



葛仙米藻蓝素铁氧还蛋白还原酶基因 *Ns-PcyA* 的克隆、表达及其分子结构基础

汪海洋¹, 朱格格¹, 卢 婵¹, 程 超^{1,2}, 李 伟¹, 方 庆^{1,2}

(1. 湖北民族大学 生物科学与技术学院, 湖北恩施 445000; 2. 生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北恩施 445000)

摘 要 为研究葛仙米藻蓝素的细胞内合成作用, 采用聚合酶链式反应(PCR)、构建融合 His 标签重组载体和 SDS-PAGE 电泳等试验方法, 克隆与表达葛仙米藻蓝素铁氧还蛋白还原酶基因 *Ns-PcyA*, 并对其蛋白高级结构进行模拟分析。结果显示, 葛仙米藻蓝素铁氧还蛋白还原酶基因 *Ns-PcyA* 密码区全长 744 bp, 预测编码一含 247 个氨基酸的蛋白质肽链。*Ns-PcyA* 与同属其他藻种中的同源蛋白氨基酸序列总相似性可达 95.66%, 并且富含半胱氨酸(7 个 Cysteine 残基)。以点型念珠藻(*Nostoc punctiforme*)为参照, 葛仙米 *Ns-PcyA* 蛋白多肽链除 C 末端多两个氨基酸外, 还出现 8 个位点氨基酸的显著替换; 分子进化显示, *Ns-PcyA* 很可能源于点型念珠藻的同源基因, 而与发状念珠藻和普通念珠藻中 *PcyA* 基因形成明显分支。这表明 *PcyA* 基因的生物学功能在不同念珠藻中可能产生变异。构建 *Ns-PcyA* 基因的重组表达载体, 并在大肠杆菌中成功表达分子量近 29.0 ku 的目的蛋白。高级结构模拟显示, *Ns-PcyA* 单分子中主要包含 α 螺旋和 β 折叠片两类二级结构, α 螺旋和 β 折叠片进一步形成类似三面夹心式高级结构。其外围两侧共分布 5 个较典型的 α 螺旋, 而 8 个反向平行 β 折叠片夹于其中, 形成一疏水内核。本研究结果为深入了解和开发葛仙米藻蓝素的细胞内合成作用奠定了试验基础。

关键词 藻蓝蛋白; 藻蓝素铁氧还蛋白还原酶; 葛仙米; 克隆; 结构

中图分类号 Q71

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2021)12-1863-08

原核藻类(prokaryotic algae), 兼有细菌和高等植物部分重要特性, 如较快速的细胞分裂繁殖与光合作用产能等, 在生物进化中地位特殊。其光合作用的主要细胞器是藻胆体(phycobiosome)。蓝藻(blue green algae), 即蓝细菌, 依靠藻胆体捕获并传递光能, 被认为是某些藻类和高等植物叶绿体的祖细胞^[1-3]。构成上, 藻胆体为多亚基蛋白与有色辅基等有序结合的超大分子复合物^[4-5]。藻胆蛋白(phycobiliprotein)多由 α/β 两类重要的亚基组成, 而藻胆素(phycobilins)即色素部分为开链四吡咯化合物。近年来, 对藻胆体的作用机制及其体外有益活性研究较广^[4, 6-9]。

目前, 针对资源性藻蓝蛋白研究^[8, 10-11]为该类型有机复合物或其单组分等深入开发运用提供了基础。藻胆素包含多种类型, 通常以共价硫醚键与藻胆蛋白中的多肽链结合, 吸收和传递光能。

一般认为, 藻胆蛋白只有结合色素后才具有光能捕获与能量转换的活性。试验表明藻胆蛋白的纯度愈高, 对自由基清除的能力愈强^[8]。由此可见, 藻胆素对藻胆蛋白的体外活性具有促进作用。而且蓝藻含有 4 种藻胆素, 互为同分异构体, 在光能捕获和转化中的作用因自身结构而不同。这表明细胞内藻胆素的酶促合成存在差异。早期研究发现, 藻蓝胆素(phycocyanobilin, PCB)是以血红素 IX 为前体, 经藻蓝素铁氧还蛋白还原酶(*PcyA*)的催化作用而形成^[6]。

葛仙米(*Nostoc sphaeroides* Kützinger), 也被称为天仙米, 学名拟球状念珠藻, 属蓝藻门念珠藻目, 是中国重要的食药两用的蓝藻之一^[12]。研究显示, 葛仙米富含人体必需的多种氨基酸及多糖等活性物质, 具较重要的药源功效等^[10]。现今中国居民对健康的需求已进入新时期, 深入研究与

收稿日期:2020-10-11 修回日期:2021-03-20

基金项目:湖北省教育厅团队项目(T201312);国家自然科学基金(31560434);湖北省重点实验室开放基金(PKLHB1916)。

第一作者:汪海洋, 男, 硕士研究生, 研究方向为林特食品生物技术。E-mail:939747515@qq.com

通信作者:方 庆, 男, 副教授, 研究方向为植物蛋白工程。E-mail:fangqing2005@126.com

开发葛仙米资源具有重要意义^[12-13]。本研究克隆葛仙米藻蓝素铁氧还蛋白还原酶关键基因 *Ns-PcyA*, 在原核细胞中表达并探究其蛋白高级结构, 为进一步深入了解和开发葛仙米藻蓝胆素的细胞内合成作用奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试剂

葛仙米鲜样采自湖北恩施鹤峰。分子克隆用基本工具酶, 载体等购于大连宝生物等公司 (TaKaRa); 引物由金斯瑞公司合成。

1.2 DNA 的提取

葛仙米总 DNA 提取参考前述方法^[14]。具体步骤包括: 鲜样经无菌水冲洗 4~5 次, 接种于固体培养基上, 经 3~4 次反复继代消除其他杂菌, 待成体细胞直径长至约 2.5 mm 后, 进行总 DNA 抽提。取 0.1 mg 鲜样与 800 μ L CTAB 抽提液混匀, 迅速研磨后 65 $^{\circ}$ C 水浴 30 min; 离心 5 min 上清液置于新的离心管中, 经氯仿-异戊醇 (24:1) 处理后取上清液异丙醇沉淀, 75% 的乙醇洗涤后晾干, 含 RNA 酶的 ddH₂O 溶解, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 备用。

1.3 PCR 反应

PCR 反应体系为: 模板 DNA 1 μ L, Go Tap G2 Green Master Mix 5 μ L, 引物混合物 1 μ L, 补加 ddH₂O 至 10 μ L; 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 16 $^{\circ}$ C 10 min, 扩增循环数设为 30。据 *PcyA* 基因 (*O. lucimarinus* CCE9901) 同源序列分析葛仙米对应基因组 (Locus, NZ_CP031941) 中的目的基因序列, 设计 *Ns-PcyA* 基因的引物为: 上游 *Ns-phyA*-F-NdeI: GGCATATGTCATTTACT-TCTATAC; 下游 *Ns-phyA*-R-EcoRI: GAATTCTTATTTTAATGTTGGGAG。

1.4 克隆目的基因 DNA

目的 DNA 与 pMD18-T 连接, 采用 42 $^{\circ}$ C 热激转化法将重组载体导入大肠杆菌细胞。在含抗生素 (Amp, 100 μ g/mL) 的固体 LB 培养基上筛选单菌落, 挑取单菌落 37 $^{\circ}$ C 培养 14 h 后进行质粒提取并测序。

1.5 表达载体构建

采用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Nde* I 分别对克隆目的基因的质粒 DNA 和 pCold I 载体进行消化, 然后回收基因片段和线性化的载体, 进行

T4 DNA ligase 连接反应。连接体系转化大肠杆菌细胞 DH5 α 。再经质粒提取和测序鉴定重组表达质粒。目的基因测序由上海生工公司完成。

1.6 序列与蛋白结构分析

对目的基因 *PcyA* 编码蛋白氨基酸序列, 针对 *Nostoc* 种属基因序列, NCBI (National Center for Biotechnology Information) 在线比对 BLAST 和 Clustalw (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 分析; 采用 MEGA 构建基于 Neighbor-Joining 方法的系统进化树; 葛仙米 *Ns-PcyA* 基因编码蛋白结构分析采用 Swiss-model (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 基于序列相似性的分子模拟。

1.7 目的蛋白的表达

将测序正确的重组表达质粒导入表达菌株 BL21 细胞中, 进行 0.1 mmol/L IPTG 诱导表达 4~12 h, 超声破碎细胞 (破碎功率为 66 W, 时间 4~10 s, 重复 3 次, 间隔 10 s), 制备表达样品进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果与分析

2.1 葛仙米 *Ns-PcyA* 基因克隆

以 CTAB 法提取葛仙米总 DNA 为模板进行特异引物的 PCR。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳 (图 1-A)。结果显示, 参照 DNA 分子量标准 (D1), 目的基因泳道 (K1) 扩增得到 1 条长近 800 bp 的特异产物, 与目的基因大小相符。

回收目的 DNA, 与载体 pMD18-T 连接。将连接产物转化大肠杆菌并挑取单菌落培养, 提取质粒进行 *Nde* I/*Eco* R1 双酶切。琼脂糖凝胶电泳显示两个正确克隆质粒 (p1, p2) 相较对照 DNA 分子质量标准 (M1), 均能够切出 2 条 DNA 带型, 其中较小的近 800 bp, p1 与 p2 很可能为正确克隆 (图 1-B)。测序分析显示, 扩增克隆 DNA 产物与 GenBank 中一段目的基因 DNA (CP031941.1, 区段为 4 451 478~4 452 221) 完全相同, 全长 744 bp, 包含起始密码和终止密码 (TAA)。其预编码藻蓝素铁氧还蛋白还原酶基因 (phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase)。以上结果表明葛仙米 *Ns-PcyA* 克隆成功。

2.2 *PcyA* 基因编码蛋白与分子进化

Ns-PcyA 预编码一含 247 个氨基酸的多肽链 (Genbank, WP_118167897.1)。同源序列比对分析, 发现该 *Ns-PcyA* 与其他几个同源蛋白

氨基酸序列总相似性达 95.66%,并为典型的富含半胱氨酸(7 个 Cysteine)蛋白(图 2 “#” 标示);相较点型念珠藻(*Nostoc punctiforme*)的藻蓝素铁氧还蛋白还原酶,*Ns-PcyA* 氨基酸序列中存在 8 个较为显著的位点替换,包括 N41D, Q121E, T131N and V196A 等(黑色三角标示)

(图 2)。分子进化树显示,葛仙米 *Ns-PcyA* 很可能源于点型念珠藻,而在发状念珠藻(*Nostoc flagelliforme*)和普通念珠藻(*Nostoc commune*)同源蛋白中形成明显分支(图 3)。这预示藻蓝素铁氧还蛋白还原酶生物学功能在不同念珠藻中可能存在变异。

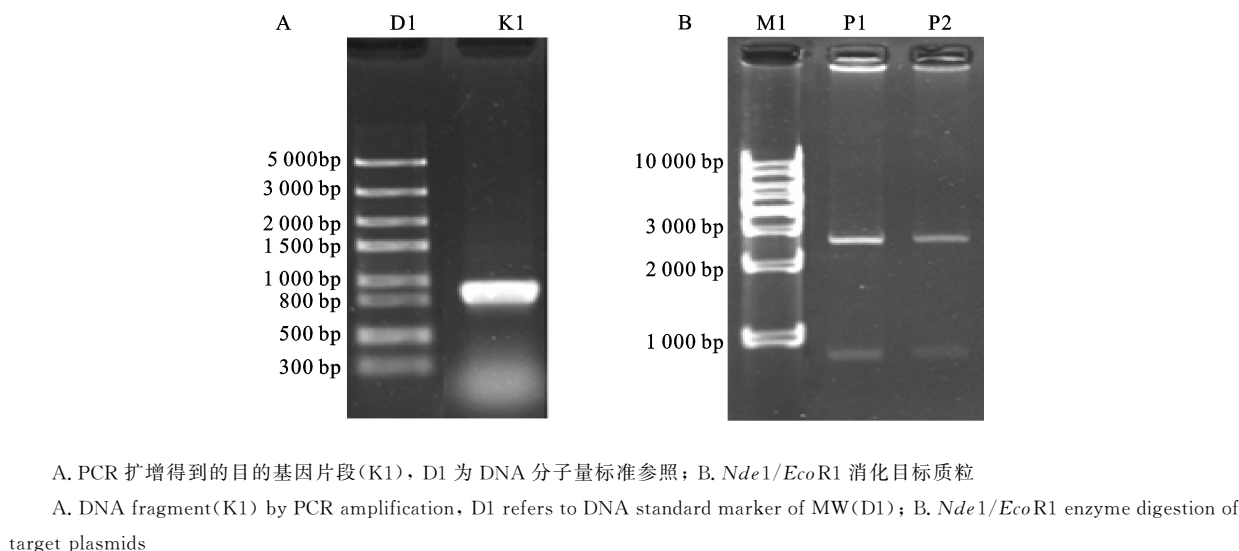
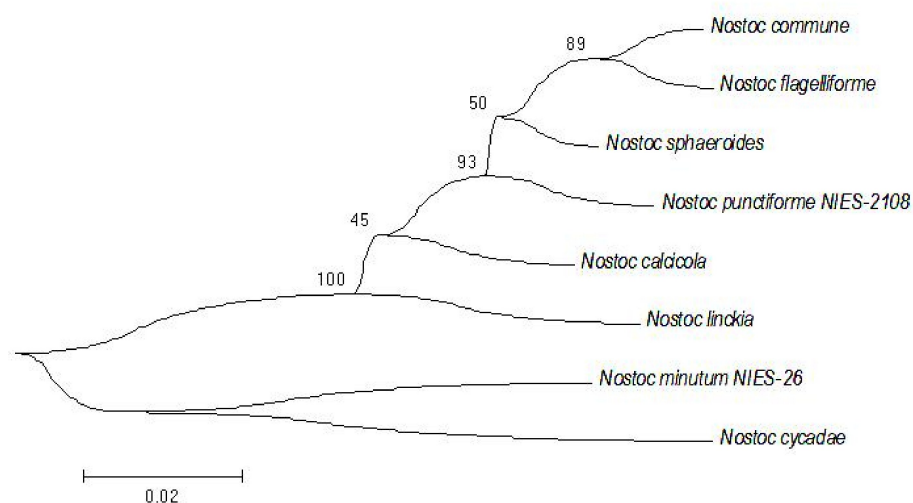


图 1 PCR 扩增目的基因与酶切分析
Fig. 1 Gene amplification by PCR and enzyme digestion analysis



黑色三角与 # 分别显示典型的氨基酸位点替换和半胱氨酸
Black triangles and “#” indicate typical site substitutions in amino acids and cysteines in sequences, respectively

图 2 PcyA 蛋白氨基酸序列比对
Fig. 2 PcyA amino acids alignment



每类念珠藻种名代表其所拥有目的基因 *PcyA* 所在的分支
Each *Nostoc* species represents target gene *PcyA* on branch

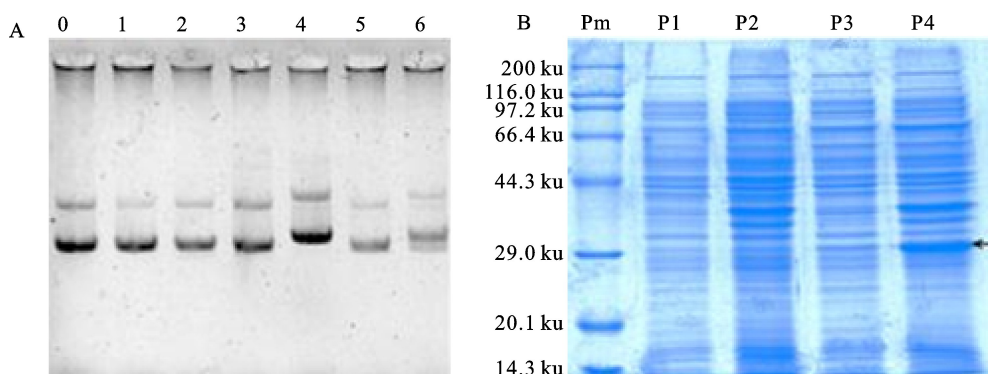
图 3 *PcyA* 基因系统进化树

Fig. 3 *PcyA* phylogenetic tree

2.3 目的蛋白表达

为进一步研究葛仙米藻蓝素铁氧还蛋白还原酶,将目的基因 *Ns-PcyA* 连接进入表达载体 pCold I。提取连接转化子质粒,经琼脂糖凝胶电泳检测,6 个质粒(#1~#6)中第 #4 比对照 #1

略大,很可能为正确重组质粒。测序鉴定显示, #4 质粒目的基因序列处于载体 pCold I 上冷休克基因(*cspA*) 启动子下游,重组表达载体构建成功(图 4-A)。



A. *Ns-PcyA* 表达质粒琼脂糖凝胶电泳, #0 为负对照, #1~#6 为提取的转化质粒,其中 #4 为正确重组质粒; B. SDS-PAGE 分析目的蛋白 *Ns-PcyA* 表达, Pm 为蛋白分子量标准, P1 和 P2 为非诱导样本的上清和沉淀裂解物; P3 和 P4 为诱导菌上清和沉淀诱导物

A. *Ns-PcyA* expression plasmid by electrophoresis of agarose, #4 is one correct recombinant plasmid among the clones referring to negative control #0; B. *Ns-PcyA* protein expression tested by SDS-PAGE, P3 and P4 respectively represent the supernatants and precipitates of the induced bacterial lysates, in contrast to the uninduced samples(P1 and P2) and the protein standard marker(Pm)

图 4 目的基因 *Ns-PcyA* 表达质粒和蛋白表达

Fig. 4 *Ns-PcyA* expression plasmids and protein expression

目的基因 *Ns-PcyA* 预编码蛋白质分子质量大小为 28.24 ku。将表达载体 #4 质粒转入大肠杆菌 BL21 细胞经 0.1 mmol/L IPTG 诱导,分离上清和沉淀蛋白。12% SDS-PAGE 电泳如图 4-

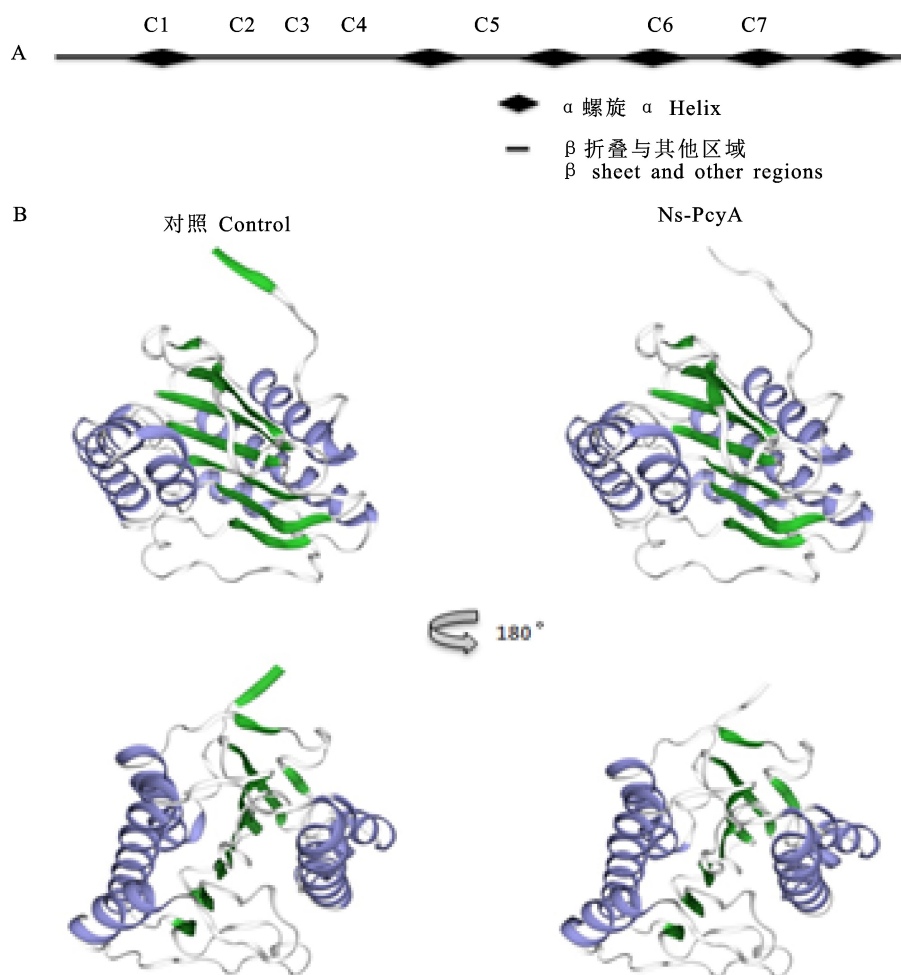
B 显示,目的蛋白相较标准蛋白 Marker(Pm 泳道),在 29.0 ku 附近有明显积累(P4 泳道),而对照(P1 与 P2 泳道,未诱导大肠杆菌细胞样品上清和沉淀裂解样品)中没有出现相应大小的蛋白

条带。目的蛋白在沉淀中较大量积累(P4 泳道, 箭头标示),上清中存量较少(P3 泳道),表明目的基因在大肠杆菌中能够顺利表达。

2.4 藻蓝素铁氧还蛋白还原酶 *Ns-PcyA* 分子构型

蛋白肽链的分子内折叠是形成其高级结构进而发挥功能的基础。高级结构模拟显示,目的基因编码蛋白 *Ns-PcyA* 单分子主要包含 α 螺旋和 β 折叠等两类主要的二级结构。 α 螺旋和 β 折叠进一步形成类似三面夹心的高级结构,其中 5 个

α 螺旋分布于外侧;而 8 个 β 折叠处于螺旋形成的封闭空间中(图 5-B),形成疏水内核。*Ns-PcyA* 为富含半胱氨酸蛋白,其肽链中有 4 个半胱氨酸(从 N 端起第 2 至第 5 个半胱氨酸)分别分布于 β 折叠片层中(图 5-A)。胆绿素 IV 在藻蓝素铁氧还蛋白还原酶(PcyA)作用下,还原 D 环与 A 环上的乙烯基团,从而形成藻蓝胆素 PCB。*Ns-PcyA* 这种夹式构型有利于底物和产物的及时锚定或释放。



A,B 分别代表 *Ns-PcyA* 蛋白线性模式图和分子高级结构模拟结果;不同二级结构模体和 7 个半胱氨酸(C1~C7)标示
A,B represent *Ns-PcyA* linear pattern and advanced structural models, respectively; different secondary motifs and seven cysteines (C1~C7) are shown in the results

图 5 *PcyA* 分子结构模型
Fig. 5 *PcyA* molecular modeling

3 讨论

葛仙米(*Nostoc sphaeroides* Kützing)是中国

重要的食药同源性原核藻类,在服务地域经济和社会发展方面其生物资源潜能亟待深入发掘^[12-13]。作为辅基色素,藻蓝胆素是一类线性四

吡咯结构的化合物,在藻类细胞中具有捕获和传递光能的功能^[6, 14-15]。这些同分异构体,因双键位置不同,引致吸收光谱不同并在特定的条件下呈现不同的颜色。同分异构体存在,也表明此类色素合成的关键酶可能不同。藻蓝胆素在细胞内合成的途径已经明确:血红素 IX 经氧化作用形成胆绿素 IV,后者在藻蓝素铁氧还蛋白还原酶(PcyA)作用下形成藻蓝胆素 PCB^[16-17]。藻蓝蛋白具有抗氧化、抗炎症、抑肿瘤与强免疫等重要活性^[10, 18-19]。本研究成功克隆葛仙米藻蓝素铁氧还蛋白还原酶基因 *Ns-PcyA*,为进一步研究和开发葛仙米藻蓝素等的生物资源奠定了重要基础。

一般认为,藻蓝胆素对藻蓝蛋白体外活性具有促进作用。实际上,脱离多肽链的藻蓝胆素清除自由基等活性已被证实。这为藻蓝胆素和藻蓝蛋白的深入开发提供了基础^[20-23]。生物体中,铁氧还蛋白还原酶(Ferredoxin-NADP+ Reductase, FNR)非共价键结合黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)辅基,并作为电子传递链中的重要组成部分,在众多基础代谢中发挥作用;其中,辅酶 NADP+ 是 FNR 催化反应的先决条件,分子偶极矩表面电荷的分布和数量保证了 FNR 与 Fd 定向关联,其中氢键、盐桥、范德华力及疏水作用起到稳定蛋白构象和功能的作用^[24-28]。依赖铁氧还蛋白的胆色素还原酶氨基酸位点变异,或是其功能和进化的重要证据。蓝藻中 PcyA 家族酶类功能或活性可能已经发生改变^[29-30]。分子进化水平上,显示 *Ns-PcyA* 与几个近源种内的同源蛋白谱系关系较近,为念珠藻的进化提供了分子证据^[12];即葛仙米可能是点型念珠藻的变异种,并以其为亲本进一步衍生出普通念珠藻和发状念珠藻。

Ns-PcyA 在体外功能有待深入研究。*PcyA* 蛋白第一个高分辨率的晶体模型被发现,为了解和发现其功能提供了基础^[30-31]。笔者借助分子模拟发现,尽管存在部分氨基酸位点替换,但葛仙米 *Ns-PcyA* 蛋白仍能够形成 $\alpha/\beta/\alpha$ 夹心式结构,其夹心空间及反向平行的 β 折叠片层利于底物和产物的及时锚定或释放。因此,笔者认为这种夹心式结构为其活性提供了重要支撑。并且, *Ns-PcyA* 为富含半胱氨酸蛋白,因此能够借助低电位铁硫基团以加强对曝氧等的防御^[32]。半胱氨酸可能对于 *Ns-PcyA* 蛋白具有双重意义:既能够自我保护又能够有利酶促底物反应进行。但是,

PcyA 是否具备抑制某些超氧化物氧化功能,需进一步鉴别。总之,克隆葛仙米 *Ns-PcyA* 基因,为了解和运用葛仙米藻蓝蛋白辅基色素关键合成酶功能及提供了基础。

4 结 论

本研究克隆葛仙米藻蓝素铁氧还蛋白还原酶基因 *Ns-PcyA*,并在大肠杆菌中成功表达目的蛋白。序列和分子结构模拟分析显示, *Ns-PcyA* 为富含半胱氨酸蛋白,其氨基酸肽链主要包含 α 螺旋和 β 折叠等二级结构,并以其分别建构蛋白亲水外围与疏水核心,从而形成三面夹心式高级构型。研究结果为进一步深入研究和开发葛仙米藻蓝胆素细胞内合成提供了重要基础。

参考文献 Reference:

- [1] CHANG L, LIU X, LI Y, *et al.* Structural organization of an intact phycobilisome and its association with photosystem II[J]. *Cell Research*, 2015, 25(6): 726-37.
- [2] TAL O, TRABELCY B, GERCHMAN Y, *et al.* Investigation of phycobilisome subunit interaction interfaces by coupled cross-linking and mass spectrometry[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(48): 33084-97.
- [3] COLLINS A M, LIBERTON M, JONES H D, *et al.* Photosynthetic pigment localization and thylakoid membrane morphology are altered in *synechocystis* 6803 phycobilisome mutants[J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(4): 1600-1609.
- [4] MULLINEAUX C W. Phycobilisome-reaction centre interaction in cyanobacteria[J]. *Photosynth Research*, 2008, 95(2/3): 175-182.
- [5] STEC B, TROXLER R F, TEETER M M. Crystal structure of C-phycocyanin from *cyanidium caldarium* provides a new perspective on phycobilisome assembly[J]. *Biophysical Journal*, 1999, 76(6): 2912-2921.
- [6] 马建飞, 林瀚智, 秦 松. 蓝藻藻胆体的体外组装研究进展[J]. 中国科学(生命科学), 2016, 46(9): 1054-1061.
MA J F, LIN H ZH, QIN S. Advances in cyanobacterial phycobilisome assembling in vitro[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2016, 46(9): 1054-1061.
- [7] 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 D, SUN J Y, LIU N N *et al.* Research progress of the antioxidant activity of Phycocyanin and its application[J]. *Marine Sciences*, 2015, 39(7): 130-135.
- [8] ADIR N, DOBROVETSKY Y, LERNER N. Structure of c-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 Å: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly[J]. *Journal of*

- Molecular Biology*, 2001, 313(1): 71-81.
- [9] 汪兴平, 谢笔均, 潘思铁, 等. 葛仙米藻蓝蛋白抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 458-461.
- WANG X P, XIE B J, PAN S Y, *et al.* Study on antioxidant activities of phycocyanin from *Nostoc sphaeroids* Kutz [J]. *Food Science*, 2007, 28(12): 458-461.
- [10] CHENG C, XUE F, WANG X P, *et al.* Research progress in extraction, purification and physiological activity of phycobiliprotein[J]. *Food Science*, 2012, 33(9): 251-259.
- [11] 邓中洋, 阎春兰, 胡 强, 等. 葛仙米研究进展[J]. 水生生物学报, 2008, 32(3): 393-399.
- DENG ZH Y, YAN CH L, HU Q, *et al.* The research advance of *Nostoc sphaeroides* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(3): 393-399.
- [12] 陈德文, 汪兴平, 潘思铁. 葛仙米的研究现状及应用前景[J]. 食品科学, 2003, 24(11): 153-156.
- CHEN D W, WANG X P, PAN S Y. Research on status quo and applied prospect of *Nostoc sphaeroides* ku Tzing [J]. *Food Science*, 2003, 24(11): 153-156.
- [13] ALVEY R M, BISWAS A, SCHLUCHTER W M, *et al.* Effects of modified phycobilin biosynthesis in the *Cyanobacterium Synechococcus* sp. strain PCC 7002[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(7): 1663-71.
- [14] 汪 琼, 王 静, 陈嘉惠, 等. 念珠藻葛仙米藻蓝蛋白 α 与 β 亚基基因克隆、表达及其单体结构模拟[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(5): 2154-2160.
- WANG Q, WANG J, CHEN J H, *et al.* Cloning, expression and protein monomers structure modeling of the phycocyanin α and β genes in *Nostoc sphaeroides* kützing[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(5): 2154-2160.
- [15] JOSHUA S, MULLINEAUX C W. Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in cyanobacteria [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(4): 2112-2119.
- [16] OKADA K. HO1 and PcyA proteins involved in phycobilin biosynthesis form a 1: 2 complex with ferredoxin-1 required for photosynthesis [J]. *FEBS Letters*, 2009, 583(8): 1251-1256.
- [17] HAGIWARA Y, SUGISHIMA M, KHAWN H, *et al.* Structural insights into vinyl reduction regiospecificity of phycocyanobilin: ferredoxin oxidoreductase (PcyA) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(2): 1000-1007.
- [18] CHENG C, XU H, LI W, *et al.* *Nostoc sphaeroides* phycobiliprotein enhances immune functions in mice[J]. *Food Science*, 2016, 37(5): 167-174.
- [19] 褚现明, 冷 敏, 安 毅, 等. 藻蓝蛋白抑制血管平滑肌细胞过度增殖性管腔狭窄的机制研究[J]. 中国药理学通报, 2012(10): 1383-1388.
- CHU X M, LENG M, AN Y, *et al.* Mechanism of inhibitory effects of C-phycocyanin on over proliferation of vascular smooth muscle cells and luminal stenosis[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2012(10): 1383-1388.
- [20] FANG Y Z, YANG S, WU G. Free radicals, antioxidants, and nutrition[J]. *Nutrition*, 2002, 18(10): 872-879.
- [21] REDDY C M, BHAT V B, KIRANMAI G, *et al.* Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 277(3): 599-603.
- [22] BHAT V B, MADYASTHA K M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 285(2): 262-266.
- [23] 陈英杰, 刘少芳, 陈华新, 等. 抗氧化活性藻蓝色素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(1): 87-89.
- CHEN Y J, LIU SH F, CHEN H X, *et al.* Interaction between antioxidant phycocyanobilin and bovine serum albumin [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2011, 31(1): 87-89.
- [24] TWACHTMANN M, ALTMANN B, MURAKI N, *et al.* N-terminal structure of maize ferredoxin: NADP⁺ reductase determines recruitment into different thylakoid membrane complexes [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(7): 2979-2991.
- [25] 杨 超, 胡红涛, 吴 平, 等. 高等植物铁氧还蛋白-NADP⁺氧化还原酶研究进展[J]. 植物生理学报, 2014, 50(9): 1353-1366.
- YANG C, HU H T, WU P, *et al.* Advances in the research of ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase in higher plants [J]. *Plant Physiology Communications*, 2014, 50(9): 1353-1366.
- [26] MEDINA M, GOMEZ-MORENO C. Interaction of ferredoxin-NADP(+) reductase with its substrates: optimal interaction for efficient electron transfer [J]. *Photosynth Research*, 2004, 79(2): 113-31.
- [27] CASSAN N, LAGOUTTE B, SETIF P. Ferredoxin-NADP⁺ reductase. Kinetics of electron transfer, transient intermediates, and catalytic activities studied by flash-absorption spectroscopy with isolated photosystem I and ferredoxin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(28): 25960-25972.
- [28] PALMA P N, LAGOUTTE B, KRIPPAHL L, *et al.* *Synechocystis* ferredoxin /ferredoxin-NADP(+) -reductase/ NADP⁺ complex: Structural model obtained by NMR-restrained docking [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(21): 4585-4590.
- [29] FRANKENBERG N, MUKOUGAWA K, KOHCHI T, *et al.* Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(4): 965-978.
- [30] HAGIWARA Y, SUGISHIMA M, TAKAHASHI Y, *et al.* Crystal structure of phycocyanobilin: ferredoxin oxi-

- doreductase in complex with biliverdin IX α , a key enzyme in the biosynthesis of phycocyanobilin[J]. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 2006, 103(1): 27-32.
- [31] FRANKENBERG N, LAGARIAS J C. Phycocyanobilin; ferredoxin oxidoreductase of *Anabaena* sp. PCC 7120. Biochemical and spectroscopic[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(11): 9219-9226.
- [32] IMLAY J A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2008, 77: 755-776.

Cloning, Expression and Advanced Molecular Structural Basis of Phycocyanin Ferredoxin Reductase Gene *Ns-PcyA* in *Nostoc sphaeroides* Kützting

WANG Haiyang¹, ZHU Gege¹, LU Chan¹,
CHENG Chao^{1,2}, LI Wei¹ and FANG Qing^{1,2}

(1. School of Biological Science and Technology, Hubei Minzu University, Enshi Hubei 445000, China;

2. Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Enshi Hubei 445000, China)

Abstract To explore the phycocyanobilin biosynthesis in *Nostoc sphaeroides*, PCR and other experimental methods such as construction of recombination vector of fusion His tag and SDS-PAGE were used to study the cloning and expression of the phycocyanin ferredoxin reductase gene *Ns-PcyA*. The results showed that the total length PcyA in the coding region was 744 bp, which predicted to deduce a polypeptide chain containing 247 amino acids. Compared the amino acid sequences of PcyA homologous proteins in several other phycophytes, the total similarity was 95.66%. With the *Nostoc punctiforme* as a reference, in addition to two more amino acids at the C-terminal, there was a significant substitution of amino acids at eight sites; molecular evolution showed that the *Ns-PcyA* probably originated from *Nostoc punctiforme* homologous protein, while it formed distinct branches with PcyA proteins in *Nostoc flagelliforme* and *Nostoc commune*, indicating that the biological function of the PcyA protein may vary in different *Nostoc* species. We successfully constructed recombinant expression vectors of *Ns-PcyA* enzyme gene and successfully expressed target protein of around 29.0 ku in *E. coli*. *Ns-PcyA* single molecule could form a binder-like structure, in which five typical α helices were distributed on both sides of the periphery, while eight β sheets were sandwiched in the relatively closed space formed by the helix on both sides. Taken together, the results provide experimental basis for further exploration of phycocyanobilin in *Nostoc sphaeroides*.

Key words Phycocyanin; Phycocyanobilin ferredoxin reductase; *Nostoc sphaeroides* Kützting; Cloning; Structure

Received 2020-10-11

Returned 2021-03-20

Foundation item Research Team Project of Department of Education of Hubei Province (No. T201312); National Natural Science Foundation of China (No. 31560434); the Foundation of Hubei Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization (No. PKLHB1916).

First author WANG Haiyang, male, master student. Research area: special forest food biotechnology. E-mail: 939747515@qq.com

Corresponding author FANG Qing, male, associate professor. Research area: plant protein engineering. E-mail: fangqing 2005 @ 126.com

(责任编辑: 潘学燕 Responsible editor: PAN Xueyan)