL 和 pAQE19HL 的阳性克隆, 分别称之为 UC19HL 和 AQE19HL, 对阳性克隆进行继代培养, 这两种克隆都能生长良好, 为证明目的基因确实已转入野生型蓝细菌 *Synechococcus* sp. PCC 7002, 我们对在抗生素培养基上生长良好的菌株进行了

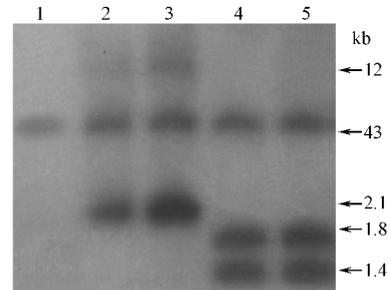


图 1 不同菌株总 DNA 的 Southern blot 分析

Fig.1 Southern blot analysis of total DNA from different strains

1. Wild type ; 2. AQE19HL ; 4, 5. UC19HL.

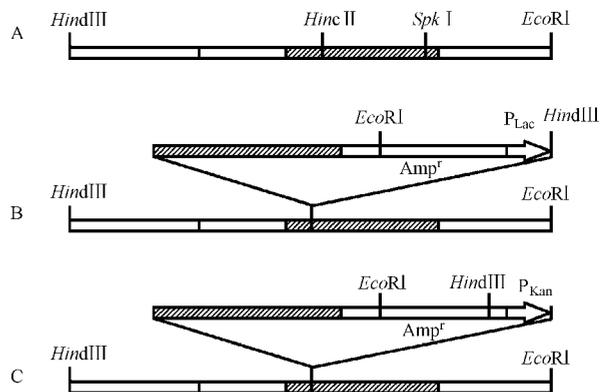


图 2 野生形菌株中 *pet*H 及转化菌 *pet*H 和 *pet*HL 在染色体上的位置示意图

Fig.2 Maps of *pet*H and *pet*HL in chromosomes of different strains

A : Wild type ; B : UC19HL ; C : AQE19HL

Southern blot 分析,结果如图 1 所示,在野生型菌株中只检测到了长度为 4.5kb 的一条带,而在 UC19HL 和 AQE19HL 中各检测到了 3 条阳性条带,其中,UC19HL 中的大小分别为 4.3kb、1.8kb 和 1.4kb,而 AQE19HL 中 3 条带的大小分别为 12kb、4.3kb 和 2.1kb。从各杂交条带的大小来看,pAQE19HL 已完全整合到染色体 DNA 上(图 2-C),12kb 片段为未完全切开的 DNA;在 UCHL 菌株中,转化的 pUC19HL 部分整合到了受体细胞的染色体上(图 2-B),部分游离于染色体之外,仍以质粒的形式存在。

2.2 转基因蓝细菌的 Western blot 分析

为检测转化菌中的 *petHL* 是否得到了表达,我们对转化菌株和野生菌株的全蛋白进行了 Western blot 分析,野生菌株中只在 45kD 处有一明显条带,与推测 FNR 全酶的大小一致,而两个转化菌株中除 45kD 的阳性条带外,在 35kD 处还有一条明显条带(图 3),与大肠杆菌中表达的 FNRD 的大小相同,说明 *petHL* 基因确实在转化细菌中得到了表达。因各泳道中蛋白上样量相同,在蓝细菌 *Synechococcus* sp. PCC 7002 中 Kan 启动子启动 *petHL* 表达的效率明显高于 Lac 启动子。

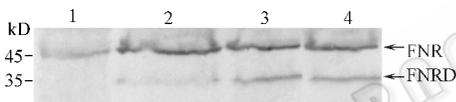


图 3 不同菌株 FNR 与 FNRD 的 Western blot 分析

Fig.3 Western blot analysis of FNR and FNRD in different strains

1. Wild type; 2. UC19HL; 3. AQE19HL; 4. Recombinant FNR and FNRD.

2.3 内源 FNR 及 FNRD 的稳定性

氯霉素可以抑制原核细胞中的蛋白合成,当在蓝细菌培养液中加入氯霉素 84h 后,细胞内的叶绿素、藻胆色素已经降解,细胞呈黄色,但从 Western blot 的结果看,此时转化菌中的 FNR 及 FNRD 与未加氯霉素时的样品相比没有明显的变化(图 4),说明 FNR 与 FNRD 在蓝细菌体内是相当稳定的。

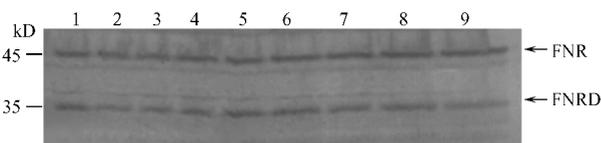


图 4 AQE19HL 体内 FNR 与 FNRD 稳定性的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of the stability of FNR and FNRD in AQE19HL

1. FNR and FNRD in AQE19HL; 2~9. FNR and FNRD for 4, 8, 16, 32, 48, 64, 72, 84h after adding chloramphenicol.

2.4 胞内 FNR 及 FNRD 的分部研究

Triton X-114 分相后,疏水蛋白可以进入 Triton 相,而亲水蛋白则留在上层水相,Schluchter 等的研究结果证实,野生型蓝细菌的部分 FNR 由于发生脂酰基修饰而导致其疏水性增加,从而在分相研究该部分 FNR 可进入 Triton 相^[3]。本研究的 Western blot 结果表明,转化菌中可溶性组分和膜组分都有部分重组 FNRD 出现在 Triton 相(图 5),说明体内 FNRD 也可能发生了酰基化。

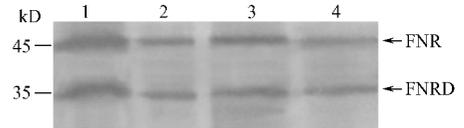


图 5 AQE19HL 细胞裂解液 Triton X-114 分相后的不同组分中 FNR 与 FNRD 的 Western blot 分析

Fig.5 Western blot analysis of Triton X-114 phase partition of FNR and FNRD in AQE19HL

1. Triton X-114 pellet of membrane fraction; 2. Supernatant of membrane fraction; 3. Triton X-114 pellet of soluble fraction; 4. Supernatant of soluble fraction.

2.5 FNRD 对转化菌光合放氧速率的影响

光照 3min 后,野生型蓝细菌培养液的溶氧饱和度和从 40% 改变为 64%,UC19HL 培养液的溶氧饱和度从 40% 升至 82%,AQE19HL 的溶氧饱和度从 40% 升至 88%,在测定时间内,UC19HL 的放氧速率是野生型的 1.28 倍,AQE19HL 的放氧速率是野生型的 1.38 倍。

3 讨论

pUC19 是分子克隆中常用的载体,置于 *Xba* I 和 *Eco*R I 之间的 *petHL*,可在 Lac 启动子的控制下在 *E. coli* DH5 α 中得到表达,pAQE19 是一个可在蓝细菌中复制的质粒,该质粒上的 Kan 启动子是一个中等强度的启动子。置于 Lac 启动子、Kan 启动子控制之下的 *petHL* 分别转化蓝细菌,可通过同源重组连同质粒的其它部分插入 *petH* 基因内部,使原有 *petHL* 分别置于上述两个启动子控制之下,而转化的 *petHL* 取代了原有的 *petHL* 片段,本实验结果也证实了这一点,同时实验结果也说明蓝细菌 *Synechococcus* sp. PCC 7002 的 RNA 聚合酶可识别这两个启动子。

已有的研究表明,蓝细菌 FNR 的类 CpcD 结构域与其细胞定位有关,蓝细菌通过该结构域定位在藻胆体上,FNR 是否也通过该结构域定位在类囊体膜上还不清楚。若 FNR 在蓝细菌呼吸作用中发挥

作用^[10],而质膜是呼吸作用的场所,那么FNR还与质膜存在相互作用,本研究发 现缺少类CpcD结构域的FNRD体内部分可能发生酰基化作用,使其疏水性增加,在可溶性组分和膜组分Triton X-114分相后的两相中都发现了疏水和亲水FNRD,暗示FNR和FNRD细胞定位方式或催化活性可能不同,疏水FNRD是否与质膜和类囊体膜发生作用,完成其NADPH的氧化与NADP⁺还原还有待于进一步研究。

以前的研究表明,体外FNRD具有与FNR相同的酶学性质和催化活性^[6,9]。本实验结果显示,蓝细菌胞内表达的FNRD能显著提高光合放氧速率,并且随着胞内FNRD表达水平的提高,光合放氧速率也相应提高,该结果还暗示从Fd到NADP⁺的电子传递,是光合电子传递的限速步骤。但从Western blotting的结果来看,FNRD在AQE19HL中的含量明显高于UC19HL,但AQE19HL的放氧速率仅略高于UC19HL,因此,推测在野生型*Synechococcus* sp. PCC 7002中,由于FNR不足导致电子从Fd到NADP⁺的传递成为整个光合电子传递链上的一个限速步骤,而AQE19HL中由于FNRD的大量表达,使该处电子传递速度已接近最大,光合放氧速率也接近极限,该结果可为通过提高FNR表达水平来提高生物光合效率的研究提供借鉴。

参 考 文 献

[1] Araskaki A K, Cecarelli E A, Carrillo N. Plant-type ferredoxin-NADP⁺ reductases: a basal structural framework and a multiplicity

of functions. *FASEB J*, 1997, **11**(2):133-140.

- [2] Fillat M F, Flores E, Gomez-Morence C. Homology of N-terminal domain of the *petH* product from *Anabaena* sp. PCC 7119 to the CpcD phycobilisome linker polypeptide. *Plant Mol Biol*, 1993, **22**: 725-729.
- [3] Schluchter W M, Bryant D A. Molecular characterization of ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase in cyanobacteria: cloning and sequence of the *petH* gene of *Synechococcus* sp. PCC 7002 and studies on the gene product. *Biochemistry*, 1992, **31**(12):3092-3102.
- [4] Gomez-Lojero C, Perez-Gomez B, Shen G, et al. Interaction of ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase with phycobilisomes and phycobilisome substructures of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Biochemistry*, 2003, **42**(47):13800-13811.
- [5] van Thor J J, Gruters O W, Mathijs H C, et al. Localization and function of ferredoxin:NADP⁺ reductase bound to the phycobilisomes of *Synechocystis*. *EMBO J*, 1999, **18**(15):4128-4136.
- [6] 李荣贵,赵进东,吴光耀,等. 编码*Synechococcus* sp. PCC 7002 FNR中FNR区的基因克隆及其在大肠杆菌中的表达. 植物学报, 1999, **41**(4):389-392.
- [7] de Lorimier R, Bryant D A, Porter R D, et al. Genes for the alpha and beta subunits of phycocyanin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**(24):7946-7950.
- [8] Hennies M, Sauerwein H. Purification of bovine IGFBP-3 and the development of an enzyme immunoassay for the protein. *J Immunol Methods* 2003, **281**(1-2):9-15.
- [9] 李荣贵,赵进东,吴光耀,等. 蓝细菌*Synechococcus* sp. PCC 7002 *petH*基因的高效表达及其产物的纯化. 植物学报, 1998, **40**:814-819.
- [10] Scherer S, Alpes I, Sadowski H, et al. Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase is the respiratory dehydrogenase of cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Arch Biochem Biophys*, 1988, **267**:228-235.

Expression and characterization of FNRD in cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002

LI Rong-gui^{1*} YU Xin² ZHAO Jin-dong²

(¹ Department of Biology, Qingdao University, Qingdao 266071, China) (² College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: The *petHL* genes under the control of Lac and Kan promoters were transformed into *Synechococcus* sp. PCC 7002, respectively. Both of the *petHL* genes are integrated into the cyanobacterium chromosomes, which is inferred from the results of Southern blot analysis. Western blot analysis results show that both *petHL* genes are expressed in the transformed cells, and Kan promoter is more effective than Lac promoter. The FNRD *in vivo* shows the same stability as that of FNR holoenzyme. Some FNRD molecules are probably acylated as judged by the result of Triton X-114 phase partition test. FNRD *in vivo* might act as a component in photosynthetic electron transport chain, which increases the photosynthetic oxygen evolution rate.

Key words: *Synechococcus* sp. PCC 7002, Fd:NADP⁺ oxidoreductase, FNRD

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(39525002, 39570067)

* Corresponding author. Tel 86-532-5953710; Fax 86-532-3138; E-mail: rongguili@yahoo.com

Received date: 01-21-2005