

# 蓝藻 *Anabaena* sp. PCC7120 粱体 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<sub>2</sub> 下生长的细胞,在 35 μmol/L EZ(Ethoxyzolamide, 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 μmol/L;随着 EZ 浓度的继续增加,CA 活性在 EZ 浓度达到约 150 μmol/L 处出现了第二个抑制峰,在 250 μmol/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 μmol/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 μmol/L, 高  $I_{50}$  为 120 μmol/L. 对粱体的分离及体外测试表明,在粱体制备物中的 CA 活性只有一个 EZ 的抑制峰,而且在 EZ 浓度达到 35 μmol/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 μmol/L 左右. 这个值跟空气或高 CO<sub>2</sub> 条件下生长的细胞粗提物中的低  $I_{50}$ (6 μmol/L 或 7.4 μmol/L)十分相似. 说明低浓度的 EZ 可以特异地抑制定位于粱体的 CA 活性. 另外一种形式的 CA, 具有高  $I_{50}$ (120~190 μmol/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, 粱体碳酸酐酶

对单细胞蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 的研究认为,在粱体水平上对 CCM 起决定作用的有三个组分:一是粱体外被蛋白,阻止 CO<sub>2</sub> 从粱体泄漏到胞液中;二是 RubisCO, 对 CO<sub>2</sub> 进行高效固定;三是粱体碳酸酐酶(CA),负责把从胞液中进来的 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 转化为 CO<sub>2</sub>, 以提高粱化位点的 CO<sub>2</sub> 浓度<sup>[1, 2]</sup>. 粱体中碳酸酐酶作为蓝藻 CCM 的一个重要组分,对于减少 CO<sub>2</sub> 从胞液中的泄漏及提高 RubisCO 粱化位点的 CO<sub>2</sub> 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<sup>[4]</sup>.

**1.2 粱体的制备** 离心收集细胞(4000r/min, 10min), 重悬于 Buffer I (0.6mol/L 蔗糖, 20mmol/L Tes-NaOH, pH7.8). 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 Buffer II (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 MgSO<sub>4</sub>, 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<sup>[3, 4]</sup>.

## 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<sup>[5]</sup>. 在 Mg<sup>2+</sup> 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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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 I<sub>50</sub> 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 I<sub>50</sub> 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 I<sub>50</sub> 为 6μmol/L, 高 I<sub>50</sub> 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 I<sub>50</sub> 为 5.2μmol/L 左右(图 2), 这个值跟空气或高 CO<sub>2</sub> 条件下生长的细胞粗提物中的低 I<sub>50</sub> (6μmol/L 或 7.4μmol/L) 十分相似. 可见, 低浓度的 EZ 可以特异地抑制定位于羧体的 CA 活性, 即低 I<sub>50</sub> 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 I<sub>50</sub> (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<sup>[6]</sup>, CA 在蓝藻胞液中的存在可能会使 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 库迅速转变为 CO<sub>2</sub>, 从而引起 CO<sub>2</sub> 的大量泄漏和高 CO<sub>2</sub> 需求的表型. 因此, 具有高 I<sub>50</sub> 的 CA 很可能就定位于质膜, 并作为 CO<sub>2</sub> 泵的一个组分<sup>[7, 8]</sup>. 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<sup>[5, 9]</sup>. 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没有发现类似的现象. 其中一个重要的

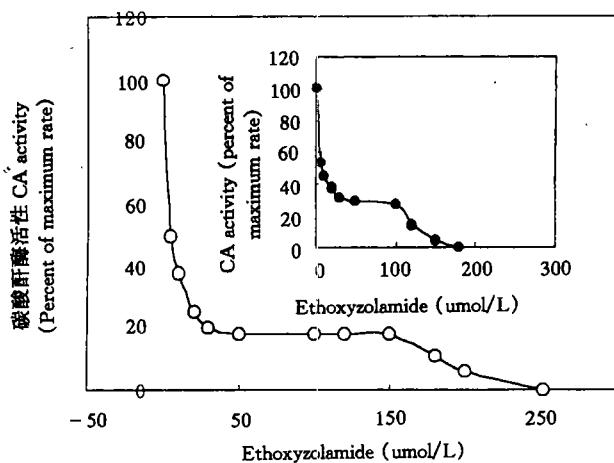


图1 细胞粗提物中 CA 活性对不同浓度 EZ 的反应. CA 测定中,  $T_0$  为加入经沸水浴处理 (10min) 的粗提物所测得的值. 大图为高  $\text{CO}_2$  下生长的细胞, 其最大的 CA 活性为  $16.2 \text{ E.U. mg}^{-1}\text{Chl}$ ; 小图为空气中生长的细胞, 其最大活性为  $38.4 \text{ E.U. mg}^{-1}\text{Chl}$ .

Fig. 1 Effect of EZ on CA activity of high  $\text{CO}_2$ -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  $\text{CO}_2$ -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.

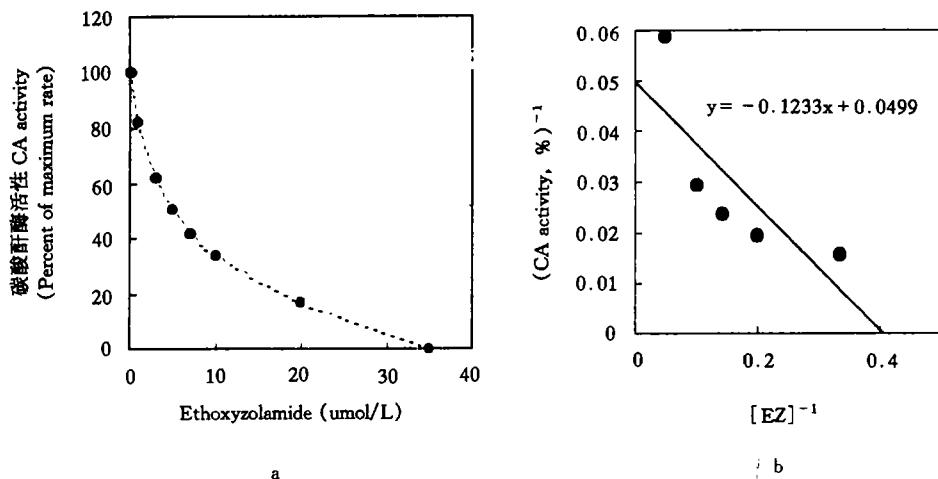


图2 高  $\text{CO}_2$  下生长的 *Anabaena* 细胞羧体制备物中 CA 活性对不同浓度 EZ 的反应. 纤体 CA 最大活性为  $28.8 \text{ E.U. mg}^{-1}\text{Chl}$ . CA 测定方法同上, 测定时每次加入  $20\mu\text{l}$  纤体制备物. b 为 a 的双倒数图.

Fig. 2 CA activity of high  $\text{CO}_2$  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<sup>[10]</sup>.

在高CO<sub>2</sub>下生长的细胞,其高I<sub>50</sub>CA活性为2.43 E.U.mg<sup>-1</sup>Chl,而空气中生长的细胞中高I<sub>50</sub>CA活性为5.76 E.U.mg<sup>-1</sup>Chl.说明高I<sub>50</sub>CA活性是可以诱导的,这与CO<sub>2</sub>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 CO<sub>2</sub> 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 - CO<sub>2</sub> requiring mutant and the high - CO<sub>2</sub> 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CO<sub>2</sub>浓缩机制.科学通报, 1999, **44**: 1527 - 1531
- [5] Price G D, Coleman J R, Badger M R. Asociation 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 CO<sub>2</sub>-requiring phenotype. Evidence for a central role for carboxysomes in the CO<sub>2</sub> concentrating mechanism. *Plant Physiol.* 1989c, **91**: 505 - 513
- [7] Price G D, Badger M R. Ethoxyzolamide inhibition of CO<sub>2</sub> 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, Canvin D T. High affinity transport of CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub>-grown cells, c. a. 85% total CA activity was inhibited by 35 $\mu$ mol/LEZ, and its half inhibited concentration (I<sub>50</sub>) was 7.4 $\mu$ mol/L; With the elevation of EZ levels, the second peak of inhibition for CA appeared when the concentration of EZ reached 150 $\mu$ mol/L. The remaining 15% CA activity was completely inhibited in the presence of 250 $\mu$ mol/L EZ, and its I<sub>50</sub> was 190 $\mu$ mol/L. In air-grown cells of *Anabaena* sp. PCC7120, the similar two peaks of inhibition for CA also appeared: the low I<sub>50</sub> was 6 $\mu$ mol/L and the high I<sub>50</sub> was 120 $\mu$ 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 $\mu$ mol/L EZ, with I<sub>50</sub> of 5.2 $\mu$ mol/L, which was very similar to the low I<sub>50</sub> value in the crude extracts of air-grown cells and high CO<sub>2</sub>-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<sub>50</sub> (120 – 190 $\mu$ 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