

## 2 个重组海带 $\alpha$ -碳酸酐酶(CA)的酶活性比较研究

王震<sup>1</sup>, 毕燕会<sup>1</sup>, 周志刚<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产遗传资源开发利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 为了探究海带(*Saccharina japonica*) $\alpha$ -CA1 和 $\alpha$ -CA2 是否具有催化 CO<sub>2</sub> 的可逆水合反应和酯酶活性, 作者通过原核表达得到这两种 $\alpha$ -CA 的可溶性的异源重组蛋白。分别用电极法和酯酶活性检测法来检测重组 $\alpha$ -CA1( $\alpha$ -CA1)和  $\alpha$ -CA2 的水合酶活性和酯酶活性, 结果发现,  $\alpha$ -CA1 的水合酶活性(1.52±0.120 U/mg)几乎是  $\alpha$ -CA2(0.54±0.046 U/mg)的 3 倍, 表明  $\alpha$ -CA1 催化 CO<sub>2</sub> 的水合能力明显大于  $\alpha$ -CA2。而两者的酯酶活性并没有显著的差别( $\alpha$ -CA1 比活力: 0.697±0.176 U/g,  $\alpha$ -CA2 比活力: 0.743±0.129 U/g), 说明催化乙酸对硝基苯酯(*p*-NPA)生成对硝基苯酚(*p*-NP)的能力是没有显著差别的。实验结果证实这 2 个 $\alpha$ -CA 为功能蛋白, 可能参与海带无机碳吸收和储存过程, 因此, 本研究为海带无机碳吸收和储存机制的解析提供了生物化学依据。

**关键词:** 海带(*Saccharina japonica*);  $\alpha$ -碳酸酐酶(CA); 原核表达; 水合酶活性; 酯酶活性

中图分类号: S968.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2022)07-0061-09

DOI: 10.11759/hyxx20220105001

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA; EC 4.2.1.1)是一种金属酶, 绝大多数是以锌(Zn)原子作为金属配合物, 催化 CO<sub>2</sub> 的可逆水合反应, 实现 CO<sub>2</sub> 与 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 之间的快速转化<sup>[1-3]</sup>。CA 普遍存在于包括具有光合作用的所有生物中<sup>[4]</sup>, 基于保守的核苷酸序列, CA 目前被分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 和 $\iota$  9 个亚型<sup>[5-11]</sup>。不同亚型 CA 序列没有相似性, 属于催化功能的趋同进化。

早在 1967 年, 在孔石莼(*Ulva pertusa*)中首次检测到大型海藻的 CA 活性<sup>[12]</sup>。随后, 对不同海域 150 种海藻进行 CA 活性检测, 发现 CA 普遍存在于这些受检的海藻中<sup>[13]</sup>。但这些均是对藻体 CA 总活性或胞内及胞外 CA 总活性的报道, 尚无法完成 CA 家族单个成员在藻体内的活性检测。海带(*Saccharina japonica*)是一种大型褐藻, 具有重要的经济和生态价值。通过对海带全长转录组分析, 目前认为海带 CA 家族具有 11 个成员, 分属  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -CA 亚型<sup>[14]</sup>。类似地, BI 等<sup>[15]</sup>成功测得海带配子体的胞内及胞外 CA 总活性, 岳国峰等<sup>[16]</sup>报道胞外 CA 在海带孢子体无机碳吸收中起着主要作用。为深入研究各 CA 成员在海带无机碳吸收和储存中的作用, 通过分子细胞学手段, 余贞等<sup>[17]</sup>自海带配子体细胞中, 率先报道了第 1 个 CA 的基因特征; 随后, 利用胶体金免疫电镜手段, YE

等<sup>[18]</sup>确定了 $\alpha$ -CA1 于海带配子体细胞的叶绿体中发挥作用; BI 等<sup>[19]</sup>明确了 $\alpha$ -CA2 位于海带配子体细胞壁中; BI 等<sup>[20]</sup>证实了  $\gamma$ -CA 位于线粒体中。这些研究为海带无机碳富集机制解析提供了分子细胞学证据, 但具体各 CA 在海带内是否发挥功能, 还需对其活性进行鉴定。

基于 YE 等<sup>[18]</sup>和 BI 等<sup>[19]</sup>的研究结果, 本研究首先通过原核表达获得 $\alpha$ -CA1 和 $\alpha$ -CA2 的可溶性重组蛋白; 然后分离纯化可溶性的重组 $\alpha$ -CA1 和 $\alpha$ -CA2, 利用电极法检测它们水合反应活性。鉴于 $\alpha$ -CA 还能催化羧酸酯<sup>[21]</sup>的水解反应, 利用分光光度法检测了它们的酯酶活性, 并探讨抑制剂 AZ 对重组 $\alpha$ -CA 酯酶活性的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。本研究的结果不仅从功能上鉴定了这 2 个海带 $\alpha$ -CA 基因, 也有助于进一步比较分析两者的生化特性, 为海带无机碳利用途径的解析奠定扎实的生物化学基础。

收稿日期: 2022-01-05; 修回日期: 2022-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(41376136); 国家重点研发计划项目(2018YFD0901500)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41376136; The National Key R & D Program of China, No. 2018YFD0901500]

作者简介: 王震(1990—), 男, 山东菏泽人, 硕士研究生, 主要从事藻类生物技术研究, E-mail: 740352930@qq.com; 周志刚(1964—), 通信作者, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 生物材料

在温度(17±1) °C、光强 40 μmol photons/(m<sup>2</sup>·s)和光周期 16 h/8 h(光照/黑暗)条件下<sup>[22]</sup>, 将海带雌、雄配子体培养于 PES 培养基<sup>[23]</sup>中; 每 2 个星期更换 1 次培养基。将大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 DH5α 感受态细胞及 BL21(DE3)感受态细胞(天根生化科技(北京)有限公司)接种于 Luria-Bertani(LB)培养基中。

## 1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 TRIzol 试剂法(Clontech 公司)抽提海带配子体总 RNA, 利用反转录试剂盒(TaKaRa 公司)对 RNA 进行反转录, 合成 cDNA。具体操作参照各试剂盒的说明书进行。-20 °C 保存 cDNA 备用。

## 1.3 海带α-CA2 原核表达载体的构建与转化

将 BI 等<sup>[19]</sup>已经建立并携带 pET28a-αCA2 表达载体的大肠杆菌, 通过目的基因的诱导表达和 SDS-PAGE 检测, 发现绝大部分重组的(recombinant)α-CA2(α-CA2)是以包涵体的形式表达, 不利于后续的酶活性检测。因而, 本研究选择了表达载体 pET-32a(上海友科生物科技有限公司)来构建 pET32a-αCA2。

根据 pET-32a 多克隆位点的碱基序列及 α-CA2 基因切去信号肽所对应的 cDNA 序列, 设计上游引物 HEP-F(ggatccCAACGGCAGCGTGGACCCA, 小写字母为 BamHI 酶切识别位点)和下游引物 HEP-R(ctcgagTCACACTATGTAAACGGCGCGCCCG, 小写字母为 XhoI 酶切识别位点)。用这对引物以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 以扩增目的基因。反应程序为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 66.7 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

PCR 扩增结束后, 取 20 μL 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测。按照 PCR 产物纯化试剂盒(Aidlab 公司)说明书纯化 PCR 产物, 将其连接至 pMD19-T 克隆载体(TaKaRa 公司); 然后利用热激法转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 用蓝白斑方法筛选阳性克隆; 通过菌液 PCR 进行重组子的鉴定, 并将挑取的阳性重组子送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行基因的序列分析。

利用质粒提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)提取 pMD19T-αCA2 和表达质粒 pET-32a, 并用限制性核酸内切酶 BamHI 和 XhoI(TaKaRa 公司)

将这两种质粒于 37 °C 分别进行双酶切反应 4 h, 再将纯化的目的产物用 T4 连接酶连接, 得到含目的片段的重组表达质粒 pET32a-αCA2。按上述同样方法经蓝白斑筛选和测序后, 利用热激法将测序正确并经双酶切验证的 pET32a-αCA2 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态宿主细胞, 得到转基因株 ET32a-αCA2/BL21。将测序正确的菌液与 20%的甘油以 1 : 1(v/v)的比例混匀, 冻存于-80 °C 冰箱备用。用 pET-32a 空载作阴性对照。

## 1.4 α-CA2 重组蛋白的诱导表达与电泳检测

采用 Ye 等<sup>[18]</sup>的方法, 将携带重组表达质粒 pET32a-αCA2 和空载 pET-32a 的菌液分别接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中, 先后进行活化、放大培养至菌液的 OD<sub>600</sub> 值为 0.6~0.8, 添加终浓度为 1.0 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG), 在 37 °C 下、以 180 r/min 的转速诱导表达 4 h 后收集菌体, 用 25 mL 的 1×磷酸缓冲液(PBS)(pH 8.0)重悬菌体。取 50 μL 重悬的全菌与 2×蛋白上样缓冲液以 1 : 1 的比例混合, 在液氮和 30 °C 水浴锅中反复冻融 3 次并超声破碎至溶液透亮; 在 4 °C 下、以 14 000 r/min 的转速离心 5 min; 收集上清并用 1×PBS 按 10 : 1(菌液: 1×PBS)的比例重悬沉淀, 分别留样以用于十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)的检测。

## 1.5 α-CA2 重组蛋白的免疫印迹

鉴于 α-CA2 是与表达质粒 pET-32a 中的聚 His 标签融合表达的, 因此可以利用商用的抗聚 His 标签的特异性抗体来进行 Western 印迹分析。按照陈晶等<sup>[24]</sup>的方法, 将全菌经 SDS-PAGE 后的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 以抗聚 His 标签抗体(上海友科生物科技有限公司)作为一抗, HRP 标记的羊抗兔二抗作为二抗, 对融合表达的目的蛋白进行免疫印迹检测。最后按增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)的说明书显影, 并拍照记录。

## 1.6 α-CA2 重组蛋白的纯化

收集转基因菌株 pET32a-αCA2/BL21 的沉淀和上清液, 经 SDS-PAGE 检测, 发现上清液和沉淀中都出现目的蛋白表达的条带。将上清液抽滤后, 按照 Bio-Scale<sup>TM</sup> Mini Profinity<sup>TM</sup> IMAC Cartridges 蛋白亲和层析纯化预装柱(Bio-Rad 公司)的说明书,

用含不同浓度咪唑的缓冲液(50 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、300 mmol/L  $\text{KCl}$ , pH 8.0)洗脱以纯化  $\alpha$ -CA2。

洗脱液经 SDS-PAGE 检测后, 收集含目的蛋白的部分。先用 50 倍体积的 20 mmol/L  $\text{Tris-HCl}$ (pH=8.0) 4 °C 透析 12 h; 再用 50 倍体积的去离子水透析 12 h; 最后, 在 4 °C 下用 PEG-20000 对样品进行浓缩并利用 BRADFORD 方法<sup>[25]</sup>测定其浓度, 4 °C 保存备用。

### 1.7 海带 $\alpha$ -CA1 重组蛋白的诱导表达和纯化

将 YE 等<sup>[18]</sup>已经建立并携带 pET28a- $\alpha$ CA1 表达载体的大肠杆菌, 按上述步骤经菌株活化、扩培、破碎和 SDS-PAGE 检测, 发现  $\alpha$ -CA1 大部分以可溶性蛋白的形式表达在上清液中。因此, 可按上述亲和层析法, 从该转基因菌株的上清液中直接纯化目的蛋白, 用于后续酶活性的检测。

### 1.8 重组 $\alpha$ -CA 的 $\text{CO}_2$ 水合反应酶活性检测

根据 WILBUR 等<sup>[26]</sup>的电极法原理测定纯化后  $\alpha$ -CA 的  $\text{CO}_2$  水合酶活性。在预冷的 4 mL 巴比妥缓冲液(pH 8.4)中加入 1 mL 纯化后的重组蛋白溶液(1.216 mg/mL), 待 pH 计读数稳定在 8.3 后, 立即加入 3 mL 饱和的  $\text{CO}_2$  水(将  $\text{CO}_2$  通入到 0 °C 的去离子  $\text{H}_2\text{O}$  中, 持续通气 1 h 以上), 记录 pH 下降 1 个单位所需的时间, 整个反应过程的温度控制在 0 °C 左右。以不加重组蛋白的为对照组, 测定下降一个 pH 单位所需要的时间, 每组 3 个重复, 将 1 个酶活性单位(U)定义为  $(t_0-t)/t$ <sup>[26]</sup>; 其中,  $t_0$  和  $t$  代表分别代表不加酶液和加入酶液后 pH 下降 1 个单位所用的时间(min); 这样,  $\alpha$ -CA 的比活力则以 “ $(t_0-t)/t/\text{mg}$  蛋白质” 来计算。

### 1.9 重组 $\alpha$ -CA 酯酶活性的测定

$\alpha$ -CA 能将乙酸对硝基苯酯( $p$ -NPA)水解成对硝基苯酚( $p$ -NP)<sup>[27]</sup>。本研究将 0.2 mL  $1\times\text{PBS}$  溶液、0.6 mL 的重组蛋白(0.533 mg/mL)与 0.1 mL 的  $p$ -NPA 迅速混合以构建酯酶反应体系, 并利用分光光度法立即记录下此时的  $\text{OD}_{405}$ , 随后每隔 3 min 测 1 次  $\text{OD}_{405}$ 。以  $\text{Tris-HCl}$  缓冲液为对照, 根据对照组和实验组的  $\text{OD}_{405}$  数值变化来检测  $\alpha$ -CA 的酯酶活性, 每组 3 个重复。若 1 个酶活性单位(U)定义为在 0 °C 下、每 min 产生 1  $\mu\text{mol}$  的  $p$ -NP<sup>[28]</sup>, 那么,  $\alpha$ -CA 的比活力即可用 “ $(C-C_0)\times V/t/\text{g}$  蛋白质” 来计算; 其中  $C$ 、 $C_0$  分别代表加酶组和对照组产生的  $p$ -NP 浓度( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ),  $V$  为总反应体积(mL),  $t$  为反应时间(min)。反应体系中所产生的  $p$ -NP 可根据  $p$ -NP 浓度与  $\text{OD}_{405}$  之间的标

准曲线求得。

### 1.10 抑制剂 AZ 对重组 $\alpha$ -CA 酯酶活性的影响

在预实验的基础上, 本研究在上述酯酶反应体系中, 添加 10、30、50、100、200、250 及 500  $\mu\text{mol}/\text{L}$  等不同梯度浓度的 AZ, 然后每隔 3 min 记录在 405 nm 下的吸光度。最后按上述酯酶比活力的公式计算不同梯度浓度 AZ 处理后的  $\alpha$ -CA 酶活性, 并计算相应的抑制率, 从而推算出  $\text{IC}_{50}$  的抑制剂浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 pET32a- $\alpha$ CA2 原核表达载体的构建

基于  $\alpha$ -CA2 的全长 cDNA 序列、pMD19-T 及 pET-32a 多克隆位点的序列, 设计带酶切识别位点的引物 HEP-F 和 HEP-R, 以海带配子体的 cDNA 为模板, 扩增到  $\alpha$ -CA2 的开放阅读框(ORF)序列, 连接至克隆质粒 pMD19-T 上以构建 pMD19T- $\alpha$ CA2; 提取该质粒, 用 BamHI 和 XhoI 对其及表达质粒 pET-32a 分别进行双酶切反应, 连接目的片段以构建 pET32a- $\alpha$ CA2。提取 pET32a- $\alpha$ CA2, 经 BamHI 和 XhoI 的双酶切反应, 其产物经电泳检测, 只观察到目的基因大小(816 bp)和载体序列大小(5854 bp)的片段(图 1 泳道 1); 目的基因的序列分析结果进一步表明, 已准确地将  $\alpha$ -CA2 插入至表达质粒 pET-32a 中。

### 2.2 $\alpha$ -CA2 的诱导表达、纯化和免疫印迹检测

将 pET32a- $\alpha$ CA2 转化大肠杆菌, 获得转基因细胞系。经放大培养并添加 IPTG 诱导培养后, 收集菌体, 反复冻融以破碎细胞, 提取分别得到上清液和沉淀中的蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳, 发现上清液(图 1 泳道 2)和沉淀(图 1 泳道 3)中均出现目的蛋白的条带; 它的预测分子量大小为 45.57 kD, 包含 29.27 kD 由目的基因编码的蛋白和 15.3 kD 由表达质粒 pET-32a 中 His 标签及多克隆位点碱基所编码的多肽。由于利用表达质粒 pET-32a 中的 His 标签融合表达目的蛋白, 因此, 可利用商业提供的抗聚 His 标签的抗体, 对转基因细胞系中的总蛋白进行 Western 免疫印迹。结果(图 1 泳道 4)显示, 在目的蛋白大小处只出现单一条带的信号, 说明该处的重组蛋白中含有 His 标签; 印迹所对应的分子量大小约为 45 kD, 与目的蛋白的预测分子量大小相符, 从而表明重组表达的就是目的基因  $\alpha$ -CA2 所编码的蛋白。

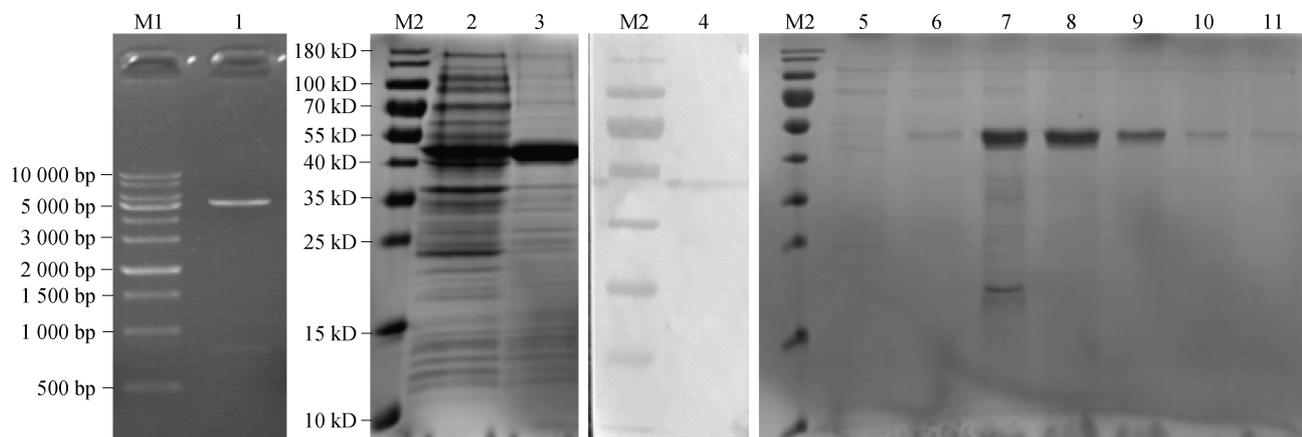


图1  $\alpha$ -CA2 原核表达载体双酶切凝胶电泳图及重组 $\alpha$ -CA2 表达和纯化产物的 SDS-PAGE 与免疫印迹图谱

Fig. 1 Electrophoresis patterns of double enzyme digested pET32a- $\alpha$ CA2, SDS-PAGE results of expression and purification of recombinant  $\alpha$ -CA2 and Western blotting pattern of  $\alpha$ -CA2

M1. DNA 分子量标准; M2. 预染蛋白质分子量标准; 泳道 1. 重组表达质粒 pET32a- $\alpha$ CA2 的双酶切产物; 泳道 2 和 3. 重组菌的上清液和沉淀部分; 泳道 4. 重组菌的全菌蛋白; 泳道 5-11. 经含 5、10、50、100、150、200 和 250 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱的产物

M1. 1 kb DNA Ladder Marker; M2. PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Lane 1. Double enzyme digested products of the construct pET32a- $\alpha$ CA2; Lanes 2 and 3. supernatant and insoluble, respectively, fractions of the transformed bacteria; Lane 4. crude proteins of the transformed bacteria; Lanes from 5 through 11. the eluted products with a buffer solution containing 5, 10, 50, 100, 150, 200 and 250 mmol/L imidazole, respectively

利用 Bio-Scale™ Mini Profinity™ IMAC Cartridges 蛋白亲和层析纯化预装柱, 对自上清中提取的粗蛋白依次用含不同浓度咪唑的洗脱缓冲液来洗脱以纯化目的蛋白。其洗脱液经 SDS-PAGE 电泳和染色, 结果(图 1 泳道 5-11)显示, 用含 150 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱下来的蛋白, 在目的蛋白大小处只显现一条带(图 1 泳道 9)而无杂带。因此, 可以利用含 150 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液来纯化重组的  $\alpha$ -CA2。

### 2.3 $\alpha$ -CA1 的诱导表达、纯化和免疫印迹检测

将 YE 等<sup>[18]</sup>已经建立并携带 pET28a- $\alpha$ CA1 表达载体的大肠杆菌, 按上述  $\alpha$ -CA2 的方法进行诱导表达。全菌蛋白的电泳结果显示: 相对于未诱导表达的菌株(图 2 泳道 1), 在约 34 kD 处出现一不同的条带(图 2 泳道 2); 其大小与重组 $\alpha$ -CA1 大小(30.3 kD)及目的基因上游 His 标签和多克隆位点等碱基编码蛋白(2.2 kD)之和相近; 利用 His 标签抗体进行免疫印迹, 结果显示在目的蛋白大小处只出现一条印迹(图 2 泳道 5); 这些结果均表明, 该条带即为目的蛋白条带。转基因菌株上清液及沉淀物的 SDS 凝胶电泳结果显示,  $\alpha$ -CA1 经诱导培养后主要表达在上清液中(图 2 泳道 3)。按上述  $\alpha$ -CA2 亲和层析的方法纯化  $\alpha$ -CA1;

不同浓度咪唑洗脱缓冲液的 SDS 凝胶电泳结果显示, 20 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液有利于从上清液中纯化到  $\alpha$ -CA1(图 2 泳道 9); 这样就可以利用含 20 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液来纯化重组的  $\alpha$ -CA1。

### 2.4 $\alpha$ -CA 的 CO<sub>2</sub> 水合反应活性

利用上述经亲和层析纯化制备的  $\alpha$ -CA1 和  $\alpha$ -CA2, 分别构建体外的 CO<sub>2</sub> 水合反应(即 CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O→HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>+H<sup>+</sup>)体系, 经电极法测定可知: 在不加  $\alpha$ -CA1 的体系中, 需要约 239 s 的时间, pH 才能自 8.0 下降到 7.0; 但在加入  $\alpha$ -CA1 的体系中, 只需要约 84 s 的时间, pH 就下降到 7.0; 从而表明  $\alpha$ -CA1 具有加速 CO<sub>2</sub> 的水合反应能力。经计算可知,  $\alpha$ -CA1 的水合反应比活力为 1.52±0.120 U/mg 蛋白(3 次重复试验的平均值±标准差, 以下同, 图 3)。同样, 检测结果表明,  $\alpha$ -CA2 约需要 140 s 的时间, 使反应体系的 pH 下降 1 个单位; 经计算可知,  $\alpha$ -CA2 的水合反应比活力为 0.54±0.046 U/mg 蛋白(图 3), 极显著地低于  $\alpha$ -CA1 的 CO<sub>2</sub> 水合酶活性( $P<0.01$ )。

### 2.5 $\alpha$ -CA 的酯酶水解活性

$\alpha$ -CA 能将 p-NPA 水解成 p-NP, 而后者在 405 nm 波长处具有特殊的吸收峰, 可用于 p-NP 的定量或定性分析。因此在  $\alpha$ -CA 酯酶活性检测之前, 需建立 p-NP 量与 OD<sub>405</sub> 之间的关系式。在预实验的基础上,

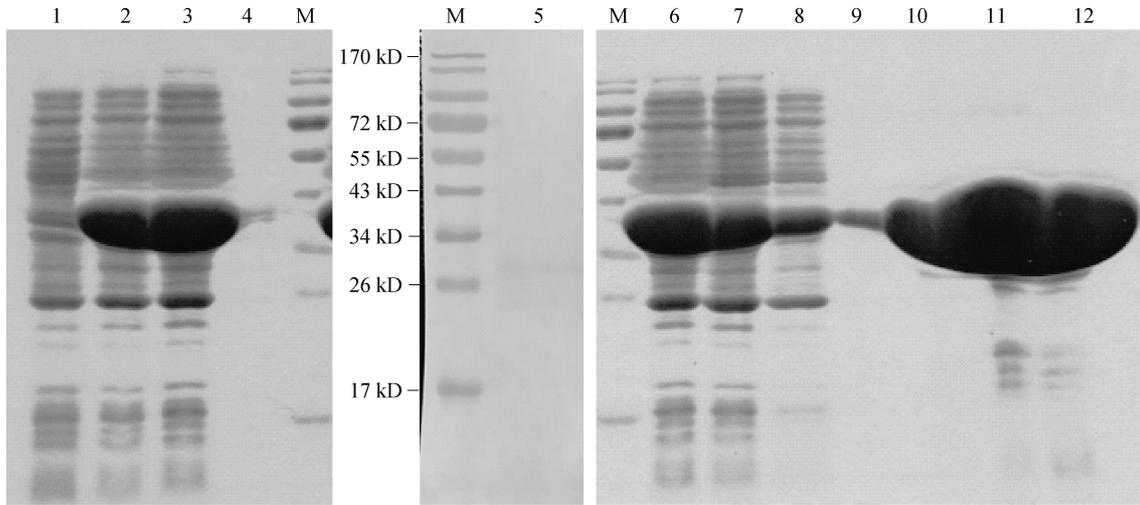


图 2  $\alpha$ -CA1 表达和纯化产物的 SDS-PAGE 与免疫印迹图谱

Fig. 2 SDS-PAGE profiles of the expressed and purified recombinant  $\alpha$ -CA1 and its Western blotting pattern

M. 预染蛋白质分子量标准; 泳道 1. 未经 IPTG 诱导培养的转基因菌株的全菌蛋白; 泳道 2、5 和 6. 经 IPTG 诱导培养的转基因菌株的全菌蛋白; 泳道 3 和 4. 重组菌株的上清液和沉淀部分; 泳道 7. 流穿; 泳道 8-12. 经含 10、20、50、200 和 500 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱的产物

M. Prestained Protein Ladder; Lane 1: crude proteins expressed in the transgenic bacterium cultured without addition of IPTG; Lanes 2, 5 and 6. crude proteins expressed in the transgenic bacterium cultured with IPTG as an inducer; Lanes 3 and 4. soluble and insoluble fractions extracted from the transgenic bacterium after induced culture with addition of IPTG; Lane 7. Flow through; Lanes from 8 through 12. the eluted products with a buffer solution containing 10, 20, 50, 200 and 500 mmol/L imidazole, respectively

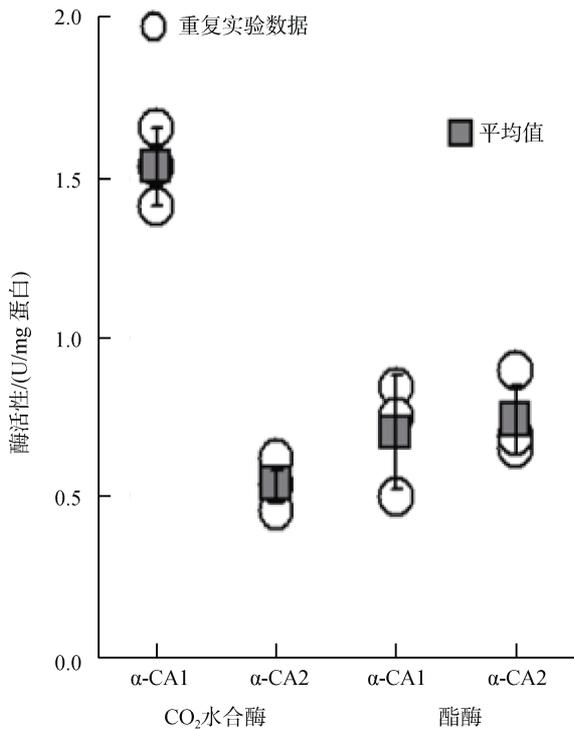


图 3  $\alpha$ -CA1 和  $\alpha$ -CA2 的  $\text{CO}_2$  水合反应及 p-NPA 的酯酶水解活性

Fig. 3 Enzyme activity of the hydration of  $\text{CO}_2$  and the hydrolysis of p-NPA catalyzed by the recombinant  $\alpha$ -CA1 and  $\alpha$ -CA2

通过检测, 作者发现在 0.05~6  $\mu\text{mol/L}$  的 p-NP 之间,  $\text{OD}_{405}$  与 p-NP 的量呈现正比例的线性关系, 从而建立  $y=0.0159x+0.0179$  ( $R^2=0.9807$ )。该方程式中的  $y$  代表  $\text{OD}_{405}$ ,  $x$  代表 p-NP 的浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )。

利用制备的  $\alpha$ -CA1 和  $\alpha$ -CA2 分别构建体外水解 p-NPA 的酯酶反应体系, 经分光光度计检测, 发现随着反应时间的延长,  $\text{OD}_{405}$  值也会相应地增加, 说明加入的  $\alpha$ -CA 能水解 p-NPA, 使 p-NPA 逐渐水解从而生成 p-NP。但在不添加重组蛋白的对照组中, 12 min 时,  $\text{OD}_{405}$  值就不再发生明显的变化, 表明此时这个反应体系几乎不产生新的 p-NP。为此, 作者以 12 min 的反应时间来计算酶促反应的活性。

检测后经计算可知,  $\alpha$ -CA1 的酯酶比活力为  $0.697 \pm 0.176$  U/mg;  $\alpha$ -CA2 的酯酶比活力为  $0.743 \pm 0.129$  U/mg, 经统计分析, 二者差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

## 2.6 抑制剂 AZ 对 $\alpha$ -CA 酯酶活性的影响

在上述建立的体外酯酶反应体系中添加不同浓度的抑制剂 AZ 来探究该抑制剂对  $\alpha$ -CA 酯酶活性的影响, 结果表明当 AZ 的浓度增加到 250  $\mu\text{mol/L}$  或 500  $\mu\text{mol/L}$ , 反应体系中的  $\text{OD}_{405}$  几乎不再发生显著变化, 说明此时两个重组  $\alpha$ -CA 的酯酶活性已接近完全被抑制(表 1)。

表 1 不同浓度乙酰唑胺(AZ)对  $\alpha$ -CA 酯酶活性的抑制率

Tab. 1 Percent inhibition of acetazolamide (AZ) at different concentrations on the esterase activity of two recombinant  $\alpha$ -type carbonic anhydrases

$\alpha$ -CA 酯酶	$\alpha$ -CA 酯酶活性抑制率/%						
	AZ 浓度/( $\mu$ mol/L)						
	10	30	50	100	200	250	500
$\alpha$ -CA1	7.24 $\pm$ 2.59	53.81 $\pm$ 16.06	63.29 $\pm$ 18.84	66.17 $\pm$ 9.13	75.84 $\pm$ 7.67	97.33 $\pm$ 4.62	92.83 $\pm$ 6.34
$\alpha$ -CA2	18.25 $\pm$ 3.82	21.92 $\pm$ 5.66	54.17 $\pm$ 3.70	81.15 $\pm$ 18.75	84.43 $\pm$ 2.23	111.11 $\pm$ 19.25	100.69 $\pm$ 7.32

利用 SigmaPlot 4.0 软件对表 1 的数据进行非线性回归, 从而计算出  $\alpha$ -CA1 的  $IC_{50}$ =30.2  $\mu$ mol/L,  $\alpha$ -CA2 的  $IC_{50}$ =53.6  $\mu$ mol/L。由此可以看出  $\alpha$ -CA1 对 AZ 的敏感度明显高于  $\alpha$ -CA2。

### 3 讨论

本研究根据已报道的海带配子体  $\alpha$ -CA1 和  $\alpha$ -CA2 的 cDNA 序列<sup>[18, 19]</sup>, 利用原核表达技术, 在大肠杆菌中异源表达了这两个  $\alpha$ -CA 的可溶性蛋白, 经亲和柱层析纯化并利用纯化的  $\alpha$ -CA 构建了体外 CO<sub>2</sub> 水合反应的体系, 利用电极法检测了它们的水合反应活性, 这不仅从功能上鉴定了这两个基因, 也有助于进行两者的功能比较并分析它们可能的生物学作用。

本研究的结果指出, 海带  $\alpha$ -CA2 的水合反应比活力为 1.52 U/mg 蛋白, 而  $\alpha$ -CA1 的为 0.54 U/mg 蛋白(图 3)。两者的水合反应比活力, 虽然明显低于衣藻周质  $\beta$ -CA(比活力为 4.2 U/mg)<sup>[29]</sup>和三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*)类囊体腔  $\theta$ -CA(比活力为 30.9 U/mg)<sup>[10]</sup>, 但却高于自生长于南极冰中一种衣藻 (*Chlamydomonas* sp. ICE-L) 以及绿潮藻浒苔 (*Ulva prolifera*) 经异源重组的  $\alpha$ -CA(比活力分别为 0.437 和 0.267 U/mg)<sup>[30, 31]</sup>。至于酯酶活性, 海带  $\alpha$ -CA 与南极冰中那种衣藻 (*Chlamydomonas* sp. ICE-L) (0.319 U/mg<sup>[30]</sup>) 的结果相近。

值得指出的是, 本研究所检测的酶活性是携带 His 标签的融合蛋白, 而非海带配子体的天然  $\alpha$ -CA。尽管 His 标签的分子量小, 对目标蛋白的酶活性及结构等的负面影响较小<sup>[32]</sup>, 但越来越多的研究<sup>[33]</sup>表明, 它的负面影响不容忽视。同时, 在  $\alpha$ -CA 的纯化过程中, 作者使用了 IMAC 蛋白亲和层析纯化预装柱(即 Ni 柱); 在此过程中,  $\alpha$ -CA 的金属辅基 Zn<sup>2+</sup>有可能被 Ni 柱中的氨三乙酸吸附<sup>[34]</sup>。另外, 人类  $\alpha$ -CA 的催化作用机理是目前研究最透彻的, 作者

将海带的  $\alpha$ -CA 氨基酸序列与人类水合反应活性很高( $\alpha$ -CAII)、中等( $\alpha$ -CAI)及很低( $\alpha$ -CAIII)的 3 个  $\alpha$ -CA<sup>[35]</sup>作比较, 发现, 海带的  $\alpha$ -CA1 和  $\alpha$ -CA2 均与人类水合反应活性很低的  $\alpha$ -CAIII 的氨基酸序列最接近, 一致性和相似性分别为 27.57%和 44.40%, 及 28.52%和 43.35%。这些都可能是导致海带  $\alpha$ -CA 催化活性较低的原因。因此, 若进行海带  $\alpha$ -CA 的酶促反应动力学研究, 建议使用分离纯化的天然蛋白或将融合表达蛋白的标签利用蛋白酶除去。

岳国峰等<sup>[16]</sup>曾利用 AZ 处理海带雌配子体细胞, 发现培养液的 pH 与对照之间没有发生显著变化, 说明没有胞外 CA 参与无机碳的吸收; 但最近 BI 等<sup>[15]</sup>自海带配子体中检测到胞外 CA 的活性。据 BI 等<sup>[19]</sup>报道,  $\alpha$ -CA2 因位于配子体细胞的周质空间发挥作用, 因而属于胞外 CA。本研究自重组的  $\alpha$ -CA2 中检测到酶活性, 不仅支持了海带配子体胞外 CA 具有生物学活性的观点<sup>[15]</sup>, 也表明  $\alpha$ -CA2 应对海带配子体胞外 CA 的活性作出较大的贡献。鉴于衣藻 (*C. reinhardtii*)<sup>[2]</sup>、硅藻 (*P. tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana*)<sup>[3]</sup>及高等植物<sup>[36]</sup>的细胞中都存在不同类型的胞外 CA, 作者推测海带配子体细胞也可能存在着其他类型但目前尚未知的胞外 CA, 它们的共同作用, 才能使配子体细胞的胞外 CA 活性达到 33.92 U/g 鲜质量<sup>[15]</sup>。

同样, 通过本研究还可以了解到,  $\alpha$ -CA1 应是海带配子体胞内 CA 的活性<sup>[15]</sup>的主要贡献者, 因为  $\alpha$ -CA1 位于配子体细胞的叶绿体中<sup>[18]</sup>; 但位于线粒体的  $\gamma$ -CA<sup>[20]</sup>的贡献也不能被忽视。这样才能使海带配子体细胞胞内 CA 的活性达到 36.83 U/g 鲜质量<sup>[15]</sup>。但这些胞内、胞外 CA 与海带配子体细胞吸收和利用无机碳之间存在着什么关系, 有待进一步揭示。

#### 参考文献:

[1] CANNON G C, HEINHORST S, KERFELD C A. Car-

- boxysomal carbonic anhydrases: Structure and role in microbial CO<sub>2</sub> fixation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, 1804(2): 382-392.
- [2] MORONEY J V, MA Y, FREY W D, et al. The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles[J]. *Photosynth Res*, 2011, 109(1/3): 133-149.
- [3] HOPKINSON B M, DUPONT C L, MATSUDA Y. The physiology and genetics of CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in model diatoms[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2016, 31: 51-57.
- [4] BADGER M R, PRICE G D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 1994, 45(1): 369-392.
- [5] HEWETT-EMMETT D, TASHIAN R E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1996, 5(1): 50-77.
- [6] LEE R B Y, SMITH J A C, RICKABY R E M. Cloning, expression and characterization of the  $\delta$ -carbonic anhydrase of *Thalassiosira weissflogii* (*Bacillariophyceae*)[J]. *Journal of Phycology*, 2013, 49(1): 170-177.
- [7] SO A K C, ESPIE G S, WILLIAMS E B, et al. A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase ( $\epsilon$  class) is a component of the carboxysome shell[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(3): 623-630.
- [8] LANE T W, SAITO M A, GEORGE G N, et al. A cadmium enzyme from a marine diatom[J]. *Nature*, 2005, 435(7038): 42.
- [9] DEL PRETE S, VULLO D, FISHER G M, et al. Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*—the  $\eta$ -carbonic anhydrases[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2014, 24(18): 4389-4396.
- [10] KIKUTANI S, NAKAJIMA K, NAGASATO C, et al. Thylakoid luminal  $\theta$ -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(35): 9828-9833.
- [11] JENSEN E L, CLEMENT R, KOSTA A, et al. A new widespread subclass of carbonic anhydrase in marine phytoplankton[J]. *ISME Journal*, 2019, 13(8): 2094-2106.
- [12] IKEMORI M, NISHIDA K. Carbonic anhydrase in the marine alga *Ulva pertusa*[J]. *Physiologia Plantarum*, 1968, 21(2): 292-297.
- [13] 毕燕会, 卫宁宁, 李佳莉, 等. 碳酸酐酶(CA)在大型海洋褐藻获取与利用无机碳过程中的作用[J]. *生命科学*, 2019, 31(3): 296-309.
- BI Yanhui, WEI Ningning, LI Jiali, et al. The role of carbonic anhydrase in inorganic carbon acquisition and utilization by brown seaweeds[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2019, 31(3): 296-309.
- [14] BI Y H, LI J L, ZHOU Z G. Full-length mRNA sequencing in *Saccharina japonica* and identification of carbonic anhydrase genes[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2019, 4(2): 53-60.
- [15] BI Y H, LIANG C L, LI J L, et al. Effects of inorganic carbon concentration and pH on carbonic anhydrase activity of gametophytes of *Saccharina japonica*[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2021, 6(1): 51-55.
- [16] 岳国峰, 王金霞, 王建飞, 等. 海带幼孢子体的光合碳利用[J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(6): 647-652.
- YUE Guofeng, WANG Jinxia, WANG Jianfei, et al. Inorganic carbon acquisition by juvenile sporophyte of *Laminariales* (*L.Japonica*×*L.Longissima*)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2001, 32(6): 647-652.
- [17] 余贞, 毕燕会, 周志刚. 海带配子体碳酸酐酶(CA)基因的克隆及其特征分[J]. *水产学报*, 2011, 35(9): 1343-1353.
- YU Zhen, BI Yanhui, ZHOU Zhigang. Cloning and characterization of carbonic anhydrase (CA) gene from *Laminaria japonica* gametophytes[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(9): 1343-1353.
- [18] YE R X, YU Z, SHI W W, et al. Characterization of  $\alpha$ -type carbonic anhydrase (CA) gene and subcellular localization of  $\alpha$ -CA in the gametophytes of *Saccharina japonica*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(2): 881-890.
- [19] BI Y H, QIAO Y M, WANG Z, et al. Identification and characterization of a periplasmic  $\alpha$ -carbonic anhydrase (CA) in the gametophytes of *Saccharina japonica* (Phaeophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 2021, 57(1): 295-310.
- [20] BI Y H, DU A Y, LI J L, et al. Isolation and characterization of a  $\gamma$ -carbonic anhydrase localized in the mitochondria of *Saccharina japonica*[J]. *Chemosphere*, 2021, 266: 129162.
- [21] POCKER Y, STONE J T. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate[J]. *Biochemistry*, 1967, 6(3): 668-678.
- [22] 周志刚, 吴超元. 海带无性繁殖系的形成及孢子体诱导[J]. *生物工程学报*, 1998, 14(1): 109-111.
- ZHOU Zhigang, WU Chaoyuan. Clone culture of *Laminaria japonica* and induction of its sporophytes[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1998, 14(1): 109-111.
- [23] STARR R C, ZEIKUS J A. UTEX—The culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures[J]. *Journal of Phycology*, 1993, 29(S2): 1-106.

- [24] 陈晶, 王丽丽, 石微微, 等. 海带配子体中孢子形成相关蛋白(SRP)基因的克隆及其原核表达[J]. 水产学报, 2010, 34(8): 1165-1173.  
CHEN Jing, WANG Lili, SHI Weiwei, et al. Cloning of *srp* gene from the gametophytes of *Laminaria japonica* and its expression in *Escherichia coli*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(8): 1165-1173.
- [25] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [26] WILBUR K M, ANDERSON N G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1948, 176(1): 147-154.
- [27] VERPOORTE J A, MEHTA S, EDSALL J T. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C[J]. Journal of Biological Chemistry, 1967, 242(18): 4221-4229.
- [28] BHAKTA A, BANDYOPADHYAY M, DASGUPTA S, et al. Effect of NaHS on carbonic anhydrase activity of human erythrocyte[J]. Asian Journal of Medical Sciences, 2016, 7(3): 23-27.
- [29] YNALVEZ R A, XIAO Y, WARD A S, et al. Identification and characterization of two closely related  $\beta$ -carbonic anhydrases from *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Physiologia Plantarum, 2008, 133(1): 15-26.
- [30] QU C, HE Y, ZHENG Z, et al. Cloning, expression analysis and enzyme activity assays of the  $\alpha$ -carbonic anhydrase gene from *Chlamydomonas* sp. ICE-L[J]. Molecular Biotechnology, 2018, 60(1): 21-30.
- [31] WANG Y, LIU F, WANG M, et al. Characterization and transcriptional analysis of one carbonic anhydrase gene in the green-tide-forming alga *Ulva prolifera* (*Ulvoophyceae, Chlorophyta*)[J]. Phycological Research, 2020, 68(1): 90-97.
- [32] PORATH J. Immobilized metal ion affinity chromatography[J]. Protein Expression and Purification, 1992, 3(4): 263-281.
- [33] ARNAU J, LAURITZEN C, PETERSEN G E, et al. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins[J]. Protein Expression and Purification, 2006, 48(1): 1-13.
- [34] TERPE K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 60(5): 523-533.
- [35] SUPURAN C T, SCOZZAFAVA A, CASINI A. Carbonic anhydrase inhibitors[J]. Medicinal Research Reviews, 2003, 23(2): 146-189.
- [36] DIMARIO R J, CLAYTON H, MUKHERJEE A, et al. Plant carbonic anhydrases: structures, locations, evolution, and physiological roles[J]. Molecular Plant, 2017, 10(1): 30-46.

# Comparative analysis of enzyme activities of two recombinant $\alpha$ -carbonic anhydrases ( $\alpha$ -CAs) of *Saccharina japonica*

WANG Zhen<sup>1</sup>, BI Yan-hui<sup>1</sup>, ZHOU Zhi-gang<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources Conferred by Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. International Research Center for Marine Biosciences Conferred by Ministry of Science and Technology, Shanghai 201306, China)

**Received:** Jan. 5, 2022

**Key words:** *Saccharina japonica*;  $\alpha$ -carbonic anhydrase (CA); prokaryotic expression; hydration activity; esterase activity

**Abstract:** In order to explore whether the two reported alpha carbonic anhydrases ( $\alpha$ -CA1 and  $\alpha$ -CA2) of *Saccharina japonica* were active, the soluble recombinant proteins of them expressed in *Escherichia coli* were obtained. After purification, the hydratase activity as well as esterase activity of the two recombinant  $\alpha$ -CAs ( $\alpha$ -CA1 and  $\alpha$ -CA2) were detected. The results showed that the hydratase activity of  $\alpha$ -CA1 ( $1.52 \pm 0.120$  U/mg) was almost three times higher than that of  $\alpha$ -CA2 ( $0.54 \pm 0.046$  U/mg), indicating that  $\alpha$ -CA1 exhibited much higher catalytic activity for CO<sub>2</sub> hydration than  $\alpha$ -CA2. There was no significant difference between the esterase activities of  $\alpha$ -CA1 ( $0.697 \pm 0.176$  U/g) and  $\alpha$ -CA2 ( $0.743 \pm 0.129$  U/g), indicating that there was no significant difference between the two  $\alpha$ -CAs in catalyzing the conversion of p-nitrophenyl acetate (p-NPA) to p-nitrophenol (p-NP). The results confirmed that these two  $\alpha$ -CAs were functional proteins, and might participate in the process of inorganic carbon absorption and storage in *S. japonica*. This study provided biochemical proofs for the CO<sub>2</sub> concentrating mechanism of this kelp.

(本文编辑: 谭雪静)