藻胆蛋白生物合成研究进展

马丞博^{1,2}, 秦松¹, 李文军^{1*}, 葛保胜^{3*}

1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003;

2. 烟台大学生命科学学院, 烟台 264005;

3. 中国石油大学(华东)化学工程学院生物工程与技术中心, 青岛 266580

* 联系人, E-mail: wjli@yic.ac.cn; gebaosheng@upc.edu.cn

2018-07-30 收稿, 2018-09-28 修回, 2018-09-28 接受, 2018-11-13 网络版发表

国家海洋经济创新发展示范项目(海洋经济发展创新示范城市启动资金)(YHCX-SW-Y-201701)和国家重点研发计划政府间科技创新合作重点专项(2016YFE0106700)资助

摘要 藻胆蛋白作为藻类特殊的捕光色素蛋白复合体, 有着独特的结构和功能. 目前藻胆蛋白主要有2个来源: 一是直接从天然藻体中分离提取; 二是将合成藻胆蛋白的基因转到基因工程宿主中, 通过体外重组方法获得. 通过从天然藻体提取藻胆蛋白不但生产成本较高, 而且副产物较多. 通过体外重组来实现藻胆蛋白的生产不仅可以降低经济和时间成本, 而且可以对藻胆蛋白的生物合成过程进行研究. 此外, 通过体外重组获得具有光学活性的藻胆蛋白时, 可以添加不同的分子标签, 从而拓展藻胆蛋白的应用范围. 本文对藻胆蛋白的体内生物合成和体外重组研究的最新进展做了综述.

关键词 藻胆蛋白, 生物合成, 体外重组, 抗氧化, 荧光

光合作用存在于地球上大约有40亿年的历史, 一些光合作用生物类群也随着光合作用的产生而相继出现^[1]. 为了有效地捕获光能, 这些光合作用生物类群进化出具有各自特有结构和功能的捕光天线系统, 例如以高等植物为主的叶绿素蛋白捕光天线体系以及以蓝藻和红藻为主的藻胆蛋白(phycobiliproteins, PBPs)捕光天线体系^[2].

20世纪60年代, Gantt和Conti^[3,4]在对紫球藻的叶绿体的超微结构研究时偶然发现了位于类囊体膜上的藻胆体(phycobilisome, PBS). 蓝藻和红藻中的藻胆体是迄今已知最大的捕光蛋白复合物, 它位于膜表面, 并与膜中的光合反应中心结合, 能将吸收的太阳能以极高的效率传递给光合反应中心. PBS由核心部分的核膜连接蛋白(LCM), 别藻蓝蛋白B(allophycocyanin-B, AP-B), 别藻蓝蛋白(allophycocyanin,

APC)及外周部分的藻蓝蛋白(phycoerythrin, PE)等组成^[5,6]. 2017年, 隋森芳研究组^[7]首次报道了世界上第一个完整PBS的近原子分辨率的冷冻电镜三维结构, 为揭示PBS组成单体的组装机制和光能传递途径奠定了重要基础.

PBPs是PBS的主要组成成分, 由藻胆素(phycobilin)和脱辅基蛋白(apo-protein)连接构成, 每个脱辅基蛋白可以连接1~3个藻胆素. 藻胆素通过自催化或者裂合酶的催化连接到脱辅基蛋白半胱氨酸(cysteine, Cys)的特殊位点上, 不同类型的藻胆素使不同PBPs具有不同的颜色及光谱性质^[8]. 根据吸收光谱的不同, PBPs可以分为4大类, 即藻红蛋白($\lambda_{\max}=540\sim570$ nm)、藻蓝蛋白($\lambda_{\max}=615\sim640$ nm)、藻红蓝蛋白(Phycoerythrocyanin, PEC)($\lambda_{\max}=567$ nm)和别藻蓝蛋白($\lambda_{\max}=650\sim655$ nm)^[9,10]. 与叶绿素不同,

引用格式: 马丞博, 秦松, 李文军, 等. 藻胆蛋白生物合成研究进展. 科学通报, 2019, 64: 49–59

Ma C B, Qin S, Li W J, et al. Progress in biosynthesis of phycobiliprotein (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 49–59, doi: 10.1360/N972018-00758

藻胆素是一类开链的四吡咯结构的化合物,存在于蓝细菌、红藻和一些隐藻细胞内^[11]. 根据颜色的不同,藻胆素可大致分为:蓝色的藻蓝胆素(phycoerythrobilin, PCB)、红色的藻红胆素(phycoerythrobilin, PEB)、紫色的藻紫胆素(phycoerythrobilin, PVB)和黄色的藻尿胆素(phycoerythrobilin, PUB)等^[12,13].

PBPs作为一种特殊的蛋白,既可以作为天然色素用于食品、化妆品和染料等工业,也可制成荧光试剂,用于临床医学诊断、免疫化学及生物工程等研究领域;此外,由于它还具有抗氧化、抗炎症和提高免疫力等作用,还可以将其应用于医疗健康领域. PBPs应用范围广阔,具有很高的开发和利用价值.

然而,直接从藻类中分离提取天然PBPs成本比较高,工艺比较复杂,副产物较多. 通过基因工程技术,不仅可以大规模、低成本的生产重组PBPs,而且可以对其结构进行改造,从而有效拓宽其应用领域.

1 藻胆蛋白的体内生物合成

PBPs在藻体的生物合成过程主要包括:藻胆素的合成、脱辅基蛋白和裂合酶的合成,最后藻胆素在裂合酶的催化下与脱辅基蛋白共价结合,组装成完

整的PBPs.

1.1 藻胆素的生物合成

藻胆素的生物合成源自藻体内的亚铁血红素的代谢途径. 在血红素氧化酶(heme oxygenase, HO)的作用下亚铁血红素被氧化形成胆绿素(biliverdin IX α),然后在铁氧化还原酶家族的作用下,IX α 转化为其他类型的藻胆素^[14]. 目前发现的铁氧化还原酶家族主要有5种,分别为:藻红胆素还原酶 A(phycoerythrobilin synthase-A, PebA)、藻红胆素还原酶 B(phycoerythrobilin synthase-B, PebB)、藻蓝胆素还原酶(phycoerythrobilin: ferredoxin oxidoreductase, PcyA)、藻红胆素合成酶(phycoerythrobilin synthase, PebS)、植物色素合成酶(phytoerythrobilin synthase, HY2)^[15,16]. 其中, PcyA催化IX α 生成PCB^[17], PebS 催化IX α 生成PEB, HY2催化IX α 生成P Φ B, PebA和PebB共同的催化结果与PebS的催化结果相同,均形成PEB^[18]. 研究表明, PCB及PEB与脱辅基蛋白连接时,往往会伴随着异构作用的发生,一般认为PVB及PUB分别是PCB及PEB在裂合酶的异构作用下产生的^[19,20],如图1所示.

图1 (网络版彩色)藻胆素之间的转化^[21]

Figure 1 (Color online) Transformation between phycobilin^[21]

1.2 裂合酶

PBPs生物合成的关键一步是将藻胆素共价连接到脱辅基蛋白的特定半胱氨酸上,除APC α 亚基和核膜连接蛋白LCM等2个蛋白具有自催化连接藻胆素功能之外,该步反应过程均离不开裂合酶的催化^[22,23]。

1992年,Zhou等人^[24]从*Synechococcus* sp. PCC 7002中第一次分离得到E/F类裂合酶,并发现CpcE/F裂合酶能催化PCB连接到PC α 亚基的Cys⁸⁴位点上。该类酶不但能够催化PCB与脱辅基蛋白偶联,还可以将PCB从脱辅基蛋白上解离下来^[25]。PecE/F是在*Nostoc* PCC7120和*Mastigocladus iaminosus*中被发现的CpcE/F同源蛋白,是一种新型E/F类裂合酶^[26]。该酶能够将PCB异构化成PVB,同时催化PVB连接到PEC α 亚基的Cys⁸⁴位点上^[27]。

S/U类裂合酶是被发现的第3类裂合酶,其位点特异性较强^[27],能够催化藻胆素与PC β 亚基的Cys⁸⁴位点及APC α 或 β 亚基的Cys⁸⁴位点结合。而且S/U类裂合酶与E/F类裂合酶不同,只能催化藻胆素结合到脱辅基蛋白上,却不能催化二者的解离^[28]。

S/U类裂合酶的发现源自于Cobley等人^[29]2002年在*Fremyella diplosiphon*中编码PE连接蛋白的操纵子*cpeCDEST*R中,发现了可能与PE的生物合成相关的基因*cpeST*。研究者通过对*Synechococcus* sp. PCC 7002基因组的分析,发现了与*cpeST*基因同源的未知基因,而且发现此类基因只存在于合成PBPs的藻类中,不合成PBPs的生物中并不存在,因此确定该基因与藻类PBPs的合成相关^[27]。由于PE不能在*Synechococcus* sp. PCC 7002中进行表达,所以将在此类藻中发现的与*cpeST*基因同源的蛋白命名为CpcS,将另2个与CpcS同源的蛋白分别命名为CpcU和CpcV^[30,31]。由于CpcV的功能尚未确定,因此将本类裂合酶称为S/U类裂合酶。

在*Synechococcus* sp. PCC 7002中,单独的CpcS和CpcU往往不能起到催化作用,只有形成异源二聚体才能发挥出裂合酶的催化功能^[30,31]。值得一提的是,Zhao等人^[32]从*Anabaena* sp. PCC 7120中克隆得到的藻胆蛋白裂合酶CpeS1可以单独起到催化作用,并且证明其可以作用于除PC和PEC的 α 亚基外所有PBPs的Cys⁸⁴结合位点。

Synechococcus sp. PCC 7002中的基因*cpcT*与上面提到的*Fremyella diplosiphon*中的*cpeT*是同源基

因。研究表明,*cpcT*及其同源基因几乎存在于所有的藻类中^[27]。CpcT能催化藻胆素与PC β 亚基的Cys¹⁵³位点特异性连接,它的同源蛋白CpeT能催化藻胆素特异性结合到PC或PEC β 亚基Cys¹⁵³位点上^[33]。

2 体外重组合成藻胆蛋白

目前用于体外重组合成PBPs的基因工程宿主菌种主要为大肠杆菌和毕赤酵母2种。由于大肠杆菌和毕赤酵母本身可以合成藻胆素的前体亚铁血红素,所以可以将藻胆素合成的相关基因,脱辅基蛋白的表达基因以及裂合酶的相关基因转入大肠杆菌或者毕赤酵母中进行表达,从而实现体外重组合成PBPs。

2.1 藻胆素的体外重组

在大肠杆菌自身血红素生物合成途径的基础上,以血红素为底物,通过外源导入含有*hol*和相关的铁氧化还原酶基因的不同表达载体,从而在大肠杆菌体内构建藻胆素的生物合成途径。

藻胆素是天然PBPs中的捕光色素,具有抗氧化等多种作用。目前藻胆素通常使用甲醇回流法,从天然藻类中提取,但是从天然藻细胞中提取藻胆素,耗费的经济和时间成本较高,所以需要寻找另一种更方便经济的途径来获取藻胆素。Ge等人^[34]将来自于*Synechocystis* sp. PCC 6803的*hol*和*pcyA*基因克隆到pET28a载体中,然后将重组载体导入大肠杆菌中并组合表达生产PCB,通过优化条件使PCB产量达3 mg/L。在此基础上,Ge等人^[35]又对体外重组PCB涉及的整个血红素生物合成途径的组装和调控过程进行了研究,发现含有双顺反子系统的质粒明显高于单顺反子系统质粒的表达效率,通过ALA和血红素的积累量对PCB产量的影响研究发现,减少ALA和血红素形成副产物或减少血红素代谢的反馈抑制可以增加PCB的产量。此外,Stiefelmaier等人^[36]于2018年将外源的*hol*和*pebS*基因导入大肠杆菌进行PEB的表达,并通过摇瓶及发酵罐优化使PEB的产量达到5.02 mg/L。

2.2 脱辅基蛋白体外重组

1985年,Bryant等人^[37]通过将来自*Cyanophora paradoxa*的APC基因和*Synechococcus* sp. PCC7002的PC基因整合到大肠杆菌中,从而最先实现脱辅基PBPs体外重组表达。

秦松研究员的课题组在体外重组脱辅基PBP方面做了大量的工作. 1998年, 秦松课题组^[38-40]将APC基因从质粒pCRBapc切下克隆到含有麦芽糖结合蛋白(MBP)的载体pMAL-p2X中, 然后将载体导入大肠杆菌中, 成功表达了N端融合麦芽糖结合蛋白(MBP)的重组脱辅基APC, 并将重组脱辅基蛋白命名为雷普克(Recombinant Allophycocyanin, rAPC)(表1). 2004年, 在rAPC的基础上, 该课题组又构建了带有组氨酸(His)标签的新型的重组脱辅基藻蓝蛋白(His-tag APC, HAPC), 并命名为海普克^[41], 并且来自于蓝藻*Anacystis nidulans* UTEX 625的APC的 α 和 β 亚基基因进行了克隆、表达及重组蛋白的纯化^[42]. 和雷普克相比, 海普克的空间结构更接近于天然脱辅基APC. 除了将APC基因转到大肠杆菌表达外, Ren等人^[43]在2005年成功实现了将rAPC的基因整合到巴斯德毕赤酵母基因组中进行稳定表达.

除了在脱辅基APC的表达纯化等研究外, 2001年, 隋正红和张学成^[44]通过PCR技术从红藻龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)中克隆得到了PE α 和 β 亚基基因, 并将其在大肠杆菌中成功表达. 2007年Wen等人^[45]将重组质粒pGEX-PE和pBGL转入大肠杆菌中以制备2种重组菌BEX(pGEX-PE)和BGL(pBGL), 并通过Western印迹分析确定重组PE的特异性表达. 2004年, 于平等^[46]成功地将极大螺旋藻PC基因在巴斯德毕赤酵母X-33进行表达.

2.3 荧光藻胆蛋白体外重组

(i) 藻蓝蛋白. 2001年, Glazer研究组^[47]最先成功地将2个携带5个基因的载体pBS414V-*cpcA-cpcE-cpcF*和pAT101-*ho1-pcyA*转入*E. coli*体内进行表达, 实现了结合PCB的完整PC α 亚基(holo-CpcA)的体外重组. 为了证明裂合酶CpcE/F对PCB与脱辅基PC结合的催化效率, 赵开弘课题组^[48]于2006年来自于*Anabaena* sp. PCC 7120包括*cpcE/F*在内的5个基因分别构建于3个表达载体, 并通过荧光光谱法对裂合酶CpcE/F的催化效率进行了研究. 之后, 秦松课题组^[49]通过将5个来自于*Synechocystis* sp. PCC6803的藻胆蛋白合成相关基因构建于一个表达载体pCDFDuet-*cpcA-cpcE-cpcF-ho1-pcyA*, 获得了能够稳定表达的大肠杆菌表达体系, 并于2009年通过His6和MBP双标签获得了高可溶和更高稳定性的荧光PC^[50]. PC的 α 亚基不仅可以结合PCB而且还能实现与

表1 脱辅基藻胆蛋白的生物合成研究进展

Table 1 Progress on biosynthesis of apo-phycocyanobilins

年份	研究者	研究成果
1998年	Qin等人 ^[40]	成功表达了N端融合麦芽糖结合蛋白(MBP)的重组APC, 并将该重组APC命名为雷普克
2001年	隋正红和张学成 ^[44]	从红藻龙须菜(<i>Gracilaria lemaneiformis</i>)中克隆PE β 亚基基因并在大肠杆菌中进行表达
2004年	林凡 ^[41]	构建了带有His6标签的新型的重组脱辅基APC, 并命名为海普克
	于平等 ^[46]	成功地将极大螺旋藻PC基因在巴斯德毕赤酵母X-33进行表达
	Qin等人 ^[42]	提供了一种用于生物医学和生物技术应用的重组APC亚基的制备方法
2005年	Ren等人 ^[43]	将rAPC的基因整合到巴斯德毕赤酵母基因组中进行表达

PEB的共价连接. 2017年, Ge等人^[51]在大肠杆菌中组合生物合成了分别与PCB和PEB结合的链霉菌素素荧光PC—SA-PCA-PEB和SA-PCA-PCB.

对携带PCB的holo-CpcB的体外重组研究源自Shen等人^[31]于2006年发现裂合酶CpcT能够催化PCB与PC β 亚基Cys¹⁵³位点的结合. 随后对holo-CpcB的研究发现, 来自*Nostoc* PCC7120的*cpcS1*, *Synechocystis* sp. PCC6803的*cpcM*以及2011年发现的新基因*slr2049*等编码的裂合酶都可以作用于脱辅基PC β 亚基与PCB的共价结合^[52-54]. 2012年, 秦松课题组在螺旋藻脱辅基PC的Cys⁸²和Cys¹⁵³两个位点进行定点突变修饰, 构建了两个重组表达载体pCDFDuet-*cpcB* (C153A)-*slr2049-sll0583-ho1-pcyA*和pCDFDuet-*cpcB* (C82I)-*slr2049-sll0583-ho1-pcyA*, 并将其转化到大肠杆菌中进行表达, 成功制备了荧光holo-CpcB^[55].

(ii) 藻红蛋白. 关于PE的体外重组研究相对较少. 20世纪90年代, Kahn等人^[56]发现裂合酶CpeY和CpeZ可能会催化PE的 α 及 β 亚基与PEB共价结合. 2006年, Isailovic等人^[57]将来自于红藻*Polysiphonia boldii*的带有组氨酸标签的脱辅基PE的 α 和 β 亚基的基因转入大肠杆菌, 并实现在大肠杆菌中与PEB的结合, 生成重组荧光PE. 此外, 2007年, 赵开弘课题组^[32]发现来自*Anabaena* sp. PCC 7120中的裂合酶CpeS1催化范围较广, 除了能够催化C-PC和PEC的 β 亚基外, 还能催化APC和C-PE的全部亚基与PCB及PEB的共价偶联.

(iii) 藻红蓝蛋白. 2000年, 赵开弘课题组^[58]从*Mastigocladus luminous*中克隆了基因*pecA*, 并实现

该基因编码的脱辅基PEC α 亚基在裂合酶PecE/F催化作用下与PCB相结合(同时PCB在异构酶的作用下可异构化为PVB), 生成了荧光藻胆蛋白PVB-PecA, 随后利用紫外可见吸收光谱、荧光光谱及圆二色光谱性质等光谱性质比较了通过裂合酶催化与自发结合形成的holo-PEC α 亚基的光活性差异^[59]。2002年, 美国加州大学的Glazer研究组^[60]进行了holo-PecA在大肠杆菌中的体外重组, 并通过光谱特性验证了重组与生物体自发生成的holo-PEC α 亚基具有相似的光学活性, 同时根据裂合酶PecE/F的缺失对重组holo-PecA生成的影响, 验证了裂合酶PecE/F的活性。

(iv) 别藻蓝蛋白。2006年, Ping-Chiang Lyu课题组^[61]将包括cpcE/F在内的5个基因克隆到大肠杆菌体内进行holo-ApcA的体外重组。研究发现, 来自于*Spirulina* sp.的ApcA不需要裂合酶的催化就能与PCB共价结合, 所得到的holo-ApcA与天然APC的 α 亚基具有相似的光谱性质, 该过程并不依赖于裂合酶CpcE/F的催化作用。为了获得更加高效并且能够稳定遗传的APC α 亚基, 秦松课题组2008年使用一个表达载体pCDFDuet, 实现了大肠杆菌体内cpcE/F在内的5个基因的共表达, 大大降低了发酵过程中质粒不稳定性的风险。之后他们又通过His6标签一步纯化法完成重组蛋白的纯化, 并探索了重组PBP的抗氧化性及其在药物中的应用^[62,63]。随后, 赵开弘课题组^[64]为了研究别藻蓝蛋白ApcA2的生物合成途径, 将从*Anabaena* sp. PCC7120中扩增出的apcA2基因, PCB合成基因及裂合酶基因 cpeS1分别克隆到3个表达载体, 并转入大肠杆菌中共表达。实验结果表明在大肠杆菌内合成了具有荧光活性的重组藻胆蛋白PCB-ApcA2。在前面关于APC α 亚基研究的基础上, Wu等人^[65]于2016年比较了来自*Synechocystis* sp. PCC6803和*Thermosynechococcus elongatus* BP-1的apcA在大肠杆菌中组装成的holo-ApcA在不同pH下的光稳定性, 随后Chen等人^[66]又实现带有链霉素标记ApcA(SA-Linker-ApcA, SLA)在裂合酶CpcS的催化下与PEB及PCB的共价结合。

对于holo-ApcB的体外重组, 秦松课题组^[67]在2009年用pCDFDuet一个表达载体上的2个可读框, 实现了来自*Synechocystis* sp. PCC 6803的holI, pcyA, *Spirulina* sp.的apcB及*Anabaena* sp. PCC7120的cpeS等5个基因的共表达。同时运用His6标签简化了蛋白纯化步骤, 并于2013年将2个表达载体共同转入大肠杆

菌, 获得了嗜热蓝藻*Synechococcus elongatus*和嗜温蓝藻*Synechocystis* sp. PCC 6803的荧光holo-ApcB^[68]。

APC位于藻胆体核心, 以三聚体的形式参与光能运动, 具有特殊光谱特征。在大肠杆菌体外重组荧光APC α 亚基和 β 亚基的基础上, 2010年秦松课题组^[69]研究了集胞藻APC三聚体的体外组装过程, 使用pCDFDuet-1和pRSFDeut-1两个表达载体, 在大肠杆菌中完成5个基因共表达, 成功获得了具有天然APC三聚体相似的重组APC三聚体(表2)。

3 重组藻胆蛋白的应用研究

3.1 抗氧化抗肿瘤

研究表明, 重组PBP具有抗氧化及抑制多种肿瘤细胞的作用。秦松课题组在重组藻胆蛋白的抗氧化和抗肿瘤方面做了大量的工作。2005年, Ge等人^[70]改进了雷普克的纯化工艺, 并通过脱氧核糖测定法评估其抗氧化性质, 证明其具有清除自由基和抗氧化活性, 推测其抗氧化活性可能是雷普克抗肿瘤作用的部分原因。随后, 韩璐^[71]通过对几种重组APC抗氧化活性进行比较, 筛选出分子量小、具有高效抗氧化活性的海普克, 为后期研究海普克的抗肿瘤活性提供了资料。除了对重组APC的抗氧化和抗肿瘤的研究外, 该课题组还发现重组的PE同样具有羟基自由基的清除能力和抑制肿瘤细胞生长的活性, 具有潜在的医学价值^[45]。

据报道, 来自蓝绿藻的C-藻蓝蛋白(C-PC)具有各种药理学特征, 包括抗炎和抗肿瘤活性。2006年, Wang等人^[72]发现在大肠杆菌中重组的CPC β 亚基具有抗癌特性, 在5 mmol/L的CPC β 亚基处理下, 4种不同的癌细胞系出现了高增殖抑制和凋亡诱导现象, 对癌症预防和治疗具有一定的指导意义。

2013年, 泰国的Pleonsil等人^[73]对在大肠杆菌重组的PC与从螺旋藻中提取的PC进行了抗氧化活性的对比, 结果表明重组PC比天然提取PC具有更高的抗氧化活性。通过对比可以得出重组PC相对于天然PC具有更好的医疗应用前景。

3.2 荧光应用

荧光蛋白(FPs)是生物医学研究的重要工具之一。20多年前, Chalfie等人^[74]将*Aequorea victoria*的绿色荧光蛋白(GFP)基因转入大肠杆菌或者线虫体内来监

表2 体外生物合成全亚基藻胆蛋白研究进展

Table 2 Advances in *in vitro* biosynthesis of holot-subunit phycobiliproteins

编号	年份	脱辅基蛋白基因	脱辅基蛋白基因来源	裂合酶	裂合酶基因来源	载体	文献
CPC α							
1	2001	<i>cpcA</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	<i>cpdE/F</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	pBS414V- <i>cpcA-cpcE-cpdF</i> ; pAT101- <i>hol-1-psyA</i>	[47]
2	2006	<i>cpcA</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	<i>cpdE/F</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	pETDuet- <i>cpcA</i> , pACYCDuet- <i>hol-1-psyA</i> , pCOLADuet- <i>cpcE-cpdF</i>	[48]
3	2007	<i>cpcA</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	<i>cpdE/F</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	pCDF- <i>cpcA-cpcE-cpdF-hol-1-psyA</i>	[49]
4	2009	<i>cpcA</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	<i>cpdE/F</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	pHMP- <i>cpcA-cpcE-cpdF-hol-1-psyA</i>	[50]
5	2017	<i>cpcA</i>	—	<i>cpdE/F</i>	—	pCDFDuet- <i>sa-cpcA-cpdE/F-hol-1-psyA</i> ; pCDFDuet- <i>sa-cpcA-cpdE/F-hol-1-pebS</i>	[51]
CPC β							
6	2006	<i>cpcB</i> Cys ¹⁵³	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	<i>cpdT</i>	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	—	[31]
7	2007	<i>cpcB</i> Cys ¹⁵⁵	—	<i>cpdT1</i> <i>cpdS1</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	—	[52]
8	2008	<i>cpcB</i> Cys ⁸⁴	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	<i>cpdM</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	—	[53]
9	2011	<i>cpcB</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	<i>slr2049</i>	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	pET- <i>hol-1-psyA</i> , pCDF- <i>cpcB-slr2049</i>	[54]
10	2012	<i>cpcB</i> Cys ⁸² , <i>cpcB</i> Cys ¹⁵³	<i>Spirulina platensis</i> (Sp)	<i>slr2049</i> ; <i>slr0583</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803; <i>Spirulina platensis</i> (Sp)	pCDF- <i>cpcB</i> (C153A)- <i>slr2049-slr0583-hol-1-psyA</i> ; pCDF- <i>cpcB</i> (C82)- <i>slr2049-slr0583-hol-1-psyA</i>	[55]
PE							
11	1997	<i>cpeA/B</i>	—	<i>cpeY/Z</i>	<i>Pseudanabaena</i> sp. Strain PCC 7409; <i>Synechococcus</i> sp. strain WH 8020	—	[56]
12	2006	R- <i>peA/B</i>	<i>Polisiphonia boldii</i>	—	—	—	[57]
13	2007	<i>cpeA/B</i>	—	<i>cpdS1</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	—	[32]
PEB α							
14	2000	<i>pecA</i>	<i>Mastigocladus laminosus</i>	<i>pecE/F</i>	<i>Mastigocladus laminosus</i>	pGEMEX- <i>pecA</i> , pGEMEX- <i>pecE</i> ; pGEMEX- <i>pecF</i>	[58]
15	2001	<i>pecA</i>	<i>Mastigocladus laminosus</i>	<i>pecE/F</i>	<i>Mastigocladus laminosus</i>	pGEMEX- <i>pecA</i> , pGEMEX- <i>pecE</i> ; pGEMEX- <i>pecF</i>	[59]
16	2002	<i>pecA</i>	—	<i>pecE/F</i>	—	—	[60]
17	2007	<i>pecA</i>	—	<i>cpdS1</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	—	[32]
PEB β							
18	2007	<i>pebB</i> Cys ⁸⁴	—	<i>cpdT1</i> <i>cpdS1</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	—	[32]
APC α							
19	2006	<i>apcA</i>	<i>Spirulina</i> sp.	自催化	—	pCDFDuet- <i>apcA-cpcE-cpdF-hol-1-psyA</i>	[61]
20	2008	<i>apcA</i>	<i>Spirulina platensis</i>	<i>cpdE/F</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	pCDFDuet-1- <i>apcA-psyA-hol</i>	[63]
21	2009	<i>apcA</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	自催化	—	pCDFDuet-1- <i>apcA-psyA-hol</i>	[62]
22	2009	<i>apcA2</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	<i>cpdS1</i>	—	pET- <i>apcA2</i> ; pCDFDuet- <i>cpcS1</i> ; pACYCDuet- <i>hol-1-psyA</i>	[64]
23	2015	<i>apcA</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	<i>cpdU/S</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	pCDFDuet- <i>apcA-hol-1-psyA</i> , pRSFDuet- <i>cpcU/S</i>	[66]
24	2017	<i>apcA</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	<i>cpdS1</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	SA-Linker- <i>ApcA</i> ; pCDF- <i>SLA-CpcS</i> , pRSF- <i>Ho1-PebS</i> , pRSF- <i>Ho1-PcyA</i>	[65]
APC β							
25	2007	<i>apcB</i>	—	<i>cpdS1</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	—	[32]
26	2008	<i>apcB</i> ; <i>apcF</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	<i>cpdM</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	—	[53]
27	2009	<i>apcB</i>	<i>Spirulina</i> sp.	<i>cpdS</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	pCDFDuet-1- <i>apcB-cpcS-hol-1-psyA</i>	[67]
28	2013	<i>apcB</i>	<i>S. elongatus</i> BP-1	<i>cpdU/S</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	pRSFDuet-1- <i>apcB</i> , pRSFDuet-1- <i>cpcU-cpcS1</i> ; pCDFDuet-1- <i>hol-1-psyA</i>	[68]
APC Trimer							
29	2010	<i>apc</i> Trimer	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>cpdU/S</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	pCDFDuet-1- <i>apcA-hol-1-psyA</i> ; pRSFDuet-1- <i>apcB-cpcU-cpcS1</i>	[69]

控活体中基因的表达及蛋白的定位。

荧光PBP有着亮度高、斯托克斯位移长、稳定性好等优良的荧光特性,可以通过体外重组的方式使不同的脱辅基藻胆蛋白结合不同的藻胆素,从而增大PBPs荧光探针的斯托克斯位移(Stokes shift),弥补GFP发射光谱被局限于蓝色光和绿色光的瓶颈,提高PBPs荧光探针的性能及适用范围。

2006年, Isailovic等人^[57]通过流式细胞仪对含有重组PE的大肠杆菌和不含重组PBPs的大肠杆菌进行了光谱测量,结果显示:含有重组PE的大肠杆菌的荧光强度是不含PBPs的大肠杆菌的荧光强度的10倍。

APC具有良好的荧光特性,已被广泛用于抗体等的荧光标记。2009年秦松课题组^[62]研究表明,重组holo-ApcA同样具有良好的荧光性质,并且可以作为天然APC的良好替代物用于荧光标记。2013年, Chen等人^[68]对重组holo-apcBT与另外一重组holo-apcB进行稳定性与光谱性质的比较,研究结果表明,重组holo-apcBT的热稳定更好,具有更高的消光系数和荧光量子产率,是一种具有良好应用前景的荧光标签,可以作为天然APC的替代品。

具有特异荧光性质和有效靶向性荧光工具的开发在高通量免疫测定中非常重要。由于重组荧光PBPs具有良好的荧光特性及其与生物素结合的能力,所以结合具有靶向作用生物素的重组SA-PBPs是一种很有前途的荧光标记物。2017年, Ge等人^[51]将链霉亲和素和PBPs融合表达,在大肠杆菌中组合生物合成新的双功能链霉亲和素—藻胆蛋白(SA-PBPs),并将其用于检测肝癌的两种生物标志物 α -甲胎蛋白(AFP)和癌胚抗原(CEA),研究结果表明,这些新型双功能SA-PBP是可广泛使用于各种免疫测定的有用工具,并且具有更高的可扩展性和兼容性等优点。同

年, Wu等人^[65]构建并表达了2种具有强烈荧光的生物功能融合蛋白SLA-PEB和SLA-PCB,并发现SLA-PEB具有与SA-PE类似的检测灵敏度,可以作为常用天然PBPs的替代品,用于免疫荧光标记。

20世纪90年代, O'Regan等人^[75]研发了一种以二氧化钛多孔膜为光电极,通过光吸收诱导电荷分离的高效染料敏化太阳能电池(dye-sensitized solar cell, DSSC)。由于高效染料敏化太阳能电池具有成本低,光电转换效率较高等优点,所以引发了DSSC的研究热潮。PBPs的吸收光谱范围较广,可弥补叶绿素和胡萝卜素的吸收光区,因此可以将藻胆蛋白与叶绿素和胡萝卜素共价结合或者共同吸附于某种光电材料作为DSSC,该DSSC与传统单一的叶绿素敏化太阳能电池相比,可以大大提高光电转化效率。2013年, Pu等人^[76]将重组APC三聚体作为敏化材料,构建了基于重组PBPs的DSSC,该DSSC的测试结果显示:在100 mW/cm²的光强度下,光电转换效率达到0.26%,该测试结果表明重组APC三聚体可以作为一种光敏材料候选物,具有潜在的应用价值。

4 展望

通过构建基因重组PBPs表达工程菌,不仅可以获得低成本、高纯度的重组PBPs,而且利用蛋白质工程技术,可以设计重组PBPs的蛋白质结构,从而拓宽其应用领域。例如,基于MBP等分子标签构建的生物传感器已经逐渐成为研究热点^[77-79]。因此,带有不同分子标签的重组PBPs将有望应用于生物传感器领域。此外,通过建立人工靶向进化技术,可以构建能够捕获特定波长的重组PBPs。未来,基于高效捕获水下蓝绿光的重组PBPs所构建的DSSC,或许可以在水下光伏领域得到应用。

参考文献

- 1 Lockhart P J, Larkum A W, Steel M, et al. Evolution of chlorophyll and bacteriochlorophyll: The problem of invariant sites in sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1930-1934
- 2 Adir N. Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: Reconstructing a giant. *Photosynth Res*, 2005, 85: 15-32
- 3 Gantt E, Conti S F. The ultrastructure of porphyridium cruentum. *J Cell Biol*, 1965, 26: 365
- 4 Gantt E, Conti S F. Phycobiliprotein localization in algae. *Brookhaven Symp Biol*, 1966, 19: 393
- 5 Ducret A, Müller S A, Goldie K N, et al. Reconstitution, characterisation and mass analysis of the pentacylindrical allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Mol Biol*, 1998, 278: 369
- 6 Li W J, Pu Y, Niu Z, et al. Structural and functional investigation of allophycocyanin trimer (in Chinese). *Bull Sci Technol*, 2017, 62: 1699-1713 [李文军, 蒲洋, 牛壮, 等. 重组别藻蓝蛋白三聚体结构与功能. *科学通报*, 2017, 62: 1699-1713]

- 7 Zhang J, Ma J, Liu D, et al. Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica*. *Nature*, 2017, 551: 57
- 8 Chen Y. Studies on cyanobacteriochromes and the biosynthesis of phycoerythrin (in Chinese). Doctor Dissertation. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2012 [陈煜. 蓝细菌光敏色素及藻红蛋白的生物合成研究. 博士学位论文. 武汉: 华中科技大学, 2012]
- 9 Lundell D J, Glazer A N. Allophycocyanin B. A common beta subunit in *Synechococcus* allophycocyanin B (lambda max 670 nm) and allophycocyanin (lambda max 650 nm). *J Biol Chem*, 1981, 256: 12600
- 10 Maccoll R. Cyanobacterial phycobilisomes. *J Struct Biol*, 1998, 124: 311
- 11 Yi J J, Zang X N, Zhang X C, et al. Recombinant expression of a fluorescent phycocyanin holo- α -subunit from *Arthrospira platensis* in *Escherichia coli* (in Chinese). *Period Ocean Univ China*, 2011, 41: 59–62 [衣俊杰, 臧晓南, 张学成, 等. 具荧光活性的节旋藻藻蓝蛋白 α 亚基在大肠杆菌中的重组表达. 中国海洋大学学报, 2011, 41: 59–62]
- 12 Liu X. The research of gene *slr0853* from *Synechocystis* sp. PCC 6803 (in Chinese). Master Thesis. Wuhan: South-Central University for Nationalities, 2012 [刘欣. 集胞藻 pcc6803 基因 *slr0853* 的初步研究. 硕士学位论文. 武汉: 中南民族大学, 2012]
- 13 Chen M, Yang D L, Li X W. Characteristics and existential states of novel phycobiliproteins in cryptophyte algae (in Chinese). *Mar Sci*, 2017, 41: 128–136 [陈敏, 杨多利, 李雪薇. 特异的隐藻藻胆蛋白的性质及存在状态. 海洋科学, 2017, 41: 128–136]
- 14 Li W J. Preparation of new type of phycobiliproteins and application in biosensors and dye-sensitized solar cells (in Chinese). Doctor Dissertation. Yantai: Yantai Institute of Coastal Zone Reseach, Chinese Academy of Sciences, 2017 [李文军. 新型藻胆蛋白的制备及其在生物传感和染料敏化太阳能电池中的应用. 博士学位论文. 烟台: 中国科学院烟台海岸带研究所, 2017]
- 15 Tu S L, Rockwell N C, Lagarias J C, et al. Insight into the radical mechanism of phycocyanobilin-ferredoxin oxidoreductase (pcya) revealed by X-ray crystallography and biochemical measurements. *Biochemistry*, 2007, 46: 1484
- 16 Tu S, Chen H, Ku L. Mechanistic studies of the phytochromobilin synthase HY2 from *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2008, 283: 27555–27564
- 17 Okada K. *Hol* and *pcya* proteins involved in phycobilin biosynthesis form a 1:2 complex with ferredoxin-1 required for photosynthesis. *Febs Lett*, 2009, 583: 1251
- 18 Wu X J, Deng M G, Zhao K H, et al. Covalent attachment of various phycobilins to recombinant cyanobacteria phycocyanin RpcA (in Chinese). *J Huazhong Normal Univ (Nat Sci)*, 2012, 46: 606–610 [伍贤军, 邓明刚, 赵开弘, 等. 重组蓝细菌藻蓝蛋白 *rpca* 共价偶联多种藻胆色素. 华中师范大学学报(自然科学版), 2012, 46: 606–610]
- 19 Six C, Thomas J C, Thion L, et al. Two novel phycoerythrin-associated linker proteins in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain wh8102. *J Bacteriol*, 2005, 187: 1685–1694
- 20 Six C, Thomas J C, Garczarek L, et al. Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp.: A comparative genomics study. *Genome Biol*, 2007, 8: R259
- 21 Blot N, Wu X J, Thomas J C, et al. Phycourobilin in trichromatic phycocyanin from oceanic cyanobacteria is formed post-translationally by a phycoerythrobilin lyase-isomerase. *J Biol Chem*, 2009, 284: 9290–9298
- 22 Wu X J. Studies on biosynthesis and application of biliproteins of cyanobacteria (in Chinese). Doctor Dissertation. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013 [伍贤军. 蓝藻色素蛋白的生物合成及应用研究. 博士学位论文. 武汉: 华中科技大学, 2013]
- 23 Ma J F, Lin H Z, Qin S. Advances in cyanobacterial phycobilisome assembling *in vitro* (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2016, 46: 1054–1061 [马建飞, 林瀚智, 秦松. 蓝藻藻胆体的体外组装研究进展. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 1054–1061]
- 24 Zhou J, Gasparich G E, Stirewalt V L, et al. The *cpce* and *cpce* genes of *Synechococcus* sp. PCC 7002. Construction and phenotypic characterization of interposon mutants. *J Biol Chem*, 1992, 267: 16138–16145
- 25 Fairchild C D, Zhao J, Zhou J, et al. Phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 7017–7021
- 26 Zhao K H, Wu D, Wang L, et al. Characterization of phycoviolobilin phycoerythrocyanin- α 84-cystein-lyase-(isomerizing) from *Mastigocladus laminosus*. *Febs J*, 2010, 269: 4542–4550
- 27 Liu Q Z. Combinational biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial allophycocyanin thimer in *E. coli* (in Chinese). Master Thesis. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2013 [刘秋子. 荧光藻蓝蛋白在大肠杆菌内的生物合成与组装. 硕士学位论文. 青岛: 青岛科技大学, 2013]
- 28 Liu S F. Biosynthesis and assembly of cyanobacterial phycocyanin (in Chinese). Doctor Dissertation. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 [刘少芳. 蓝藻藻蓝蛋白的生物合成及组装的研究. 博士学位论文. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2010]
- 29 Cobley J G, Clark A C, Weerasurya S, et al. Cper is an activator required for expression of the phycoerythrin operon (*cpeba*) in the cyanobacterium *fremyella diplosiphon* and is encoded in the phycoerythrin linker-polypeptide operon (*cpecdestr*). *Mol Microbiol*, 2002, 44: 1517–1531
- 30 Shen G, Schluchter W M, Bryant D A. Biogenesis of phycobiliproteins: i. *Cpcs-i* and *cpcu* mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 define a heterodimeric phycocyanobilin lyase specific for beta-phycocyanin and allophycocyanin subunits. *J Biol Chem*,

- 2008, 283: 7503–7512
- 31 Shen G, Saunée N A, Williams S R, et al. Identification and characterization of a new class of bilin lyase. *J Biol Chem*, 2006, 281: 17768–17778
 - 32 Zhao K H, Su P, Tu J M, et al. Phycobilin: Cysteine-84 biliprotein lyase, a near-universal lyase for cysteine-84-binding sites in cyanobacterial phycobiliproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 14300–14305
 - 33 Zhang J, Sun Y F, Zhao K H, et al. Identification of amino acid residues essential to the activity of lyase CpcT1 from *Nostoc* sp. PCC7120. *Gene*, 2012, 511: 88–95
 - 34 Ge B S, Li Y, Sun H, et al. Combinational biosynthesis of phycocyanobilin using genetically-engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2013, 35: 689–693
 - 35 Ge B S, Chen Y, Yu Q, et al. Regulation of the heme biosynthetic pathway for combinational biosynthesis of phycocyanobilin in *Escherichia coli*. *Process Biochem*, 2018, 71: 23–30
 - 36 Stiefelmaier J, Ledermann B, Sorg M, et al. Pink bacteria—Production of the pink chromophore phycoerythrobilin with *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2018, 274: 47
 - 37 Bryant D A, Lorimier R D, Lambert D H, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the α and β subunits of allophycocyanin from the cyanelle genome of *cyanophora paradoxa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 3242
 - 38 Chen Y J. Exploration on the research of adsorbent and carrier for holo-phycobiliprotein (in Chinese). Doctor Dissertation. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2011 [陈英杰. 基于磁性纳米颗粒的荧光藻胆蛋白制备分离及载负应用研究探索. 博士学位论文. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2011]
 - 39 Sun Y X. Experimental study on the therapeutic effect of phycocyanin again plumonary pibrosis induced by paraquat in rats (in Chinese). Doctor Dissertation. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2012 [孙英新. 螺旋藻藻蓝蛋白抗百草枯诱导大鼠肺纤维化的研究. 博士学位论文. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2012]
 - 40 Qin S, Kojima H, Kawata Y, et al. Cloning and sequencing of the allophycocyanin genes from *Spirulina maxima* (cyanophyta). *Chin J Oceanol Limnol*, 1998, 16: 6–11
 - 41 Lin F. A new recombinant allphycocyanin and primary study of its bioactivities (in Chinese). Master Thesis. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2004 [林凡. 一种新型重组别藻蓝蛋白及其活性的初步研究. 硕士学位论文. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2004]
 - 42 Qin S, Tang Z, Lin F, et al. Genomic cloning, expression and recombinant protein purification of α and β subunits of the allophycocyanin gene (apc) from the cyanobacterium *anacystis nidulans* utex 625. *J Appl Phycol*, 2004, 16: 483–487
 - 43 Ren Y H, Ge B S, Jin H Z, et al. Effect of lanthanum on expression of recombinant allophycocyanin gene in *Pichia pastoris*. *J Rare Earths*, 2005, 23: 491–495
 - 44 Sui Z H, Zhang X C. Cloning of subunit genes of phycoerythrin of *Gracilaria lemaneiformis* and its expression in *E. coli* (in Chinese). *Chin High Technol Lett*, 2001, 11: 14–19 [隋正红, 张学成. 龙须菜藻红蛋白亚基基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达. 高技术通讯, 2001, 11: 14–19]
 - 45 Wen R, Sui Z, Zhang X, et al. Expression of the phycoerythrin gene of *Gracilaria lemaneiformis* (rhodophyta) in *E. coli* and evaluation of the bioactivity of recombinant PE. *J Ocean Univ China*, 2007, 6: 373–377
 - 46 Yu P, Cen P L, Li J R, et al. Expression of the phycocyanin gene from *Spirulina maxima* in *Pichia pastoris* X-33 (in Chinese). *Bull Sci Technol*, 2004, 20: 21–23 [于平, 岑沛霖, 励建荣, 等. 极大螺旋藻藻蓝蛋白基因在巴斯德毕赤酵母 X-33 中表达的研究. 科技通报, 2004, 20: 21–23]
 - 47 Tooley A J, Cai Y A, Glazer A N. Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial c-phycocyanin holo-alpha subunit in a heterologous host. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10560–10565
 - 48 Chen F, Zhou M, Zhao Y, et al. Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial c-phycocyanin holo-alpha subunit in *Escherichia coli*. *J Wuhan Botanical Res*, 2006, 24: 387–391
 - 49 Guan X, Qin S, Su Z, et al. Combinational biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial holo- α -phycocyanin in *Escherichia coli* by using one expression vector. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 142: 52–59
 - 50 Liu S, Chen H, Qin S, et al. Highly soluble and stable recombinant holo-phycocyanin alpha subunit expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Eng J*, 2009, 48: 58–64
 - 51 Ge B S, Lin X, Chen Y, et al. Combinational biosynthesis of dual-functional streptavidin-phycobiliproteins for high-throughput-compatible immunoassay. *Process Biochem*, 2017, 58: 306–312
 - 52 Zhao K H, Zhang J, Tu J M, et al. Lyase activities of cpes- and cpct-like proteins from *Nostoc* pcc7120 and sequential reconstitution of binding sites of phycoerythrocyanin and phycocyanin beta-subunits. *J Biol Chem*, 2007, 282: 34093–34103
 - 53 Miller C A, Leonard H S, Pinsky I G, et al. Biogenesis of phycobiliproteins. III. CpcM is the asparagine methyltransferase for phycobiliprotein beta-subunits in cyanobacteria. *J Biol Chem*, 2008, 283: 19293

- 54 Chen Q, Chen S, Song Q, et al. Molecular characterization of a novel gene from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Gene*, 2011, 488: 57–61
- 55 Song G X Z W. Combinational biosynthesis and characterization of a fluorescent 82 β -phycocyanin of *Spirulina platensis*. 2012, 57: 3294–3299
- 56 Kahn K, Mazel D, Houmard J, et al. A role for cpeyz in cyanobacterial phycoerythrin biosynthesis. *J Bacteriol*, 1997, 179: 998–1006
- 57 Isailovic D, Sultana I, Phillips G J, et al. Formation of fluorescent proteins by the attachment of phycoerythrobilin to *r*-phycoerythrin alpha and beta apo-subunits. *Anal Biochem*, 2006, 358: 38–50
- 58 Zhao K, Deng M, Zheng M, et al. Novel activity of a phycobiliprotein lyase: Both the attachment of phycocyanobilin and the isomerization to phycoviolobilin are catalyzed by the proteins pece and pecf encoded by the phycoerythrocyanin operon. *FEBS Lett*, 2000, 469: 9–13
- 59 Storf M, Parbel A, Meyer M, et al. Chromophore attachment to biliproteins: Specificity of pece/pecf, a lyase-isomerase for the photoactive 31-cys- α 84-phycoviolobilin chromophore of phycoerythrocyanin $\dagger$. *Biochemistry*, 2001, 40: 12444–12456
- 60 Tooley A J, Glazer A N. Biosynthesis of the cyanobacterial light-harvesting polypeptide phycoerythrocyanin holo- α subunit in a heterologous host. *J Bacteriol*, 2002, 184: 4666
- 61 Hu I, Lee T, Lin H, et al. Biosynthesis of fluorescent allophycocyanin α -subunits by autocatalytic bilin attachment. *Biochemistry*, 2006, 45: 7092–7099
- 62 Zhang W, Guan X, Yang Y, et al. Biosynthesis of fluorescent allophycocyanin α -subunits by autocatalysis in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 52: 135
- 63 Yang Y, Ge B S, Guan X, et al. Combinational biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial holo- α -allophycocyanin in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 1001–1004
- 64 Zhu J. Biosynthesis of allophycocyanin apca_2 *in vivo*. *J Huazhong Univ Sci Technol*, 2009, 37: 128–132
- 65 Wu J, Chen H, Zhao J, et al. Fusion proteins of streptavidin and allophycocyanin alpha subunit for immunofluorescence assay. *Biochem Eng J*, 2017, 125: 97–103
- 66 Chen H, Liu Q, Zhao J, et al. Biosynthesis, spectral properties and thermostability of cyanobacterial allophycocyanin holo- α subunits. *Int J Biol Macromol*, 2016, 88: 88–92
- 67 Ge B S, Sun H, Feng Y, et al. Functional biosynthesis of an allophycocyan beta subunit in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 2009, 107: 246–249
- 68 Chen H, Lin H, Li F, et al. Biosynthesis of a stable allophycocyanin beta subunit in metabolically engineered *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 2013, 115: 485–489
- 69 Liu S, Chen Y, Lu Y, et al. Biosynthesis of fluorescent cyanobacterial allophycocyanin trimer in *Escherichia coli*. *Photosynth Res*, 2010, 105: 135–142
- 70 Ge B S, Qin S, Han L, et al. Antioxidant properties of recombinant allophycocyanin expressed in *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B*, 2006, 84: 175–180
- 71 Han L. The antioxidant activities of six recombinant allophycocyanins (in Chinese). Master Thesis. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2006 [韩璐. 六种重组别藻蓝蛋白的抗氧化活性研究. 硕士学位论文. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2006]
- 72 Wang H, Liu Y, Gao X, et al. The recombinant beta subunit of c-phycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer Lett*, 2007, 247: 150–158
- 73 Pleonsil P, Soogarun S, Suwanwong Y. Anti-oxidant activity of holo- and apo-c-phycocyanin and their protective effects on human erythrocytes. *Int J Biol Macromol*, 2013, 60: 393–398
- 74 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263: 802–805
- 75 O'Regan B, Grätzel M. A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films. *Nature*, 1991, 353: 737–740
- 76 Pu Y, Zhu G L, Ge B S, et al. Photocurrent generation by recombinant allophycocyanin trimer multilayer on TiO₂ electrode. *Chin Chem Lett*, 2013, 24: 163–166
- 77 Medintz I L, Goldman E R, Lassman M E, et al. A fluorescence resonance energy transfer sensor based on maltose binding protein. *Bi-conjug Chem*, 2003, 14: 909–918
- 78 Povarova O I, Stepanenko O V, Sulatskaya A I, et al. High stability of trehalose/maltose binding protein from *Thermococcus litoralis* makes it a good candidate as a sensitive element in biosensor systems for sugar control. *Spectroscopy*, 2012, 24: 1–12
- 79 Fonin A V, Povarova O I, Staiano M, et al. The trehalose/maltose-binding protein as the sensitive element of a glucose biosensor. *Opt Mater*, 2014, 36: 1676–1679

Summary for “藻胆蛋白生物合成研究进展”

Progress in biosynthesis of phycobiliprotein

Chenbo Ma^{1,2}, Song Qin¹, Wenjun Li^{1*} & Baosheng Ge^{3*}

¹ Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China;

² College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China;

³ Center for Bioengineering and Biotechnology, China University of Petroleum (East China), Qingdao 266580, China

* Corresponding authors, E-mail: wjli@yic.ac.cn; gebaosheng@upc.edu.cn

Photosynthesis has existed on the earth for about 4 billion years, and the photosynthetic organisms have emerged with the production of photosynthesis. In order to effectively capture light energy and adapt their living environment, algae and higher plants have evolved different light-harvesting antenna systems during the long evolution, one is the chlorophyll based light harvesting systems present mainly in terrestrial organisms, such as higher plants; and the other is the phycobiliprotein (PBP) based phycobilisome system mainly in aquatic organisms, such as cyanobacteria, red algae and cryptophytes. As a special light-harvesting pigment-protein complex, PBP can not only capture light energy, also shows many unique characteristics, such as good fluorescent properties and lots of pharmaceutical activities. Therefore, PBPs have been extensively studied and commercially used in foods, cosmetics, biotechnology detection, pharmacological and medicine fields. Due to its broad excitation spectrum, nontoxic, stable fluorescence and high quantum yield, PBPs have also employed as valuable fluorescent probes for immunological diagnosis.

At present, there are mainly two ways to obtain fluorescent PBPs, one is to purify PBP directly from natural algae, and the other is to express recombinant PBP using genetic engineered host cells. Purification of PBPs from natural algae has many disadvantages, such as higher cost, complicated processes, and many by-products.

Using genetically engineered cell biotechnology, large-scale and low-cost production of recombinant PBPs can be achieved, which can help solve problems such as source, quality control and so on. Since natural PBPs are mostly in the form of polymers such as trimers or hexamers, it is difficult to study the assembly process. Through genetic engineering techniques, monomers or subunits can be obtained, which will help to study the assembly process of PBP. In addition, novel recombinant PBPs can be produced by molecular design to improve their fluorescence and biological activity. The study of the biosynthesis will help to elucidate the relationship between the structure and spectral properties of PBPs and provide a basis for the construction of solar energy utilization systems.

This review mainly focuses on the progress of combinational biosynthesis and *in vivo* reorganization of PBP in heterologous genetically engineered host cells, with emphasis on different genes coding for apo-PBPs and genes coding for different enzymes which catalyze the production of phycobilins from endogenous heme, along with the recent progress of three types of lyases which catalyze the covalently binding of phycobilins with apo-PBPs. The possible applications of these valuable recombinant PBPs were proposed as well.

phycobiliprotein, biosynthesis, *in vitro* recombination, antioxidant, fluorescent

doi: 10.1360/N972018-00758