

基于蛋白组学分析杜氏盐藻对不同浓度 CO₂ 的响应

蔡学花^{1,3}, 顾文辉^{1,2,4}, 李元翔^{1,3}, 王广策^{1,2,4}

(1. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛国家海洋实验室 海洋生物与技术功能实验室, 山东 青岛 266237; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 中国科学院 海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 用气体混合仪设置不同的 CO₂ 浓度处理组, 测定了杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)细胞密度、碳酸酐酶活性、甘油含量等生理指标, 结合蛋白质组学分析方法, 比较了不同 CO₂ 浓度下细胞内主要代谢途径蛋白表达的差异。结果表明: 在一定范围内, 随着 CO₂ 浓度的升高, 杜氏盐藻的生理活性及光合活性提高; 而 CO₂ 浓度过高对盐藻生长呈抑制作用; 3% CO₂ 浓度最适于本实验杜氏盐藻藻株的生长。随着 CO₂ 浓度的升高, 胞外碳酸酐酶活性下降。低浓度的 CO₂ 有利于 β-胡萝卜素的积累, 且光系统 II (PS II) 光合活性在 CO₂ 浓度 0.03%~3% 范围内上升, CO₂ 浓度达 9% 时降低, 与光合作用相关蛋白的表达趋势接近。上述结果说明杜氏盐藻可能通过调节光合作用中叶绿素等捕光色素的合成及相关蛋白的表达笼统, 以响应 CO₂ 浓度的变化; 而过高浓度的 CO₂ 可对细胞产生氧化损害, 引起热激蛋白和超氧化物歧化酶等蛋白含量的上调以应对氧化胁迫。

关键词: 杜氏盐藻; CO₂ 浓度; 蛋白组学; 光合作用; 氧化胁迫

中图分类号: Q939.99 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2018)09-0098-09

DOI: 10.11759/hyxx20180327001

近年来, 大气中 CO₂ 浓度持续增加, 海水溶解大量的 CO₂ 使海水 pH 下降, 导致海洋酸化^[1]。微藻是海洋中主要的初级生产力, 可以通过光合作用固定海水中的 CO₂, *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris* 和 *Galdieria partita* 等很多种属可耐受极高浓度的 CO₂ (1%~5% 以上)^[2-3]。一些微藻, 如杜氏盐藻, 在生长阶段可积累油脂和类胡萝卜素等高附加值的产物, CO₂ 作为光合作用的底物, 可影响这些产物的积累。

CO₂ 浓度变化可引起细胞形态和生化组成的显著改变, 在高浓度压力下, 细胞通过调整光合器官结构和功能以提高光合效率^[3-5]。不同藻类对高浓度 CO₂ 的耐受存在特异性, 有研究显示, 杜氏盐藻可耐受 5% 高浓度的 CO₂^[6]。杜氏盐藻属于绿藻门、绿藻纲、团藻目、杜氏藻科、杜氏藻属, 细胞壁不完整, 细胞膜外只有一层薄而有弹性的糖蛋白和神经氨酸外层, 可在较广范围的盐度生存、繁殖, 其主要渗透调节物是甘油^[7]。高盐、强光、营养盐缺乏等条件, 可诱导杜氏盐藻大量积累 β-胡萝卜素^[8]。

盐藻对无机碳的固定首先通过细胞内主动转移无机碳的 CO₂ 浓缩的机制 (CO₂ concentrating mechanism, CCM)。该过程中的关键酶为碳酸酐酶 (carbonic

anhydrase, CA), CA 参与催化 HCO₃⁻ 与 CO₂ 在细胞内外的相互转化, 以调控胞内的碳浓度。CO₂ 浓度、温度和营养元素等环境因子对 CCM 具有调控作用^[9-10]。

杜氏盐藻利用不同浓度 CO₂ 的研究已有报道^[11-13], 但在蛋白组学水平上的整体研究仍有待补充。本研究以不同浓度的 CO₂ 为处理条件, 并利用 GMS 150 型高精度气体混合仪对浓度进行精确调控, 测定了杜氏盐藻细胞密度、碳酸酐酶活性等参数, 结合蛋白组学分析方法, 比较分析了不同处理条件下细胞内主要代谢途径中蛋白表达的差异, 以期深入认识杜氏盐藻对不同浓度 CO₂ 的响应机制。

收稿日期: 2018-03-27; 修回日期: 2018-05-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(41506188); 科技部国际合作专项(2015DFG32160)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41506188; International S & T Cooperation Program of China, No. 2015DFG32160]

作者简介: 蔡学花(1992-), 女, 山东日照人, 硕士研究生, 研究方向为藻类分子生理学与发育调控, 电话: 0532-82898575, E-mail: caixuehua15@163.com; 顾文辉, 共同第一作者, 副研究员, 电话: 0532-82898575, E-mail: wenhuigu@qdio.ac.cn; 王广策, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-82898574, E-mail: gcwang@qdio.ac.cn.

1 材料与amp;方法

1.1 实验藻种

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)为本实验室保藏藻种,采于天津长芦汉沽盐场。

1.2 培养条件

培养基为Pick改良配方^[14-16],不加NaHCO₃,调节pH为7.4,120℃,20 min灭菌。光源为荧光灯,光照强度为正常培养强度,约6000 lx,光暗周期为14 h/10 h,温度为25℃。

利用GMS 150气体混合仪(Photon Systems Instruments,捷克),以内径6 cm、容积1 L的玻璃管作为小型气升式光反应器,连续通气培养。通气条件分为4组:99.97%N₂+0.03%CO₂,99.7%N₂+0.3%CO₂,97%N₂+3%CO₂,91%N₂+9%CO₂。每组设3个平行。

1.3 生理指标的测定及质谱分析

1.3.1 细胞密度的测定

充分摇匀取藻样,以0.5%的甲醛固定藻细胞,用血球计数板进行显微细胞计数。

1.3.2 碳酸酐酶活性的测定

碳酸酐酶活性的测定参照Wilbur-Anderson量电法^[17,18]并做适当调整。

胞外碳酸酐酶活性测定:取各处理组一定体积藻液,以2000 r/min、4℃条件离心5 min。去上清,收集藻细胞。用4℃预冷的巴比妥钠缓冲液重悬藻细胞,再次离心,去上清,然后用5 mL巴比妥钠缓冲液重悬,得到细胞样品。将反应体系置于冰浴中,控制温度约为4℃,向样品中迅速加入3 mL 0℃的饱和CO₂蒸馏水,用pH计(Sartorius PB-10,美国)测定pH值,记录pH值从8.0降至7.0的时间。

总碳酸酐酶活性测定:测定破碎的藻细胞样品。使用超声细胞粉碎机(JY92-I I DN,新芝生物,宁波)进行破碎,超声工作条件:功率200 W,每次作用时间8 s,间隔时间10 s,共作用80 s。

1.3.3 甘油含量的测定

用甘油含量测试试剂盒(南京建成,南京),按照说明书测定甘油含量,每个样品做3次重复。

1.3.4 色素含量的测定

色素提取液为甲醇:丙酮(v:v)=1:1,加入适量提取液,置于冰上充分提取色素至镜检藻体沉淀为白色。使用0.45 μm滤膜过滤,将滤液保存于-20℃。

用高效液相色谱仪(Shimadzu LC-16,日本)测定色素的含量,测定条件参照THAYER^[19]和XIE等^[20]的方法。

1.3.5 叶绿素荧光活性的测定

用叶绿素荧光测定仪(Walz,德国)测定,测定前将微藻样品暗适应5 min。在荧光仪上直接读出叶绿素荧光参数Fv/Fm(有效光能转换效率)、Y(II)(最大光能转换效率)。

1.3.6 总可溶性蛋白提取及质谱分析

(1) 蛋白提取

总可溶性蛋白的提取参照Wang等^[21,22]的方法并加以调整,所得蛋白沉淀用内含125 mmol/L碳酸氢铵的8 mol/L尿素,在室温下充分溶解。以10 000 r/min,4℃离心10 min,去未溶解的沉淀。

(2) 蛋白质定量、酶切和质谱检测分析

用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白浓度测定试剂盒(Cat#PC0020,Solarbio)进行蛋白定量,以8 mol/L尿素稀释,终浓度定量至约为1 mg/mL。37℃下用10 mmol/L的二硫苏糖醇还原蛋白样品1 h。随后在黑暗条件下,向样品中加入50 mmol/L的碘乙酰胺,充分烷基化30 min。加入碳酸氢铵,将8 mol/L蛋白稀释到2 mol/L,进行酶切。测序级胰蛋白酶(Promega,美国)先于30℃水浴中处理5 min活化,随后按胰酶:蛋白=1:30(w/w)加入蛋白样品中,于37℃水浴进行酶切。12 h后,加入甲酸至终浓度为1%,使胰酶失活。酶切后的样品在12000 r/min、4℃离心15 min,上清按每管70 μL分装,存储于-80℃,以备LC-MS/MS检测使用。

质谱分析方法参照GU^[23]和赵佩佩等^[24]。质谱校正后(maxis plus QTOF,Bruker,德国),将酶切过的样品加入高效液相色谱系统(Agilent 1260 HPLC system,Agilent Advance BIO,美国)。多肽洗脱中流动相A(0.1%甲酸超纯水)和B(0.1%甲酸乙腈),参照Blonder等^[25]的方法。

利用O-TOF Contron(版本4.1,Bruker,德国)获取质谱分析后的原始数据,通过Spectrum Mill MS Proteomics Workbench软件(版本A.03.03,Agilent,美国)处理MS-MS图谱与搜索蛋白数据库,并进行蛋白的定量计算。以归一化方法计算各蛋白的相对表达量,并用软件SPSS 19.0进行统计学的显著性分析, $P<0.05$ 为显著性差异。

1.3.7 pH测定

通气24 h后,用PB-10型pH计测定培养基的pH。

2 结果

2.1 不同 CO₂ 浓度组的细胞密度、碳酸酐酶活性和甘油含量变化

不同 CO₂ 浓度下细胞密度变化曲线如图 1 所示。初始细胞密度约为 20×10^4 个/mL, 培养 5 d 后, 3% 浓度组盐藻细胞最高, 为 79×10^4 个/mL, 其次为 0.3% 和 9% 浓度组分别为 67.2×10^4 个/mL 和 46.1×10^4 个/mL, 两组间差异显著 ($P < 0.05$)。CO₂ 浓度最低的 0.03% 组细胞密度增长最少, 仅达到 22.45×10^4 个/mL。表明在 0.03%~3% 浓度范围内, 随 CO₂ 浓度的升高, 杜氏盐藻细胞生长加快, 较高浓度的 CO₂ 可为细胞的生命活动提供充分碳源, 而过高浓度的 CO₂(9%) 促进生长的作用减缓。

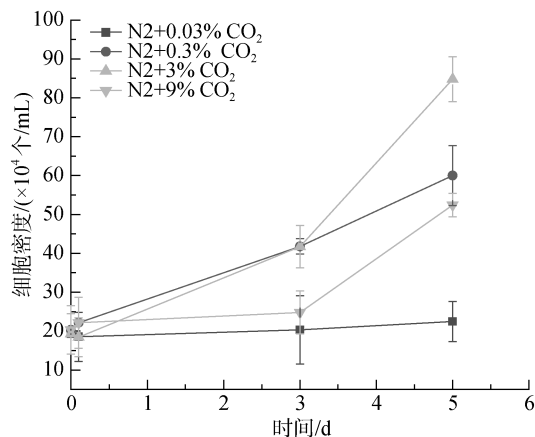


图 1 不同 CO₂ 浓度下盐藻细胞密度变化

Fig. 1 Cell density of *D. salina* under different CO₂ concentrations

甘油总含量如图 2 所示。培养 5 d 后, 各组甘油含量均上升。在 0.03%~9% CO₂ 浓度范围内, 0.03% 浓度组甘油含量最低, 由初始 $0.200 \text{ mmol/L} \pm 0.005 \text{ mmol/L}$ 增长至 $0.439 \text{ mmol/L} \pm 0.068 \text{ mmol/L}$, 提高约 2 倍, 而其他高浓度组可提高约 5~8 倍, 且高浓度组间无显著差异。表明与近似空气中体积的 CO₂ 浓度(0.03%) 相比, 提高 CO₂ 浓度可促进杜氏盐藻的甘油合成。

碳酸酐酶含量如图 3 所示。胞外碳酸酐酶活性在各处理组的含量有随着 CO₂ 浓度升高而下降的趋势, 0.03% 浓度组最高为 $0.0130 \text{ U}/10^4 \text{ Cell} \pm 0.0017 \text{ U}/10^4 \text{ Cell}$, 9% 浓度组最低为 $2.4018 \times 10^{-4} \pm 3.6088 \times 10^{-4} \text{ U}/10^4 \text{ Cell}$ 。而 3% 浓度组分别与 0.3%、9% 浓度组无显著性差异。总碳酸酐酶活性为胞内及胞外酶的加和, 胞内及总碳酸酐酶含量在 0.03% 浓度下最高, 各浓度处理间

无显著性差异 ($P > 0.05$)。因此在 0.03%~9% 浓度范围内, CO₂ 浓度对胞内碳酸酐酶活性的作用无显著性差异 ($P > 0.05$)。

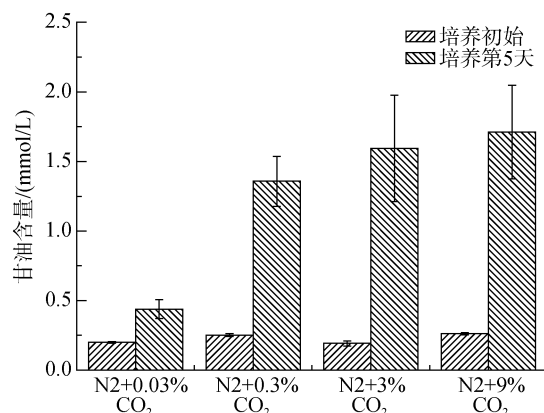


图 2 初始与第 5 天不同 CO₂ 浓度下甘油总含量

Fig. 2 Glycerol concentration of *D. salina* under different CO₂ concentrations in initial phase and at day 5

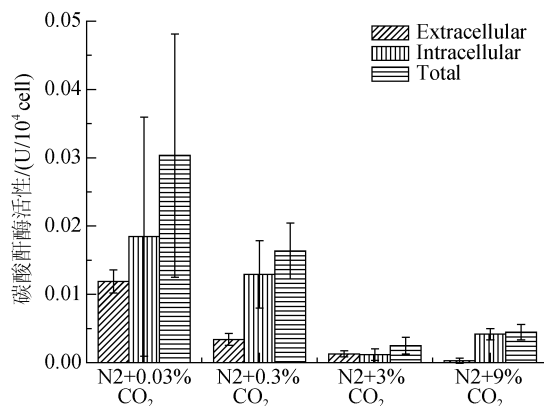


图 3 第 5 天不同 CO₂ 浓度下碳酸酐酶活性

Fig. 3 Carbonic anhydrase activity of *D. salina* under different CO₂ concentrations at day 5

2.2 色素含量变化

由图 4a 可以看出, 培养 5 天后, 3% 浓度组的 β-胡萝卜素含量下降约 50%, 其他几组无显著差异; 第 5 天对于不同处理组, 0.03% 与 3%、9% 浓度组有显著差异, 含量约是该两组的 3 倍, 即 0.03% 浓度组与 3% 和 9% 两个高浓度组相比, 低的 CO₂ 浓度下, β-胡萝卜素含量高, 利于其积累。

对于类胡萝卜素与叶绿素的比值 Car/Chl, 在培养阶段 0.3% 和 9% 浓度组显著上升。第 5 天, 0.03% 与其他处理组有显著差异, 约为其他各组的 2 倍, 低 CO₂ 浓度下捕光色素中类胡萝卜素比值较高。

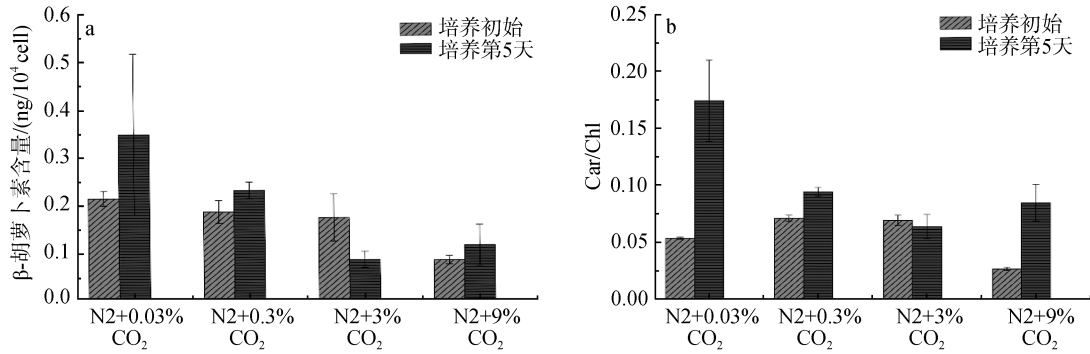


图4 第0天与第5天不同CO₂浓度下 β -胡萝卜素含量与类胡萝卜素/叶绿素比值

Fig.4 β -Carotene concentration and Carotene/chlorophyll of *D. salina* under different CO₂ concentrations in initial phase and day 5

2.3 PS II 荧光活性的变化

光系统 II (PS II) 有效光化学效率 F_v/F_m 、最大光能转化效率 $Y(II)$ 如图 5 所示。在 0.03%~3% 浓度范围内, 各处理组差异显著, 且呈上升趋势 ($P < 0.05$)。在 3% CO₂ 浓度下, F_v/F_m 、 $Y(II)$ 最高, 而在 9% CO₂ 浓度下两种参数值降低。

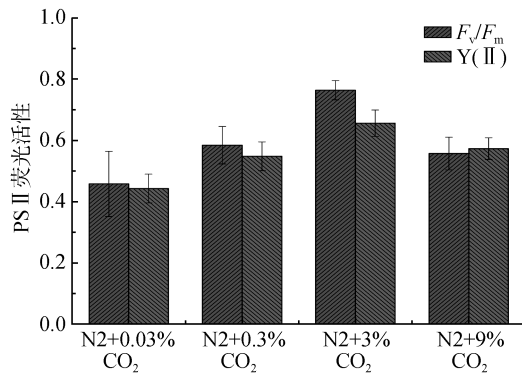


图5 第5天不同处理组PS II 荧光参数变化

Fig. 5 Photosynthetic activity of PS II under different CO₂ concentrations at day 5

2.4 蛋白质组结果分析

利用 LC-MS/MS 分析鉴定出 15 分以上的阳性蛋白有 264 个, 并用 UniProt (<http://www.uniprot.org/>) 网站搜索蛋白功能, 分成几个大类(图 6)。从图 6 可以看出, 约 21% 的差异表达蛋白为推测蛋白 (hypothetical proteins), 在数据库中没有找到注释。其他蛋白被注释为碳代谢、转录与翻译相关、光合作用与色素合成、氨基酸代谢、蛋白质代谢、抗氧化酶、脂质代谢、信号转导与产能代谢酶等蛋白。以归一法方法计算蛋白的相对表达量, 并用软件 SPSS 19.0

进行显著性分析。

2.4.1 碳代谢过程相关蛋白

碳代谢相关蛋白, 如糖酵解途径中的葡萄糖-6-磷酸异构酶, 甘油醛-3 磷酸脱氢酶(除 3% 浓度) 以及催化葡萄糖-1-磷酸转化为葡萄糖-6-磷酸的以进入糖酵解途径的葡萄糖磷酸变位酶, 在 0.03%~3% CO₂ 浓度范围内随浓度升高而下降, 而 CO₂ 浓度 9% 时则有上升趋势。0.03% 浓度组中的苹果酸脱氢酶(假定) 与磷酸戊糖支路的核酮糖磷酸-3-差向异构酶表达量均高于其他浓度处理(图 7a)。此外, 卡尔文循环中的关键酶 Rubisco 酶大亚基 *rbcl*、景天庚酮糖二磷酸酶 (0.3% 与 3% 浓度下无显著差异) 的表达也有相近的趋势, 磷酸核酮糖激酶前体在 0.03% 与 0.3% 浓度下的表达量显著高于 3% 与 9% 浓度(图 7b)。

此外, 只在低碳浓度下 (CO₂ 浓度 0.03% 和 3%) 检测到的碳代谢相关蛋白有: 低碳诱导蛋白 *LciD* 和碳酸酐酶。糖酵解途径中的关键酶磷酸果糖激酶则只在 0.03% 浓度下检测到。

2.4.2 光合作用相关蛋白

光合过程相关蛋白相对丰度如图 8 所示, 在 0.03%~3% 浓度范围内, 与光合作用相关的蛋白相对表达量有上调趋势, 如 ATP 合酶的 *CF1 α* 亚基、*CF2 β* 亚基, 细胞色素 *f* 和 *b6* (*cyt b6* 在 0.03% 和 3% 无显著差异), PS II 的 *CP47* 和 *CP43* 反应中心蛋白 (*CP43* 在 0.3% 和 3% 无显著差异)、PSI 亚基 *VII*。在 9% 高 CO₂ 浓度下以上蛋白有些表达量略有上升或未检测到, 这些数据与 PS II 荧光参数变化趋势相符合。

2.4.3 蛋白质代谢、抗氧化物及转录翻译等相关蛋白

此外, 热激蛋白 70B、假定蛋白(蛋白二硫键氧化酶活性) 表现在 0.03%~3% 浓度时下降, 9% 浓度时

上升的趋势(图 9)。在该范围内,热激蛋白 90、热激蛋白 70a、超氧化物歧化酶、30S 核糖体蛋白 S3(叶

绿体)也有在低浓度(0.03%~0.3%浓度或 0.03%~3%)时表达下调,9%高浓度时表达上调的趋势。

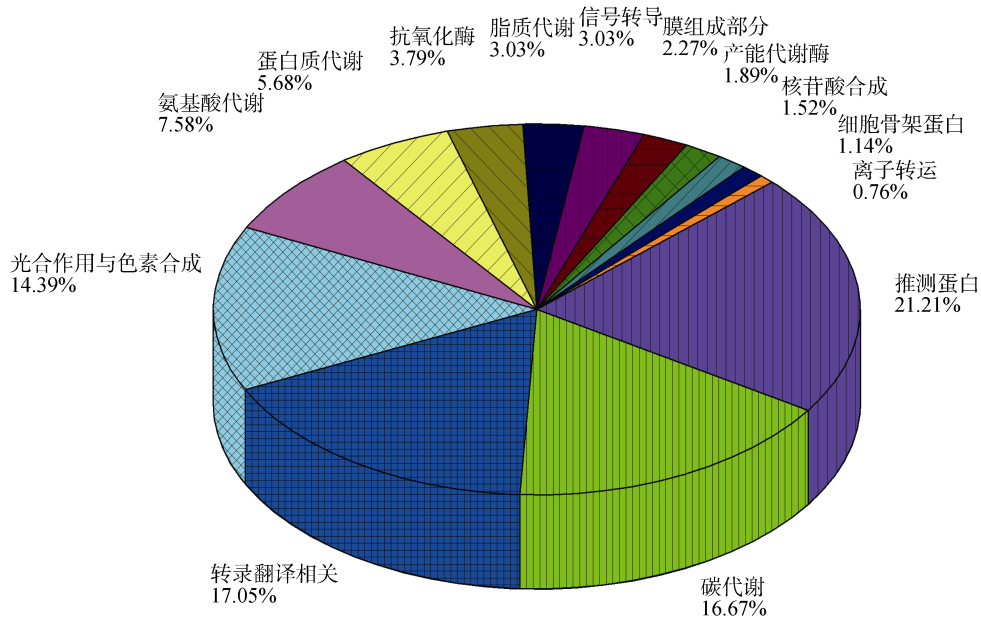


图 6 差异表达蛋白的功能分类

Fig. 6 Functional categories of differentially expressed proteins

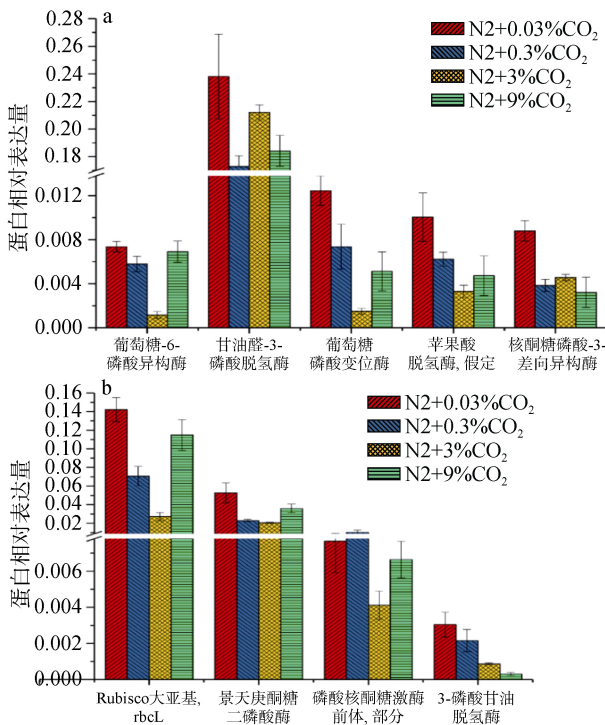


图 7 碳代谢过程相关蛋白的相对丰度

Fig. 7 The relative abundance of carbon metabolism-related proteins

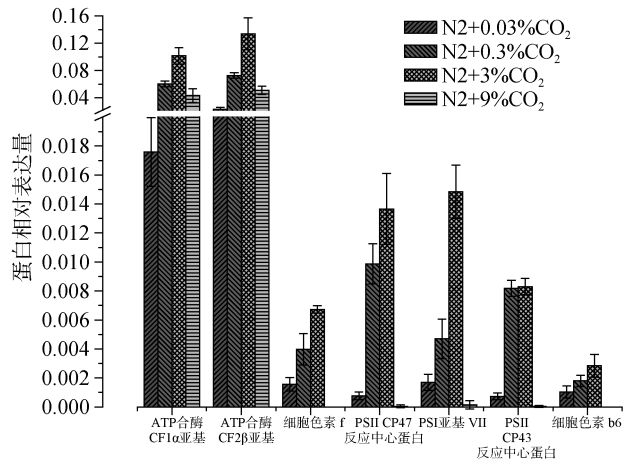


图 8 光合过程相关蛋白的相对丰度

Fig. 8 The relative abundance of photosynthesis-related proteins

2.5 培养第 1 天 pH

第 1 天不同处理组培养基 pH 如图 10 所示,随着气体中 CO₂ 浓度的升高,培养基中 pH 降低,9%高浓度下可使培养基 pH<5.0,而藻细胞的存在使 pH 下降趋势减小。9%高浓度下培养基极低的 pH 可能通过影响 CCM 途径的 CA 酶等的活性对微藻的生长有一定的影响。

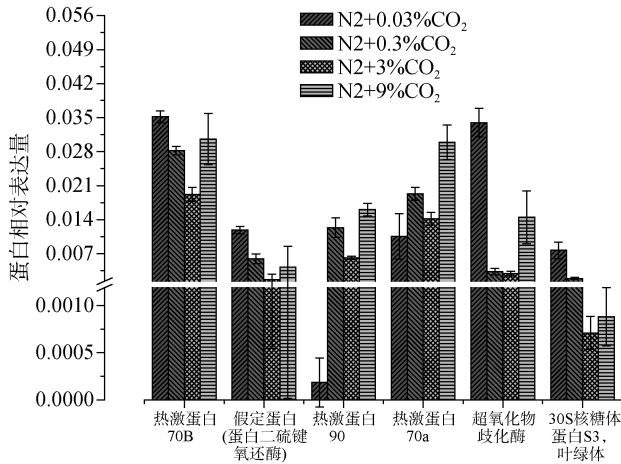


图 9 蛋白质代谢、抗氧化物及转录翻译等相关蛋白相对丰度

Fig. 9 The relative abundance of protein metabolism, antioxidant, transcription, and translation related proteins

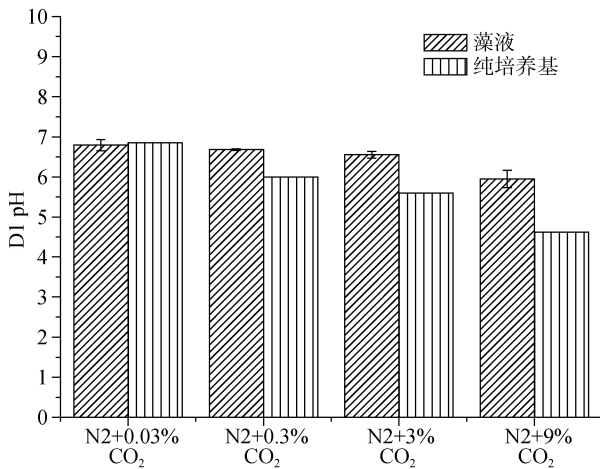


图 10 第 1 天不同 CO₂ 浓度下培养基 pH

Fig. 10 pH of medium under different CO₂ concentrations at day 1

3 讨论

3.1 CO₂ 浓度对杜氏盐藻生长和光合作用的影响

本研究结果表明, 本实验藻株杜氏盐藻的生长最适 CO₂ 浓度是 3%。在一定范围内, 随着 CO₂ 浓度的升高, 杜氏盐藻的生理及光合活性提高, 过高浓度 CO₂ 则对细胞的生长有抑制作用。

胞外碳酸酐酶活性随着 CO₂ 浓度升高而下降, 0.03%浓度组的活性最高, 胞内碳酸酐酶活性不受 CO₂ 浓度的影响。蛋白质组学分析显示, 低 CO₂ 诱导蛋白 LciD 和碳酸酐酶的表达只在低碳浓度 0.03%和

3%下才能检测到。在高浓度 CO₂(1%~5%) 下培养时, 培养液中的 CO₂ 能够满足细胞生长和光合作用的需要, 胞外碳酸酐酶的活性受到抑制^[26]。CCM 机制的形成需要低 CO₂ 浓度, 而高 CO₂ 浓度则会抑制微藻的 CCM 和碳酸酐酶的合成^[27-28]。随着环境中 CO₂ 浓度的升高, 胞外碳酸酐酶活性呈下降趋势, 高 CO₂ 降低 CCM 途径中 CA 酶对无机碳的亲合力, 抑制了 CCM 的表达, 增加了供给 1,5-二磷酸核酮糖蛋白(RuBP)的 CO₂ 扩散通量^[29-32], 细胞可利用的碳源增加, 细胞生长加快, 甘油等代谢产物的含量也随之上升。

0.03%的低 CO₂ 浓度利于 β-胡萝卜素的积累, 同时类胡萝卜素占比升高。而杨晓玲等^[33]通过向培养基中添加碳酸氢钠以提供 CO₂, 发现随着碳源浓度的升高, β-胡萝卜素积累有加速的趋势。二者产生差异的原因可能在于碳源提供方式与浓度的不同。

3%浓度下 β-胡萝卜素含量最低, 而 PS II 的光合活性参数 F_v/F_m 、Y(II)最高, 且在 0.03%~3%下呈上升趋势, 9%下叶绿素荧光参数降低, 与光合作用相关的蛋白如 ATP 合酶的 CF1α 亚基、CF2β 亚基, 细胞色素 b6f, PS II 的 CP47 和 CP43 反应中心蛋白以及 PSI 亚基 V II 相对表达量变化趋势相一致。有研究表明, CO₂ 的加富可明显提高可变荧光, 使 F_v/F_0 (PS II 的潜在活性)和 F_v/F_m 的比值增大, 提高叶绿体内光能转化成化学能的速度和效率^[34]。表明杜氏盐藻调节光合作用以响应 CO₂ 浓度变化可能是通过调节捕光色素的合成与比例, 在适应浓度下, 相关蛋白表达上调, 光合作用增强, 为细胞生长提供充足的能量, 以适应环境变化。

3.2 杜氏盐藻对 CO₂ 浓度的碳代谢响应

蛋白质组分析结果显示, 在 0.03%~3%CO₂ 浓度范围内, 随着浓度升高, 杜氏盐藻胞内的糖酵解途径中某些酶表达下调。在 0.03%浓度下, 三羧酸循环和磷酸戊糖支路的酶表达量最高。而卡尔文循环中的关键酶 Rubisco 酶的大亚基、景天庚酮糖二磷酸酶也有与之相近的趋势。可能是在低 CO₂ 浓度下, 细胞可利用的碳源减少, 为维持正常的生命活动, 细胞上调相关碳代谢路径上的酶表达量, 提高酶与底物的结合效率。有研究表明, 鱼腥藻在低浓度或高浓度 CO₂ 下 Rubisco 酶活性无明显差异, 但低 CO₂ 下细胞固碳能力高, 低 CO₂ 下细胞中积累无机碳的浓度超过介质中的无机碳度, 使 Rubisco 羧化酶能更有效的发挥作用^[12]。

3.3 过高浓度 CO₂ 对杜氏盐藻的胁迫作用

高浓度 CO₂ 可对杜氏盐藻胞内多种代谢途径产生影响。有研究表明, 高 CO₂ 条件下, 盐藻细胞内脂肪酸合成产生变化, 脂肪酸的去饱和被抑制, 在 10% CO₂ 浓度下, 饱和脂肪酸含量上升^[35]。在环境中 CO₂ 体积分数大于 5% 时, 大部分微藻的生长将受到抑制, 影响固碳效率^[36]。本研究结果显示, 过高浓度的 CO₂ 对杜氏盐藻细胞的生长并无明显的促进作用, 且可能对细胞产生胁迫, 抑制生长。

胞外碳酸酐酶可催化 CO₂ 转化为不易渗透通过质膜的 HCO₃⁻, 由此控制胞内 pH 的降低, 而随着 CO₂ 浓度增加, 溶解态 CO₂ 向细胞内扩散的速率增加, 并水解形成 HCO₃⁻ 和 H⁺, 可使细胞质 pH 下降, 对微藻吸收和利用 CO₂ 产生阻碍^[37]。通气过程中, 过高浓度的 CO₂ 抑制了碳酸酐酶活性, 使较多 CO₂ 进入胞内, 产生酸化^[6]如图 11 所示。细胞内环境中的 pH 大幅降低, 作用于细胞的生理活性与蛋白合成路径, 可对细胞产生氧化损害。根据蛋白质组分析结果, 高浓度 CO₂ 下热激蛋白、超氧化物歧化酶和蛋白二硫键氧还酶等表达上调, 说明过高浓度 CO₂ 可能对细胞引起氧化胁迫。因此过高浓度 CO₂ 下, 细胞内环境中的 pH 大幅降低, 同时对细胞产生氧化损害, 细胞上调抗氧化物的表达以应对氧化胁迫。

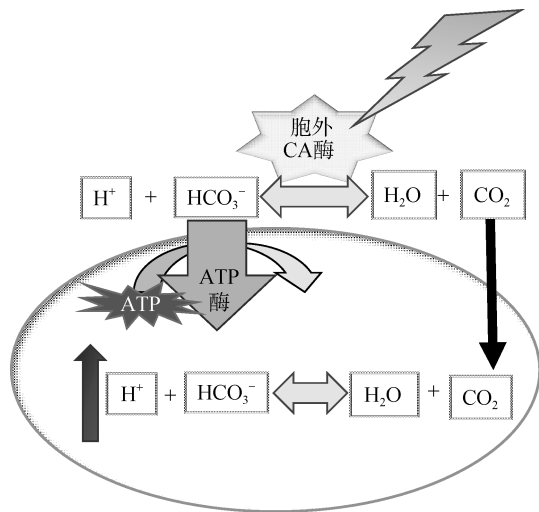


图 11 高浓度 CO₂ 对微藻细胞的影响

Fig. 11 The effect of high concentration of CO₂ on microalgae cells

参考文献:

[1] Doney S C, Fabry V J, Feely R A, et al. Ocean acidifi-

cation: the other CO₂ problem[J]. Annual Review of Marine Science, 2009, 1(1): 169.

[2] Kodama M. A new species of highly CO₂-tolerant fast-growing marine microalga suitable for high-density culture[J]. Journal of Marine Biotechnology, 1993, 1: 21-25.

[3] Sergeenko T V, Muradyan E A, Pronina N A, et al. The effect of extremely high CO₂ concentration on the growth and biochemical composition of microalgae[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2000, 47(5): 632-638.

[4] Seckbach J, Gross H, Nathan M B. Growth and photosynthesis of *Cyanidium caldarium* cultured under pure CO₂[J]. Israel J Bot, 1971, 20(2): 84-90.

[5] Mouradian E, Klyachko-Gurvich G, Pronina N. Lipid metabolism of *Spirulina platensis* under CO₂-stress[J]. Advances in Plant Lipid Research, 1998, 511-513.

[6] 孟范平, 谢爽, 于腾, 等. 耐酸性和耐高浓度 CO₂ 的海洋微藻筛选[J]. 化工进展, 2009, 2009(S1): 310-317. Meng Fanping, Xie Shuang, Yu Teng, et al. Screening acid and high concentration of CO₂ resistant microalgae[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2009, (S1): 310-317.

[7] Lamers P P, Cev D L, Kaasenbrood P S, et al. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, 106(4): 638-648.

[8] Craigie J, McLachlan J. Glycerol as a photosynthetic product in *Dunaliella tertiolecta* Butcher[J]. Canadian journal of Botany, 1964, 42(6): 777-778.

[9] 夏建荣, 高坤山. 绿藻 CO₂ 浓缩机制的研究进展[J]. 应用生态学报, 2002, 13(11): 1507-1510. Xia Jianrong, Gao Kunshan. Advances in research on CO₂ concentrating mechanism of green algae[J]. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, 2002, 13(11): 1507-1510.

[10] Miller A G, Espie G S, Calvin D T. Physiological aspects of CO₂ and HCO₃⁻ transport by cyanobacteria: a r[J]. Revue Canadienne De Botanique, 1990, 68(6): 1291-1302.

[11] Badger M R, Kaplan A, Berry J A. Internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii*. evidence for a carbon dioxide-concentrating mechanism[J]. Plant Physiology, 1980, 66(3): 407.

[12] Kaplan A, Badger M R, Berry J A. Photosynthesis and the intracellular inorganic carbon pool in the bluegreen alga *Anabaena variabilis*: response to external CO₂ concentration[J]. Planta, 1980, 149(3): 219-226.

[13] Atun G, Haznedar R O, Lu H N. Adaptation of Photosynthetic CO₂ and HCO₃⁻ Accumulation by the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC6301 to Growth at Different Inorganic Carbon Concentrations[J]. Australian Journal

- of Plant Physiology, 1987, 14(2): 189-201.
- [14] Pick U, Karnil, Avron M. Determination of Ion Content and Ion Fluxes in the Halotolerant Alga *Dunaliella salina*[J]. Plant Physiology, 1986, 81(1): 92-96.
- [15] 程建峰, 胡芬红, 沈允钢. NaHSO₃ 对盐生杜氏藻生长和光合色素含量的影响[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(3): 65-70.
Cheng Jianfeng, Hu Fenhong, Shen Yungang. Effects of NaHSO₃ on the growth and contents of photosynthetic pigments in *Dunaliella salina*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(3): 65-70.
- [16] 周丽花, 施翔, 程建峰. 七种常用培养基对盐藻生长和色素含量的影响[J]. 水产科学, 2015, 34(12): 750-756.
Zhou Lihua, Shi Xiang, Cheng Jianfeng. Effects of seven common culture media on growth and pigment contents in green alga *Dunaliella salina*[J]. Fisheries Science, 2015, 34(12): 750-756.
- [17] 王铭, 桑敏, 李爱芬, 等. 不同理化因子对雨生红球藻 CG-11 碳酸酐酶活性的影响[J]. 植物生理学报, 2010, 46(7): 701-706.
Wang Ming, Sang Min, Li Aifen, et al. Effects of physical and chemical factors on carbonate dehydratase activity of *Haematococcus pluvialis* CG-11[J]. Plant Physiology Communications, 2010, 46(7): 701-706.
- [18] Wilbur K M, Anderson N G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase[J]. Anatomical Record, 1948, 101(4): 147-154.
- [19] Thayer S S, Bjrkman O. Leaf Xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC[J]. Photosynthesis Research, 1990, 23(3): 331-343.
- [20] Xie X, Huang A, Gu W, et al. Photorespiration participates in the assimilation of acetate in *Chlorella sorokiniana* under high light[J]. New Phytologist, 2016, 209(3): 987-998.
- [21] Wang S B, Hu Q, Sommerfeld M, et al. An optimized protocol for isolation of soluble proteins from microalgae for two-dimensional gel electrophoresis analysis[J]. Journal of Applied Phycology, 2003, 15(6): 485-496.
- [22] 刘彩霞, 顾文辉, 黄爱优, 等. 兼养小球藻在不同浓度 Fe³⁺培养下的蛋白质组学研究 [J]. 海洋科学, 2017, 41(3): 1-7.
Liu Caixia, Gu Wenhui, Huang Aiyu, et al. Proteomic analysis of mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* exposed to different iron concentrations [J]. Marine sciences, 2017, 41(3): 1-7.
- [23] Gu W, Li H, Zhao P, et al. Quantitative proteomic analysis of thylakoid from two microalgae (*Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina*) reveals two different high light-responsive strategies[J]. Scientific Reports, 2014, 4(4): 6661.
- [24] 赵佩佩, 顾文辉, 伍松翠, 等. 氮限制有利于三角褐指藻脂质积累[J]. 科学通报, 2015, 23): 2196-2208.
Zhao Peipei, Gu Wenhui, Wu Songcui, et al. Changes in central carbon metabolism of *Phaeodactylum tricorutum* are beneficial for lipid accumulation under nitrogen starvation conditions[J]. 2015, (23): 2196-2208.
- [25] Blonder J, Chan K C, Issaq H J, et al. Identification of membrane proteins from mammalian cell/tissue using methanol-facilitated solubilization and tryptic digestion coupled with 2D-LC-MS/MS[J]. Nature Protocols, 2006, 1(6): 2784-2790.
- [26] Xia J R, Kun-Shan G A. Impacts of elevated CO₂ concentration on biochemical composition, carbonic anhydrase, and nitrate reductase activity of freshwater green algae[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2005, 47(6): 668-675.
- [27] Berry J, Boynton J, Kaplan A, et al. Growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii* as a function of CO₂ concentration [M]. 1976.
- [28] Raven J. Physiology of inorganic carbon acquisition and implications for resource use efficiency by marine phytoplankton: Relation to increased carbon dioxide and temperature[J]. Plant Cell & Environment, 1991, 14(8): 779-794.
- [29] Giordano M, Beardall J, Raven J A. CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution[J]. Annual Review of Plant Biology, 2005, 56(1): 99-131.
- [30] Raven J A. Inorganic carbon acquisition by eukaryotic algae: four current questions [J]. Photosynthesis Research, 2010, 106(1-2): 123-134.
- [31] Raven J A. Praeger Review: Effects on marine algae of changed seawater chemistry with increasing atmospheric CO₂[C]//Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy. Royal Irish Academy, 2011: 1-17.
- [32] Wu Y, Gao K, Riebesell U. CO₂-induced seawater acidification affects physiological performance of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Biogeosciences Discussions, 2010, 7(9): 2915-2923.
- [33] 杨晓玲, 郭金耀. CO₂对盐藻生长及物质积累的影响[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(5): 211-212.
Yang Xiaoling, Guo Jinyao. Effects of CO₂ on growth and substance accumulation of *Dunaliella salina*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(5): 211-212.
- [34] 李春雷. 海洋微藻对 CO₂ 富加响应的实验生态学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
Li Chunlei. The Experimental Ecology Studies on Responses of Marine Microalgae to the CO₂ Enrichment[D]. Ocean University of China, 2009.
- [35] Muradyan E A, Klyachko-Gurvich G L, Tsoglin L N, et al. Changes in Lipid Metabolism during Adaptation of the

- Dunaliella salina Photosynthetic Apparatus to High CO₂ Concentration [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2004, 51(1): 53-62.
- [36] Becker E W. Microalgae, Biotechnology and Microbiology, Quarterly Review of Biology[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- [37] Cheng L H, Chen H L, Zhang L, et al. Study on medium composition of microalgae optimization for CO₂ removal from air by a membrane-photobioreactor[R]. Sae Technical Paper, 2004.

The physiological and metabolic response of *Dunaliella salina* to different concentrations of CO₂ based on proteomics

CAI Xue-hua^{1, 3}, GU Wen-hui^{1, 2, 4}, LI Yuan-xiang^{1, 3}, WANG Guang-ce^{1, 2, 4}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 3. College of Earth Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Mac. 27, 2018

Key words: *Dunaliella salina*; CO₂ concentration; proteomic analysis; photosynthesis; oxidative stress

Abstract: To study the effect of different concentration of CO₂ on *Dunaliella salina*, a gas mixing system, GMS 150, was used to produce precise gas mixtures with N₂ and CO₂. We investigated the growth rate, carbonic anhydrase (CA enzyme) activity, and glycerol content under different concentration of CO₂. Differentially-expressed proteins in *D. salina* exposed to different CO₂ concentrations were analyzed. Our results showed that both the physiological and photosynthetic activity increased with increasing CO₂ concentration, while higher concentrations suppressed this trend. The optimal concentration for cell growth was 3% CO₂. Extracellular CA enzyme activity declined with increasing CO₂ concentration. β-Carotene accumulated under lower CO₂, while higher CO₂ facilitated glycerol synthesis. The photosynthetic activity of PS II increased under 0.03% to 3% CO₂ and was inhibited under 9% CO₂. The relative expression of photosynthetic proteins was consistent with this trend. The synthesis and proportion of light-harvesting pigment was possibly regulated by changes in CO₂ concentration. Higher CO₂ concentrations may induce cellular oxidative stress. To cope with these negative factors, heat shock proteins and superoxide dismutase were up-regulated.

(本文编辑: 梁德海)