

蓝藻 *Anabaena* sp. PCC7120 羧体 碳酸酐酶的鉴定*

吴天福 宋立荣 刘永定

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘要 在丝状蓝藻 *Anabaena* sp. PCC7120 细胞粗提液的碳酸酐酶(CA)分析中,发现了两种形式的 CA 活性.高 CO_2 下生长的细胞,在 $35\mu\text{mol/L}$ EZ(Ethoxycarbonyl, 碳酸酐酶的抑制剂)存在的情况下,CA 总活性的 85% 左右被抑制,其半抑制浓度 I_{50} 为 $7.4\mu\text{mol/L}$;随着 EZ 浓度的继续增加,CA 活性在 EZ 浓度达到约 $150\mu\text{mol/L}$ 处出现了第二个抑制峰,在 $250\mu\text{mol/L}$ 处抑制程度达到最大,使 CA 总活性的 15% 被抑制,其半抑制浓度 I_{50} 为 $190\mu\text{mol/L}$. 在空气条件下生长的细胞中也出现了 CA 的两个抑制峰:低 I_{50} 为 $6\mu\text{mol/L}$,高 I_{50} 为 $120\mu\text{mol/L}$. 对羧体的分离及体外测试表明,在羧体制备物中的 CA 活性只有一个 EZ 的抑制峰,而且在 EZ 浓度达到 $35\mu\text{mol/L}$,正如所期望的那样,该 CA 活性全部被抑制. 其半抑制浓度 I_{50} 为 $5.2\mu\text{mol/L}$ 左右. 这个值跟空气或高 CO_2 条件下生长的细胞粗提物中的低 I_{50} ($6\mu\text{mol/L}$ 或 $7.4\mu\text{mol/L}$) 十分相似. 说明低浓度的 EZ 可以特异性地抑制定位于羧体的 CA 活性. 另外一种形式的 CA, 具有高 I_{50} ($120 - 190\mu\text{mol/L}$), 约占 CA 总活性的 15 - 20%, 则有可能定位于细胞质膜.

关键词 蓝藻, *Anabaena* sp. PCC7120, 羧体碳酸酐酶

对单细胞蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 的研究认为,在羧体水平上对 CCM 起决定作用的有三个组分:一是羧体外被蛋白,阻止 CO_2 从羧体泄漏到胞液中;二是 RubisCO, 对 CO_2 进行高效固定;三是羧体碳酸酐酶(CA),负责把从胞液中进来的 HCO_3^- 转化为 CO_2 ,以提高羧化位点的 CO_2 浓度^[1, 2]. 羧体中碳酸酐酶作为蓝藻 CCM 的一个重要组分,对于减少 CO_2 从胞液中的泄漏及提高 RubisCO 羧化位点的 CO_2 浓度具有十分重要的意义. 本研究将对 *Anabaena* sp. PCC7120 中碳酸酐酶的存在形式作一探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 *Anabaena* sp. PCC7120 由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB - Collection)提供. 蓝藻的生长如以前所报道^[4].

1.2 羧体的制备 离心收集细胞(4000r/min , 10min),重悬于 Buffer I (0.6mol/L 蔗糖, 20mmol/L Tes - NaOH, $\text{pH}7.8$). 重新沉淀并再悬于内含溶菌酶(2mg/mL)的 10mL

* 本工作得到“海洋 863”项目(819 - 03 - 03 - 4);曾呈奎海洋科学基金及武汉市“晨光计划”的资助
1999-08-02 收到;1999-09-02 修回

Buffer I, 35℃, 黑暗中 2 h, 间震. 4000r/min 离心沉淀并重悬于 Buffer I, 洗涤再沉淀. 细胞重悬于 BufferII (20mmol/L Tes - NaOH, pH7.0, 5mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF), 使叶绿素浓度达到 0.4~0.6mg/ml. 超声破碎 50s, 粗提液 4000 r/min 离心 5min, 上清液加三倍体积 1×Buffer III (40mmol/L Caps - NaOH, pH8.0, 27mmol/L MgSO₄, 20% (v/v) Percoll, 0.133% Triton X-100), 混匀, 冰上保持 10min. 12,000r/min 离心 15min, 4℃. 重悬于 5ml 的 0.75×Buffer III (含 1% Triton X-100), 12,000r/min 离心 10min, 4℃. 重悬于 1ml 的 0.75×Buffer III, 转入 Eppendorf 管, 10,000g, 4℃, 5min. 所得沉淀物为羧体提取物. 重悬于 0.5ml 的 0.75×Buffer III, 置于冰上备用.

1.3 羧体 CA 活性的测定 如以前所报道^[3, 4].

2 结果与讨论

2.1 羧体的制备 *Anabaena* 细胞羧体的制备见材料和方法. 粗提液加入 Percoll 之后, 正如 Price 等描述的那样, 出现了乳状沉淀^[5]. 在 Mg²⁺ 存在的情况下, Percoll 可以使羧体聚集. 通过离心可以使羧体聚集物沉淀下来. 通过 0.1% Triton X-100 的作用, 可以使羧体聚集物中夹杂的类囊体膜部分溶解, 通过离心出现在上清液被丢弃. 通过 Triton X-100 反复洗涤和 percoll 的反复沉淀, 可以得到纯度比较高的羧体 - Percoll 聚集物.

2.2 *Anabaena* sp. PCC7120 细胞中 CA 的存在形式及其活性 在高 CO₂ 和空气中生长的 *Anabaena* sp. PCC7120 细胞, 其粗提物中表现出两种类型的 CA 活性(图 1). 高 CO₂ 下生长的细胞, 在 35μmol/L 处, CA 总活性的 85% 被抑制, 其半抑制浓度 I₅₀ 为 7.4μmol/L; 随着 EZ 浓度的继续增加, CA 活性在 EZ 浓度约为 150μmol/L 处出现了第二个抑制峰, 在 250μmol/L 处抑制程度达到最大, 使 CA 总活性的 15% 被抑制, 其半抑制浓度 I₅₀ 为 190μmol/L. 在空气条件下生长的细胞中也出现了 CA 的两个抑制峰: 低 I₅₀ 为 6μmol/L, 高 I₅₀ 为 120μmol/L. 这说明, *Anabaena* sp. PCC7120 中可能存在两种形式的碳酸酐酶. 在羧体制备物的 CA 活性分析中发现, 其中只有一个 EZ 的抑制峰, 而且在 EZ 浓度达到 35μmol/L 处, 正如所期望的那样, 该 CA 活性全部被抑制. 其半抑制浓度 I₅₀ 为 5.2μmol/L 左右(图 2), 这个值跟空气或高 CO₂ 条件下生长的细胞粗提物中的低 I₅₀ (6μmol/L 或 7.4μmol/L) 十分相似. 可见, 低浓度的 EZ 可以特异性地抑制定位于羧体的 CA 活性, 即低 I₅₀ 活性就是羧体 CA 活性. 在上述两种形式的碳酸酐酶中, 羧体 CA 是其中的一种, 而且约占总活性的 80% 以上. 另外一种形式的 CA, 具有高 I₅₀ (120-190μmol/L), 占 CA 总活性的 15-20%, 则定位于羧体外的某个位置. 根据 Price et al 的结论^[6], CA 在蓝藻胞液中的存在可能会使 HCO₃⁻ 库迅速转变为 CO₂, 从而引起 CO₂ 的大量泄漏和高 CO₂ 需求的表型. 因此, 具有高 I₅₀ 的 CA 很可能就定位于质膜, 并作为 CO₂ 泵的一个组分^[7, 8]. Price 等和 Yu 等在单细胞蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 的 CA 活性中也发现了两个类型的 EZ 抑制峰^[5, 9]. 不同的是, 除上述两种形式的 CA 活性外, Price 等还发现了一种对 EZ 高度不敏感(600μmol/L EZ 下仍存在)的 CA 活性组分. 该组分在 95℃ 下煮沸 5min 仍不失活, 因此认为可能是一种非酶组分. 按照他们的结论, 这种非酶组分应该属于定位于质膜的 CA 活性, 但事实上, 在羧体 CA 组分中他们也发现有这种非酶形式的 CA 活性. 在本研究中尚未发现这种情况, 在该领域的其它研究中也未发现类似的现象. 其中一个重要的

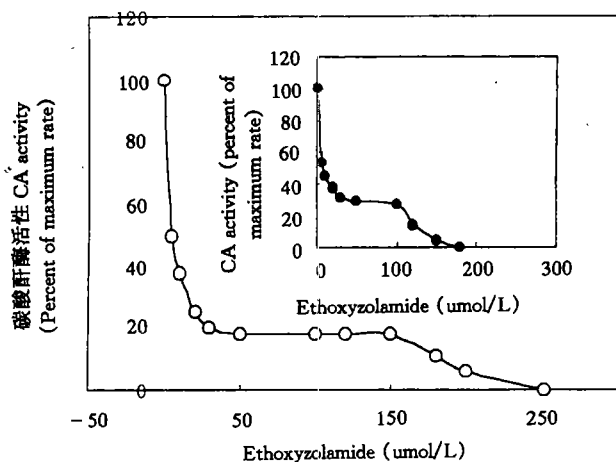


图1 细胞粗提物中 CA 活性对不同浓度 EZ 的反应. CA 测定中, T_0 为加入经沸水浴处理 (10min) 的粗提物所测得的值. 大图为高 CO_2 下生长的细胞, 其最大的 CA 活性为 $16.2 \text{ E.U. mg}^{-1}\text{Chl}$; 小图为空气中生长的细胞, 其最大活性为 $38.4 \text{ E.U. mg}^{-1}\text{Chl}$.

Fig.1 Effect of EZ on CA activity of high CO_2 -grown cells and air-grown cells (inset) in crude extracts. T_0 was obtained from the boiled (10min) extracts. The maximum CA activity of high CO_2 -grown cells and air-grown cells were $16.2 \text{ E.U. mg}^{-1}\text{Chl}$ and $38.4 \text{ E.U. mg}^{-1}\text{Chl}$, respectively.

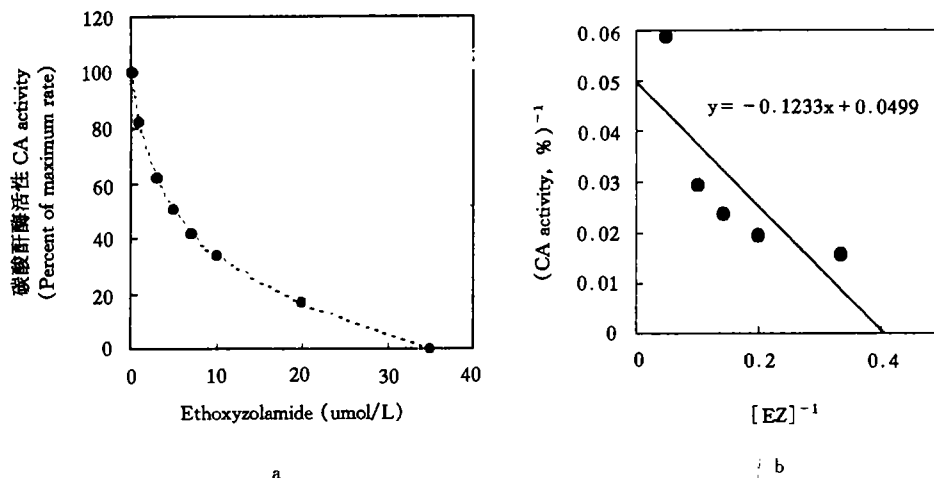


图2 高 CO_2 下生长的 *Anabaena* 细胞羧体制备物中 CA 活性对不同浓度 EZ 的反应. 羧体 CA 最大活性为 $28.8 \text{ E.U. mg}^{-1}\text{Chl}$. CA 测定方法同上, 测定时每次加入 $20\mu\text{l}$ 羧体制备物. b 为 a 的双倒数图.

Fig.2 CA activity of high CO_2 grown *Anabaena* cells in carboxysome preparations against the concentration of EZ. The maximum CA activity was $28.8 \text{ E.U. mg}^{-1}\text{Chl}$. CA was measured as above, $20\mu\text{l}$ -aliquot carboxysomal preparations was added for each assay. Double-reciprocal plots of the data in a were shown in b.

因素可能就是,他们在 CA 活性的测定过程中,没有排除其它成分的干扰^[10].

在高 CO₂ 下生长的细胞,其高 I₅₀ CA 活性为 2.43 E. U. mg⁻¹Chl,而空气中生长的细胞中高 I₅₀ CA 活性为 5.76 E. U. mg⁻¹Chl.说明高 I₅₀ CA 活性是可以诱导的,这与 CO₂ 运输系统对外源无机碳浓度的感知和适应有关.另外,根据蓝藻细胞中不同形式的碳酸酐酶对抑制剂 EZ 的敏感性,可以对该酶进行胞内定位.这在蓝藻碳酸酐酶的分布特点及功能研究中具有重要的意义.

参 考 文 献

- [1] Badger M R, Price G D. The CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria and green alga. *Physiol. Plant.* 1992, **84**: 606 - 615
- [2] Kaplan A, Schwar R, Lieman - Hurwitz J, et al. Physiological and molecular studies on the response of cyanobacteria to changes in the ambient inorganic carbon concentration. In Bryant D. [ed.] *Molecular biology of the Cyanobacteria*. Netherlands: Kluwer Academic, 1994, 469 - 485
- [3] Wu Tianfu, Song Lirong, Liu Yongding. Physiological aspects of a high - CO₂ requiring mutant and the high - CO₂ growing cells of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *CHIN. J. OCEANOL. LIMNOL.* 1998, **16**: 133 - 139
- [4] 吴天福,宋立荣,刘永定. 蓝藻 *Anabaena* sp. strain PCC7120 中一种可诱导的 CO₂ 浓缩机制. *科学通报*, 1999, **44**: 1527 - 1531
- [5] Price G D, Coleman J R, Badger M R. Association of carbonic anhydrase activity with carboxysomes isolated from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant physiol.* 1992, **100**: 784 - 793
- [6] Price G D, Badger M R. Expression of human carbonic anhydrase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 creates a high CO₂-requiring phenotype. Evidence for a central role for carboxysomes in the CO₂ concentrating mechanism. *Plant Physiol.* 1989c, **91**: 505 - 513
- [7] Price G D, Badger M R. Ethoxylamide inhibition of CO₂ uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 without apparent inhibition of internal carbonic anhydrase activity. *Plant Physiol.* 1989a, **89**: 37 - 43.
- [8] Espie G S, Miller A G, Calvin D T. High affinity transport of CO₂ in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX625. *Plant Physiol.* 1991b, **97**: 943 - 953
- [9] Yu J W, Price G D, Song L R et al. Isolation of a putative carboxysomal carbonic anhydrase gene from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Physiol.* 1992, **100**: 794 - 800
- [10] Badger M R, Price D G. Carbonic anhydrase activity associated with the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Physiol.* 1989, **89**: 51 - 60

CHARACTERIZATION OF CARBOXYSOMAL CARBONIC ANHYDRASE IN CYANOBACTERIUM *ANABAENA* SP. PCC7120

Wu Tianfu, Song Lirong and Liu Yongding

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract In this work, two types of carbonic anhydrase were found in the crude extracts of *Anabaena* sp. strain PCC7120. In high CO₂-grown cells, c. a. 85% total CA activity was inhibited by 35 μ mol/L EZ, and its half inhibited concentration (I_{50}) was 7.4 μ mol/L; With the elevation of EZ levels, the second peak of inhibition for CA appeared when the concentration of EZ reached 150 μ mol/L. The remaining 15% CA activity was completely inhibited in the presence of 250 μ mol/L EZ, and its I_{50} was 190 μ mol/L. In air-grown cells of *Anabaena* sp. PCC7120, the similar two peaks of inhibition for CA also appeared: the low I_{50} was 6 μ mol/L and the high I_{50} was 120 μ mol/L. Isolation of carboxysomes and the assays *in vitro* showed, that only one inhibition peak for CA appeared in the preparations of carboxysomes. As expected, the overall CA activity was inhibited in the presence of 35 μ mol/L EZ, with I_{50} of 5.2 μ mol/L, which was very similar to the low I_{50} value in the crude extracts of air-grown cells and high CO₂-grown cells. The results indicated that low levels of EZ specifically inhibited the CA located within carboxysomes. The other types of CA, which had a high I_{50} (120 – 190 μ mol/L) and contained c. a. 15 – 20% of the total CA activity of the crude extracts, probably located in the cell membrane.

Key words Cyanobacteria, *Anabaena* sp. PCC7120, Carboxysomal CA