

藻类 CCM 分子生物学研究进展

Advancement in algal CCM molecular biology

何培民¹, 尹顺吉¹, 吴庆磊¹, 张荣铄²

(1.上海水产大学, 上海 200090; 2.南京农业大学, 江苏 南京 210095)

中图分类号: Q77 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)03-0071-05

1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Ribulose-Bisphosphate Carboxylase, EC4.1.1.39, 简称 Rubisco)是光合作用还原和光合氧化二个连锁循环的交叉点,为调节光合作用和光呼吸、决定净光合速率的第一个关键酶^[1]。Rubisco 的羧化和氧化作用的相对速率是由该酶周围环境中的 CO₂ 和 O₂ 的相对浓度所调节。因此,提高 Rubisco 周边环境 CO₂ 浓度,可以提高其羧化反应速度^[1,2]。藻类生活于水中(包括淡水和海水),而水中的 CO₂ 只有 10 μmol/L 左右,与空气中的 CO₂ 浓度(约 350 μmol/mol)相差很大^[2]。为了适应水中低 CO₂ 环境并保持较高的光合作用,藻类自身形成了其特有的提高 CO₂ 浓度方式,即藻类 CCM^[2-4]。目前关于 CCM 的本质还不清楚,以及其主要组分叶绿体碳酸酐酶也还不清楚。因此这方面深入研究十分重要。作者主要介绍了有关藻类 CCM 分子生物学和基因工程方面的内容。

1 CCM 概念及其生理意义

CCM (CO₂-Concentration mechanism) 即为 CO₂ 浓缩机制^[2-4]。当藻类细胞由高浓度 CO₂ 培养转入低浓度 CO₂ (或者大气 CO₂ 浓度) 时, CCM 被诱导,细胞可不断地从外部环境中把无机碳或 CO₂ 运输到体内,使体内的 CO₂ 浓度高于外界环境,以有利于光合作用碳循环第一个关键酶 Rubisco 羧化反应,从而能提高光合速率^[2-4]。

CCM 是藻类长期适应大气变化而诱导出来的一个 CO₂ 浓缩机制^[4,5]。现在根据 Rubisco 的同源关系分析, Rubisco 被认为是一个很古老的酶,估计 Rubisco 在 35 亿年前就出现了^[5]。那时的 CO₂ 浓度已有相当高的水平, Rubisco 实际上是高 CO₂ 环境下的自然产物^[4]。随着历史进程和变迁,大气 CO₂ 浓度逐步下降,而 O₂ 的浓度则由于绿色植物光合作

用释放 O₂ 而不断上升^[4,5]。从冰河时期后到 19 世纪, CO₂ 浓度稳定保持在 28 Pa^[5]。因此,考虑到这段历史, Rubisco 可能具有以下特点:(1) 要求比大气更高的 CO₂ 底物浓度;(2) O₂ 的竞争性抑制;(3) 具有加氧酶活性,用氧引发光呼吸碳氧化循环^[5]。从这里也可以看出,光呼吸的形成是植物遇到大气组分变化的一种适应,是一种保护性措施。由于大气 CO₂ 的不断下降,使水中的藻类植物经受了 CO₂ 不足及无机碳在水相中扩散慢的压力,为了更好的生存,因而产生 CCM 机制^[5]。一些蓝细菌内部的 CO₂ 浓度可以比外部介质高出 100 倍^[6]。

2 藻类 DIC 吸收与 CCM

空气中的 CO₂ 浓度为 340~360 μmol/mol, 开阔水域和海水与空气中的 CO₂ 达到平衡状态时(25 °C), 水中溶解 CO₂ 浓度大约是 10~12 μmol/L。溶解无机碳(Dissolved inorganic carbon, 简称 DIC) 在水中的形式有 CO₂、HCO₃⁻、CO₃²⁻、H₂CO₃, 并且相互之间达到动态平衡。开放的海水中(pH 为 7.8~8.3), DIC 的浓度大约为 2 mmol/L, 其中 HCO₃⁻、CO₃²⁻、CO₂ 的浓度分别为 1.8、0.35 和 0.01~0.02 mmol/L^[2]。藻类细胞对 DIC 吸收主要是 CO₂ 和 HCO₃⁻。CO₂ 可以被某些藻类直接吸收,如 *Chlorellaminiata*、*Dunaliella tertiolectah* 和莱茵藻既可吸收 CO₂ 又可吸收 HCO₃⁻^[2, 6]。对于 HCO₃⁻, 某

收稿日期: 2003-05-14; 修回日期: 2004-09-14

基金项目: 上海市教委曙光计划项目(SG98032); 国家 973 计划项目(G1998010100); 国家自然科学基金项目(30371101)

作者简介: 何培民(1959-), 男, 江西人, 博士, 教授, 从事海藻生物技术与分子生物技术及生态修复研究, E-mail: pmhe@shfu.edu.cn

些藻类可以通过阳离子交换直接吸收到体内,如莱茵藻。某些藻类靠胞外碳酸酐酶(periplasmic carbonic anhydrase, pCA)催化 HCO_3^- 转化成 CO_2 和 OH^- , CO_2 可进入细胞膜内被细胞吸收, OH^- 释放于介质中,造成基质环境pH上升。一般认为,凡是能利用 HCO_3^- 进行光合作用的藻类细胞均能生成pCA,具有pCA的绿藻能够利用 HCO_3^- 和 CO_2 ,有些藻类既可进行 HCO_3^- 直接吸收又可催化吸收^[2,6]。

大多数在低 CO_2 浓度生长的藻类细胞显示其低光呼吸作用、低 CO_2 补偿点、无或很低的氧对光合作用的抑制作用,表明这些细胞的光合作用对DIC的利用效率是非常高的^[2-4,6]。另外在低 CO_2 浓度生长的藻类细胞能在胞内积累大量的DIC,表明这些细胞存在 CO_2 浓缩机制^[2,4,6];当碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)活性和 CO_2 浓缩被抑制剂抑制时,其光合作用的 $K_m(\text{CO}_2)$ 值和光呼吸速率明显增加,表明这些细胞依靠CA和CCM提高其DIC的利用效率^[2,6]。

3 藻类 CCM 组成成分

早在1987年, Badger 提出 CCM 4个必须的组分是:(1)泵机制;(2)能量供应;(3)减少 CO_2 外流机制;4) CO_2 - HCO_3^- 快速转换^[2]。CCM 机制模型由 Moroney 和 Mason 在1991年提出,他们认为 CCM 机制涉及胞外质空间、质膜、被膜、蛋白核等部位。该模型后经 Badger 和 Price 1994年修改,目前比较公认的 CCM 组分包括 pCA、叶绿体 CA、蛋白核^[2]。

3.1 碳酸酐酶(CA)

3.1.1 胞外碳酸酐酶(periplasmic carbonic anhydrase, pCA)

目前仅 pCA 被证明是 CCM 组分,全酶是由2个亚基的四聚体(L_2S_2)组成,大亚基通过二硫键相连接,该酶含有 Zn,主要由 CA 中的 His 残基与 Zn 连接^[2]。CA 单体是由细胞中 80S 的核糖体合成的 42~44ku 前体,经剪接后形成,并存在外周胞质空间^[2]。其功能主要保持体外 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 系统平衡,并对细胞连续提供 CO_2 ^[2]。但也有人提出相反的意见, Sultermeyer 等^[7]用缺乏 pxCA 的无壁原生质体并没有因细胞从低 CO_2 浓度转入高 CO_2 浓度而导致胞内 Ci 积累功能下降。再如用膜不渗透 CA 抑制剂研究表明, pCA 对于 Ci 有效呼吸和利用并非必须。因此,对于 Ci 的主要兴趣由胞外转入胞内及叶绿体有关联的 CAs。现莱茵藻两个胞外 CA 基因

已被分离到, Cah_1 为低 Ci 生长细胞中 pCA 编码基因,大亚基 35~37ku,小亚基为 4.2ku^[2,8]。 Cah_2 为高 Ci 生长细胞中 pCA 编码基因,大亚基 38ku,小亚基为 4.243ku^[2,7]。胞外碳酸酐酶主要分布在细胞质与细胞壁之间和细胞壁上,细胞壁外侧也有少量分布^[6,9]。

3.1.2 胞质碳酸酐酶(Cytosolic Carbonic Anhydrase, cyCA)

cyCA 分子质量较大,为 110ku,并对磺胺类的 CA 抑制剂特别敏感,因而 Sultermeyer 等^[2,7]1990 年认为 cyCA 可能是 pCA 在胞质中的存在形式。cyCA 的作用可能是加速 CO_2 和 HCO_3^- 由质膜向叶绿体转运^[2]。

3.1.3 叶绿体碳酸酐酶(chloroplast carbonic anhydrase, chCA)

叶绿体 CA,分子质量为 45ku,被认为是光合作用 CO_2 转运系统中最为重要的 CA,也是 CCM 的重要组分^[2]。叶绿体 CA 以团粒形式存在,不溶解,且对 CA 抑制剂不敏感,故可区别于胞质 CA^[2]。但叶绿体中有几种同工酶还不是十分清楚。有人认为原初 Ci 转运系统很可能位于叶绿体被膜上^[2]。Kuchitsu 等^[10]通过组化方法证明叶绿体内的蛋白核含有 CA。现基本证明叶绿体内具有 2 种 CA:1 种为可溶性 CA,位于叶绿体基质中,第 2 种为类囊体膜紧密结合的 CA,仅能用 Triton X-100 释放出来。Pronina 和 Semenenko 1983 年的研究证明小球藻叶绿体含有 2 种 CA:可溶性的及类囊体膜结合的 CA。其中膜结合态的 CA 对 CO_2 及抑制剂(cycloheximide)不敏感。在莱茵藻中仅对叶绿体类囊体膜上的 Cah_3 特性了解比较清楚。Karlsson 等^[11]利用反转录技术克隆了 Cah_3 的 cDNA,western 印迹技术及其转运肽序列均表明 Cah_3 是位于叶绿体的类囊体膜上。van Renson 和 Xu 等^[12]认为在 PSII 膜的二边可能均存在碳酸酐酶,并认为对质体醌氧化还原酶稳定 PSII 反应中心蛋白及锰复合体功能、防止光抑制等方面具有重要作用。戴新宾等^[13]应用逐步洗脱法已证明菠菜类囊体结合态的 CA 是位于类囊体的内侧,与 PSII 的 33ku 蛋白联系紧密。何培民^[14]对莱茵藻叶绿体 CA 的研究表明可能存在 3 种同工酶。

3.2 蛋白核(pyrenoid)

蛋白核被认为是绿藻单细胞 CCM 的另一个组分。蛋白核曾一直被认为是藻类细胞蛋白存储结构,当细胞处于饥饿时,其蛋白质被调用^[2]。Holdsworth^[15]

在1971年最早用生物化学显示藻类中的蛋白核主要是由 Rubisco 组成, 随后越来越多免疫细胞化学分析实验也证明 Rubisco 主要位于绿藻蛋白核中。近年来, 有关藻类叶绿体 Rubisco 的定位已发展到应用金免电镜技术进行研究。Suss 等^[16]第一次使用了冰冻技术 (Cryotechnique) 和菠菜 Rubisco 抗体, 证明了莱茵藻 Rubisco 分子并不是高度集中于蛋白核中, 而是与类囊体区的类囊体膜相联系, 相似于其它叶绿体可溶性酶, 此结果与陆生植物相同。但 Morita 等^[17]用该项技术证明莱茵藻 Rubisco 99% 是位于蛋白核中, 且各种年龄的藻类都是如此。Villarejo 等^[18]和何培民等^[19]分别对 *Chlorella vulgaris* UAN 和中国小球藻 (*Chlorella spp* 640909) 的研究, 均证明 Rubisco 也是集中于蛋白核中。另外, 何培民等^[20-22]还证明 Rubisco 活化有关的 Rubisco 活化酶也是集中于蛋白核和淀粉鞘区域中。Lin 和 Carpenter^[23, 24]用免疫荧光标记并发现 Rubisco 在蛋白核中的染色程度与细胞周期、活跃生长阶段及光照强度有关。这些实验说明蛋白核中的 Rubisco 与光合作用有关。Kuchitsu 等^[10]用丹磺酰氨 (Dansyl amide) 作为 CA 活性部位的荧光探测剂, 结果显示蛋白核被特异性地染色, 表明莱茵藻胞内的 CA 与 Rubisco 的共存关系。

当细胞由高 CO₂ 浓度转入低 CO₂ 浓度时, 蛋白核超微结构有较大变化, 围绕蛋白核的淀粉鞘能同时很快形成^[2]。因而涉及到淀粉鞘是否与 CCM 有关系。Villarejo 等^[24]用莱茵藻无淀粉鞘变种 BAFJ-6 证明当藻类细胞由高 CO₂ 浓度转入低 CO₂ 浓度时, CA 仍被诱导, 说明了淀粉鞘与 CCM 无关。但 Badger Price 和 Ramazanov 等^[2, 25]根据蛋白核在转入到低 CO₂ 浓度时的超微结构变化现象, 推论蛋白核是 CO₂ 的固定位点, 并认为 Cah3 与蛋白核有联系。何培民等^[19-22]研究均显示淀粉鞘中具有一定量的 Rubisco 分布。

4 藻类 CA 蛋白质的诱导合成

结果显示: 高 CO₂ 生长的细胞转入空气 CO₂ 环境时莱茵藻各种 CA 可诱导出来。Spalding 等^[2, 26]用 ³⁵SO₄²⁻ 对藻体标记证明, 认为至少有 5 种或 6 种蛋白被诱导: (1) 37 ku 现已证明即是 pCA, 且其基因已克隆及测序。(2) 和 (3) 为 44~52 ku, 是两个可溶性蛋白。(4) 35~36 ku, 为 1~2 个膜相连蛋白 (Lip-36)。Lip-36 位于叶绿体被膜上。(5) 19~22 ku, 为 1~2 个膜相连蛋白 (Lip-21)。

此后, Ramazanov 等^[2, 25]发现 *Scenedesmus obiguus* 有 4 个低 CO₂ 诱导多肽, 在 *Chlorella vulgaris* 中则有 6 个多肽, 其中包括 pCA。Sato 和 Hiraiwa^[27]用 *Chlorella .regularis* 为材料, 用 SDS-PAGE 分析揭示细胞从高 CO₂ 转入低 CO₂ 浓度时有两个多肽出现, 其分子量分别为 98ku 和 24ku, 它们在不同的 pH 环境中诱导有差异。Thielmann 等^[28]报导在 *Scenedesmus obiguus* 中, 与 ATP 酶相连的 HCO₃⁻ 和 CO₂ 的运输可以在细胞处于 pH9 以上的低 CO₂ 浓度条件下诱导出来, 其诱导蛋白为 100ku。

5 CA 基因及基因工程研究进展

Badger 和 Price^[29, 30]认为几乎所有 CCM 突变体都具有表型相关 DNA 缺失, 各种突变体的出现表明有许多基因与 CCM 有联系, 特别是与羧化作用及体内 Ci 利用有关的基因, 成簇地出现在 Rubisco 操纵子周围。莱茵藻 2 个胞外 CA 基因已被分离到并被测序, 这 2 个基因分别为 Cah₁ 和 Cah₂^[8, 9]。Cah₁ 为低 Ci 生长细胞中 pCA 编码基因, 大亚基 35~37 ku, 小亚基为 4.2ku。Cah₂ 为高 Ci 生长细胞中 pCA 编码基因, 大亚基 38 kD, 小亚基为 4.243 ku。通过测序发现 Cah₁ 和 Cah₂ 同源性达到 92% 以上, 2 个基因的编码区被 10 个内含子隔开。

Robers 等 1997 年用硅藻 *Thalassiosira weissflogii* 对 CA 提取纯化并测序, CA 其大小为 27 ku, 具有 CA 活性。对其相关的 cDNA (twcal) 进行克隆和测序, 用载体 pRSETA 克隆到 *Escherichia coli* 中表达。其 twcal 为 1.4 kb 长, 编码 34 ku 蛋白。且该 TWCAL 序列与其它已知的 CAs 氨基酸序列缺乏同源性, 可能系统发生是不同源的^[31]。Funke 等^[32]则应用索引 DNA 随机 Cosmid 文库和基因互补技术, 鉴定了一个特殊 Cosmid 克隆携带 CA 野生型基因, 可以使突变体 CA-1 在大气 CO₂ 条件下恢复光合作用。DNA 序列分析显示该互补基因编码的 CA 明显与 Karlsson 等^[8]分离到的叶绿体 CA 同工酶一致。因此, 认为叶绿体 CA 对 CCM 的启动是必须的。Karlsson 等^[33]利用反转录技术克隆了 Cah3 的 cDNA, Park 等^[34]进一步证明 Cah3 是结合在光合系统 PSII 上, 其功能涉及光合电子传递、pH 调节和为羧化反应提供 CO₂。动物碳酸酐酶活性较高, 因此 Jinushi 等^[35]用鼠的一部分修饰盒子转入到烟草中得到表达, 转基因植株在低 CO₂ 显示具有很高的生长速率。

随着研究的深入, CA 的功能可能涉及到植物

生理许多重要方面(如逆境生理、光合生理),其功能之迷也将逐步彻底揭示。目前藻类CCM研究主要以微藻为研究对象,相信不久的将来大型海藻CCM机制也将被揭示,可应用大型海藻吸收CO₂以降低日益增长的CO₂浓度,既可提高海藻的产量又可保护环境。目前日本等发达国家对藻类碳酸酐酶已有深入的研究,已从理论研究转向应用研究。应用CCM机制和功能来定向改造藻类和农作物已是21世纪的重大课题和主攻方向之一。

参考文献:

- [1] 李立人. 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的结构、功能及组装[A].见植物生理与分子生物学[C].余叔文,汤章城主编.北京:科学出版社,1998.223-236.
- [2] Badger MR, Price GD. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, 45:369-92.
- [3] Aizawa K, Miyachi S. Carbonic anhydrase and CO₂ concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1986, 39:215-223.
- [4] Graham L E, Wilcox L W. *Algae* [M]. USA: Prentice, 2000:27-36.
- [5] Bowes G. Facing the inevitable: plant and increasing atmospheric CO₂[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 14:309-32.
- [6] Moroney J V. Carbon concentrating mechanisms in aquatic photosynthetic organisms: a report on CCM 2001 [J]. *J Phycology*, 2002, 37:929-931.
- [7] Sultemeyer D F, Fock H P, Calvin D T. Mass spectrometric measurements of intracellular carbonic anhydrase activity in high and low Ci cells of *Chlamydomonas* [J]. *Plant Physiol*, 1990, 94:1 250-1 257.
- [8] Fukuzawa H, Fujiwara S, Yamamoto Y, et al. cDNA cloning, sequence, and expression of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*: regulation by environmental CO₂ concentration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:4 383-4 387.
- [9] 何培民, 徐春和, 於新建, 等. 莱茵藻胞外碳酸酐酶分子定位与活性诱导[J]. *植物学通报*, 2002, 19 (3): 317-321.
- [10] Kuchitsu K, Tsuzuki M, Miyachi S. Polypeptide composition and enzyme activities of the pyrenoid and its regulation by CO₂ concentration in unicellular green algae[J]. *Can J Bot*, 1991, 69:1 062-1 069.
- [11] Karlsson J, Hiltonen T, Husic HD, et al. Intracellular carbonic anhydrase of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Physiol*, 1995, 109:533-539.
- [12] Van Renson J S, Xu C H. Govindjee Role of bicarbonate in photosystem II, the water-plastoquinone oxidoreductase of plant photosynthesis[J]. *Physiologia Plantarum*, 1999, 105:585-592.
- [13] 戴新宾, 于勇, 张荣铄, 等. 光系统II碳酸酐酶与放氧外周多肽及锰分子簇的关系[J]. *科学通报*, 2000, 45 (17):1 858-1 861.
- [14] 何培民.藻类光合作用和CCM关键酶分子定位与codA转基因烟草植株的光合逆境生理研究[J].南京农业大学博士学位论文, 2000.
- [15] Holdsworth RH. The isolation and partial characterization of the pyrenoid protein of *Eremosphaera viridis*[J]. *J Cell Biol*, 1971, 51:499-513.
- [16] Sü ss K H, Prokhorenko I, Adler K. In situ association of Calvin cycle enzymes, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, ferredoxin-NADP⁺ reductase, and nitrite reductase with thylakoid and pyrenoid membranes of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as revealed by immunoelectron microscopy[J]. *Plant Physiol*, 1995, 107:1 387-1 397.
- [17] Morita E, Kuroiwa H, Huroiwa T, et al. High localization of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the pyrenoids of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta), as revealed by cryofixation and immunogold electron microscopy[J]. *J Phycol*, 1997, 33:68-72.
- [18] Villarejo A, Isabel O M, Martinez F. Regulation of the CO₂-concentrating mechanism in *Chlorella vulgaris* UAM 101 by glucose[J]. *Physiologia Plantarum*, 1997, 99:293-301.
- [19] 何培民, 张大兵, 赵建华, 等. 小球藻Rubisco在叶绿体中的免疫金标定位[J]. *实验生物学报*, 2001, 34 (1): 16-23.
- [20] 何培民, 吴维宁, 赵建华, 等. 几种藻类蛋白核超微结构研究[J]. *水生生物学报*, 2002, 26 (5): 73-79.
- [21] He Peimin, Zhang Dabing, Chen Genyun, et al. Pyrenoid ultrastructure and immunogold localization of Rubisco and Rubisco activase in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Algae*, 2003, 18(2):121-127.
- [22] 何培民, 吴庆磊, 吴维宁, 等. 条浒苔蛋白核超微结构和Rubisco及其活化酶分子定位[J]. *水产学报*, 2004, 28 (3):255-260.
- [23] Lin S, Carpenter E. J. Pyrenoid localization of Rubisco in relation to the cell cycle and growth phase of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) [J]. *Phycologia*, 1997a, 36(1):24-31.
- [24] Lin S, Carpenter E. J. Rubisco of *Dunaliella tertiolecta* is redistributed between the pyrenoid and the stroma as a light/shade response[J]. *Marine Biology*, 1997b, 127: 521-529.

- [25] Ramazanov Z, Henk C, Mason C, *et al.* The induction of the CO₂-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **Planta**, 1994, 195: 210-216.
- [26] Spalding M H, Winder T L, Anderson J C, *et al.* Changes in protein and gene expression during induction of the CO₂-concentrating mechanism in wild-type and mutant *Chlamydomonas*[J]. **Can J Bot**, 1991, 69: 1 008-1 016.
- [27] Satoh A, Shiraiwa V. Two polypeptides inducible by low levels of CO₂ in soluble protein fractions from *Chlorella regularis* grown at low or high pH[J]. **Plant Cell Physiol.**, 1996, 37:431-437.
- [28] Thielmann J, Tolbert N E, Goyal A, *et al.* Two systems for CO₂ concentrating and bicarbonate during photosynthesis by *Scenedesmus*[J]. **Plant Physiol**, 1990, 92:622-629.
- [29] Badger M R, Price G D. The CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria and green algae[J]. **Physiol Plant**, 1992, 84:606-615.
- [30] Tachiki A, Fukuzawa H, Miyachi S. Characterization of carbonic anhydrase isozyme CA₂, which is the CAH₂ gene product, in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 1992, 56:794-798.
- [31] Roberts S B, Lave T W, Morel F M M. Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillario phyceae) [J]. **J Phycol**, 1997, 33:845-850.
- [32] Funke R P, Kovar J L, Weeks D P. Intracellular carbonic anhydrase is essential to photo-synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* at atmospheric levels of CO₂[J]. **Plant Physio**, 1997, 114:237-244.
- [33] Karlsson J, Clarke A K, Chen Z Y, *et al.* A novel α -type carbonic anhydrase associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO₂[J].**The EMBO J.** 1998, 17(5): 1 208-1 216.
- [34] Park Y I, Karlsson J, Rojdestvenski I, *et al.* Role of a novel photosystem II-associated carbonic anhydrase in photosynthetic carbon assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. **FEBS letters**, 1999, 444:102-105.
- [35] Jinushi K, Okabe K, Ishi R. Improvement of tobacco photosynthetic potential by the genetic introgression of carbonic anhydrase activity in the mesophyll cytoplasmic space[J]. **Proceeding of Asia-Pacific Plant Physiol Conference**, 1997:72.

(本文编辑: 张培新)

(上接第 41 页)

- [9] Defant A. *Physical Oceanography*(Vol.II)[M]. New York: Pergamon Press, 1961. 1-244.
- [10] Choi W. Weakly nonlinear internal waves in a two-fluid system[J]. **J Fluid Mech**, 1996, 313:83-103.
- [11] Choi W. Fully nonlinear internal waves in a two-fluid system[J]. **J Fluid Mech**, 1999, 396:1-36.
- [12] 章守宇, 杨红. 三层成层水域内波的研究[J]. *上海水产大学学报*, 1999, 8:226-231.

Study on internal wave in four-layer stratified fluid

CHEN Xiao-gang^{1,2}, SONG Jin-bao¹

(1. Laboratory of Ocean Circulation and Wave Studies, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Sep., 8, 2004

Key words: internal wave; four-layer stratified fluid; small amplitude wave theory

Abstract: In this paper, motions of internal waves in four-layer stratified fluid were investigated, and solutions of the elevations of the interfacial waves and the associated velocity potentials were presented based on small amplitude wave theory. Patterns of distribution of mean velocity due to the waves and its dispersion relationship were derived, and they are compared with the analytic results of the study on internal wave in three-layer stratified fluid.

(本文编辑: 刘珊珊)