

坛紫菜碳酸酐酶基因的克隆、表达及酶活性分析

郇丽^{1,2}, 贾兆君³, 张宝玉¹, 牛建峰¹, 林阿朋¹, 何林文¹, 王广策¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学 研究生院, 北京 100049; 3. 大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 以坛紫菜丝状体为材料, 采用 RACE 方法获得坛紫菜碳酸酐酶(CA)基因的全长 cDNA。该 cDNA 全长 1 081 bp, 具有一个 825 bp 的开放阅读框, 可编码 274 个氨基酸。序列同源性分析显示该 cDNA 序列推导的氨基酸序列与其他物种的碳酸酐酶具有较高的一致性, 其中与条斑紫菜的一致性达到 96%。氨基酸序列分析表明该蛋白为 β -CA, 含有两个 CA 活性位点, 无跨膜结构, 可能存在于一个信号肽将其定位到叶绿体中, 与藻类和细菌聚类。原核诱导表达得到一个 72 kDa 左右的融合蛋白, 酶活测定结果显示此蛋白具有碳酸酐酶活性。该实验对进一步深入研究坛紫菜 CA 的功能及坛紫菜碳代谢、光合作用等生理过程具有重要的参考价值。

关键词: 坛紫菜; 碳酸酐酶; 序列分析; 原核表达; 酶活性

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)08-0008-08

doi: 10.11759/hyxx20121105002

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA; EC 4.2.1.1)是一种催化 CO_2 和 HCO_3^- 之间相互转化的含锌金属酶, 转化效率较高^[1-2]。该酶分布非常广泛, 在动物、植物、藻类、古细菌和真细菌中均有发现^[3]。碳酸酐酶是 CO_2 浓缩机制(CO_2 concentration mechanism, CCM)中重要的组成成分, 主要参与羧化和脱羧化反应, 可将无机碳从胞外运送到高光合作用活性细胞中, 或将其从高呼吸活性的细胞中转移出来^[4-5]。它能够提高细胞内 Rubisco 羧化位点附近的 CO_2 浓度, 提高光合效率并抑制光呼吸^[6]。此外, 碳酸酐酶还在 pH 调节、光合 CO_2 固定、离子交换、呼吸作用和生物合成等多方面起着非常重要的作用^[7-8]。

依据晶体结构及亚基的组成, 目前已知的碳酸酐酶主要分为 α -CA、 β -CA、 γ -CA 3 个基因家族^[3], 另外在海链藻 *Thalassiosira weissflogii* 和 *Thalassiosira pseudonana* 中发现了 δ -CA^[9-10], 在硫杆菌 *Halothiobacillus neapolitanus* 中发现了 ϵ -CA^[11]。这 5 种类型的碳酸酐酶在一级结构上没有明显的序列相似性, 似乎独立进化^[2]。除了 ϵ -CA 外, 其他 4 种碳酸酐酶在藻类中均有发现^[8]。

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)属于红藻门(Rhodophyta)、红毛菜目(Bangiales)、紫菜属(*Porphyra*), 是我国南方海域特有种, 具有较高的经济价值和营养价值。它的生活史属于特殊的异型世代交替, 包含叶状体(单倍配子体)和丝状体(二倍孢子体)。丝状体主

要分布于潮下带, 体积较小, 钻入贝壳等含碳酸钙的基质中以度过高温。叶状体主要分布于潮间带礁石上, 呈薄膜状。坛紫菜是典型的潮间带海藻, 同时它具有基因组较小, 生长周期短, 进化地位特殊, 遗传背景较为清晰等特点^[12-14], 已逐渐成为海洋藻类研究的一种模式生物, 适合用于藻类的生理生化及分子生物学的研究。

本实验克隆了坛紫菜碳酸酐酶 cDNA 序列的全长, 对其做了系统进化分析, 并将其在原核表达系统中进行了融合表达, 检测出表达的蛋白具有碳酸酐酶的活性, 对进一步研究其功能奠定了基础, 同时对深入研究坛紫菜碳代谢、光合作用等生理过程具有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料的获得

坛紫菜丝状体为本实验室(中国科学院海洋研究所藻类分子生理与发育调控实验室)培养藻株, 用含

收稿日期: 2013-01-04; 修回日期: 2013-03-12

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903030); 国家自然科学基金(41176134); 海洋公益性行业科研专项项目(201105023-7); 国家 973 计划前期专项(2011CB411908)

作者简介: 郇丽(1986-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向为藻类分子生物学, E-mail: huanli86@gmail.com; 王广策, 通信作者, 电话: 0532-82898574, E-mail: gcwang@qdio.ac.cn

有加富培养液的无菌海水培养, 培养基每周更换一次。培养温度为 18°C, 光强为 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光暗周期为 L : D (Light : Dark) = 12 : 12, 持续通入过滤除菌后的空气。

1.2 试剂、试剂盒及仪器

总 RNA 提取试剂盒为 RNAPrep pure (Tiangen, USA), cDNA 合成采用 MMLV 反转录酶试剂盒 (Promega, USA)。Taq DNA 聚合酶、琼脂糖凝胶纯化试剂盒、DNA marker 及蛋白 marker 购自东盛生物公司。pMD 19-T 载体及连接试剂盒购自 TaKaRa 生物技术有限公司。感受态菌株为: *Escherichia coli* DH5 α 及 *E.coli* TB1。其余药品均为进口分装或国产分析纯。基因序列合成及测定委托上海生工生物技术公司完成。PCR 仪及超速低温离心机购自德国 Eppendorf 公司。

1.3 PhCA 基因全长的获得

根据本实验室构建的坛紫菜 EST 库^[15]设计引物 PhCAF 与 PhCAR(表 1), 以坛紫菜丝状体 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带用琼脂糖凝胶纯化试剂盒纯化后克隆入 pMD19-T 载体, 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。转化后, 于氨苄 LB 培养基上挑取单克隆培养, 用上述引物再次进行 PCR 扩增, 以进一步验证克隆为阳性, 将阳性克隆送去上海生工生物技术公司采用 ABI3730 自动测序仪测序。

以上述步骤获得的序列为基础, 采用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)获得坛紫菜碳酸酐酶基因的 5'端序列和 3'端序列。根据已获得的序列设计引物 CA-3' (表 1), 将其与 adapter 通用引物(表 1)一起进行 3'RACE 以获取 PhCA 基因的 3'端序列。同时设计引物 CA-5'1 与 CA-5'2 (表 1)分别用于 5'RACE 中的 Outer 与 Inner PCR 反应。将目的条带纯化、回收、测序, 将序列进行拼接即可得到 PhCA 基因全长。

1.4 序列分析

利用 NCBI 中的 BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行序列同源性对比; 利用 NCBI 中的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)寻找基因序列的完整 ORF; 利用 ExPASy 在线工具(<http://www.expasy.org/>)进行氨基酸序列分

表 1 本实验所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物	序列(5'-3')
PhCAF	GACAACCTGGCTGACGCACAT
PhCAR	CCACATCCACACAAAATCGCT
CA-3'	AGTCTGCTTGAACGATGGC
Adapter Uni	GGCCACGCGTCTGACTAGTAC
CA-5'1	AGTCCGAGCAGCCAATCCAAAG
CA-5'2	AGTTCTGGAAGTAGTTGGGGTC
PhCAorfF	GATGAATTCATGGCGTCCAGATGGCCTTC
PhCAorfR	GCTAAGCTTCCATCCACACAAAATCGCTC

析; 利用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽预测; 利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)寻找跨膜结构。

多序列比对采用 Clustal X (1.83)程序。选择的物种与蛋白序列号如表 2 所示。

表 2 多序列比对所用序列

Tab. 2 CA isoforms used for multiple sequence alignment

物种	序列号
<i>Aeromonas hydrophila</i>	YP_854904
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_974782
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AAC49888
<i>Escherichia coli</i> SE11	BAG75888
<i>Oryza sativa</i>	AAA86943
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	AAL07493
<i>Pisum sativum</i>	1710354A
<i>Porphyra yezoensis</i>	ACI01451
<i>Porphyridium purpureum</i>	BAA12980

系统进化树的构建采用 Clustal X (1.83)程序和 MEGA 2.0 软件, 选择邻位相联法(Neighbor-Joining), 计算方法重复 1 000 次, 进化距离选择 p 距离(p-distance)。选择的物种与蛋白序列号如表 3 所示。

1.5 碳酸酐酶的诱导表达与纯化

根据已取得的 PhCA 基因的全序列, 利用 NCBI 的 ORF Finder 寻找到该基因的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)。结合 ORF 的碱基序列和 pMAL 质粒的酶切位点设计合适的表达引物 PhCAorfF 和 PhCAorfR (表 1), 获得基因完整的 ORF。将其插入到表达载体 pMAL 质粒, 转化至原核表达菌株 *E.coli* TB1 中。在 37°C 的温度下以 200 r/min 摇动至菌液 OD (optical density)值为 0.5 左右, 加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG), 在 16°C,

表 3 构建系统进化树所用序列

Tab. 3 CA isoforms used for phylogenetic analysis

物种	序列号
<i>Aeromonas hydrophila</i>	YP_854904
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_974782
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AAC49888
<i>Chlamydomonas reinhardtii chl.</i>	AAR82948
<i>Chloroherpeton thalassium</i> ATCC 35110	YP_001996270
<i>Coccomyxa</i> sp. PA	AAC33484
<i>Escherichia coli</i> SE11	BAG75888
<i>Griffithsia japonica</i>	AAM93979
<i>Methanothermobacter thermotrophicus</i>	AAC44811
<i>Oryza sativa</i>	AAA86943
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	AAL07493
<i>Pisum sativum</i>	1710354A
<i>Porphyra yezoensis</i>	ACI01451
<i>Porphyridium purpureum</i>	BAA12980
<i>Spinacia oleracea</i>	P16016
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	BAD78300
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	BAA18166
<i>Zea mays</i>	AAA86945

150 r/min 的条件下诱导过夜。表达出的融合蛋白使用 Amylose Resin 纯化柱进行纯化。蛋白样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析。

1.6 酶活的测定

碳酸酐酶活性的测定方法参照 Haglund 等^[16], 略作修改。在预冷的 5 mL 缓冲液(20 mmol/L 巴比妥钠, 400 mmol/L 硫酸钾, pH 8.4)中加入待测样品, 然后迅速加入 3 mL 饱和 CO₂ 的蒸馏水(向冰水混合物中充 60 min 纯 CO₂ 获得), 记录 pH 从 8.0 下降到 7.0 所需的时间。在整个反应过程中, 温度控制在 4°C 左右。本实验设有 3 个实验组, 其中一份不加样品, 一份加入待测样品, 一份加入待测样品和乙酰唑胺(Acetazolamide, AZ)。AZ 是非膜透性的胞外碳酸酐酶专一性抑制剂, 反应体系中其最终浓度为 100 μmol/L。每个实验组进行 3 次实验, 最后的结果取其平均值。

2 结果与分析

2.1 序列分析

克隆所得到的坛紫菜碳酸酐酶基因的序列全长为 1 081 bp, 经 ORF Finder 预测该基因有一个完整的 ORF, 长度为 825 bp, 可编码一个含有 274 个氨基

酸、分子量为 29.67 kDa 的蛋白。5'端非编码区(Untranslated Regions, UTR)长度为 111 bp, 3'端非编码区(UTR)长度为 145 bp, 含一个 Poly A 尾巴。基因全序列及其编码的氨基酸序列如图 1 所示。

经 NCBI 软件分析, PhCA 为 β-CA。SignalP 和 TMHMM 在线软件分析显示其氨基酸序列无跨膜结构, 可能存在一个信号肽将其定位到叶绿体中。根据 PROSITE 数据库分析, 此氨基酸序列含有两个 CA 活性位点, 分别为 PS00704 (CSDSRVPA) 和 PS00705 (EYAVKVLKVRHILVVGHDNCG)。

Blastx 检索发现与其同源的序列均为碳酸酐酶, 且同源性较高。以 Blast 软件对 PhCA 氨基酸序列的相似性比对结果表明, 其与植物、藻类和细菌均有一定的一致性, 例如与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为 37%, 与玉米(*Zea mays*)为 34%, 与莱茵衣藻叶绿体(*Chloamydomonas reinhardtii chl.*)为 32%, 与嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为 58%, 其中与条斑紫菜碳酸酐酶(PyCA)的相似性最高, 蛋白序列相似性达到 96%。

β 型的 CA 有一段高度保守的序列, Cys-AA_n-His-AA₂-Cys 构成锌原子的协调位点^[3]。多序列比对结果(图 2)显示, PhCA 与其他物种的 β 型 CA 在这些位点处完全一致, 并且在锌原子协调位点周围的氨基酸序列也比较保守, 说明了它们在结构上或是催化反应中具有重要作用^[17-18]。

2.2 系统进化分析

对碳酸酐酶进行进化分析, 同时选取了单子叶植物、双子叶植物、藻类以及微生物中的 19 个序列, 构建的系统进化树如图 3 所示。结果显示, 坛紫菜的碳酸酐酶与条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)聚为一支, 同时与三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)、紫球藻(*Porphyridium purpureum*)、海洋绿滑菌(*Chloroherpeton thalassium*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)聚为一个较大的分支。本实验构建的系统进化树与 Smith 等^[19]构建的以原核生物为主的系统树相似, 同时也可以证明这些 β 型的 CA 有一个古老的起源, 从一个共同的祖先即原核型的碳酸酐酶进化而来^[19-20]。

2.3 融合蛋白的表达与纯化

为了进一步验证克隆得到的 PhCA 为碳酸酐酶基因序列, 将其完整的 ORF 进行原核诱导表达。SDS-PAGE 图谱如图 4 所示。麦芽糖结合蛋白

```

1   cgcggatccacagcctactgatgatcagtcgatgggaaaacatcgaccttgatcctcacc
61  ctcttttcccaccctcccccttccctctcacaacaccccccaacttgtgcatcATGGCGTCC
1   M A S
121  CCGATGGCGTTCATGACGGCGGCGCCGCTCGTGC GCGGCGCCCGCTTCGCGTGCCCGC
4   P M A F M T A A P L V R G A A A S R A R
181  TCCGTGGGCGTGTCTTCGCGCCGCGCTCCGCTCTGCCGCGCGCGCTGCCCGCCGCTCC
24  S V G V S S R R A S A L P A R A A R R S
241  CCCGCGGCGGTGTGTCCATGGTTGGTGGCTCCCTCAATGACCTCCTTGCCAACAACCTG
44  P A A G V S M V G G S L N D L L A N N L
301  GAGTGGAGCAAGCACATGACTGCGGATGACCCAACTACTTCCAGAACTGGTTGCTATG
64  E W S K H M T A D D P N Y F Q N L V A M
361  CAGCAGCCCGACTACCTTTGGATTGGCTGCTCGGACTCCCGCGTGCCGCCAACGTCATT
84  Q Q P D Y L W I G C S D S R V P A N V I
421  GTCGGTCTGCCGCCGGTGCCGTTTTCGTGCACCGTAACATTGCCAACGTCGTCGCGCAC
104  V G L P P G A V F V H R N I A N V V A H
481  ACGGACTCAACGTCCTGTCGGTCATCGAGTACGCCGTC AAGGTCCTCAAGGTCCGTCAC
124  T D F N V L S V I E Y A V K V L K V R H
541  ATCCTGGTCGTTGGTCACGACAACCTGCGGTGGCGTCAAGGCGTCGATGGGCGACGAGCGC
144  I L V V G H D N C G G V K A S M G D E R
601  GTTGGCCCTGGTCGACAACCTGGCTGACGCACATCCGTGATGTCCGCCGCCGCCACGCGGT
164  V G L V D N W L T H I R D V R R R H A V
661  CAGCTGTCCACCATTGACGACTTTGACGCGCATGGACCGCCTCGTGCAGTCAACGTG
184  Q L S T I D D F D A R M D R L V Q L N V
721  CTGGAGCAGGTGCACAACGTGTGCTCGACGACCACCGTGCAGTCTGCTTGAACGATGGC
204  L E Q V H N V C S T T T V Q S A W N D G
781  CAGCCCCTTTCGGTCCACGGCTGGATTACCGGCTGTCGGATGGTCTCATCCGCGACCTG
224  Q P L S V H G W I Y R L S D G L I R D L
841  GGCTTCCGCGTGGACGGCCCCGAGGCATCGATTTCGGTCTACCGGACGGTCGCGCCGAGG
244  G F R V D G P E G I D S V Y R T V A P R
901  CCCCCGCGGGCAAGGGCGTCGCTGCGGAGGTCTAGgctgtgtgtctagttatggcgggg
264  P P A G K G V A A E V *
961  tgtatagcgtgtgtggegagcgatTTTgtgtggatgtggtccgtgtgggggggcgat
1021 gctctgtgttctgtggaactcAAAAacgtttctatgctactttcaaaaaaaaaaaaaaa
1081 a
    
```

图 1 坛紫菜 CA 基因 cDNA 全长的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the full-length CA cDNA from *Porphyra haitanensis*
星号代表终止密码子

The stop codon is indicated with asterisk

(Maltose Binding Protein, MBP)的分子量为 42 kDa 左右, 诱导表达的 PhCA 融合蛋白的分子量约为 72 kDa, 与预期的 30 kDa 的目标蛋白加上 MBP 的分子量大小相符。由于诱导表达的蛋白及纯化的蛋白放置时间较长, 有部分麦芽糖结合蛋白的降解。泳道 1, 2, 3 为各种对照组, 对照组在融合蛋白分子量区域并没有相应条带的出现。泳道 4 为蛋白粗提液, 泳道 5 为纯化后蛋白, 从电泳图谱中可以看出, 大部分杂蛋

白已去除, 得到的蛋白较为单一、纯净。

2.4 酶活的测定

邹定辉和高坤山^[21]在坛紫菜完整叶状体和叶状体匀浆中均检测到了碳酸酐酶活性, 表明坛紫菜存在胞内和胞外 CA 活性。本实验对表达纯化的融合蛋白酶切后进行了碳酸酐酶活性的测定, 测定结果如图 5 所示。实验结果显示对照组 pH 从 8.0 下降到 7.0

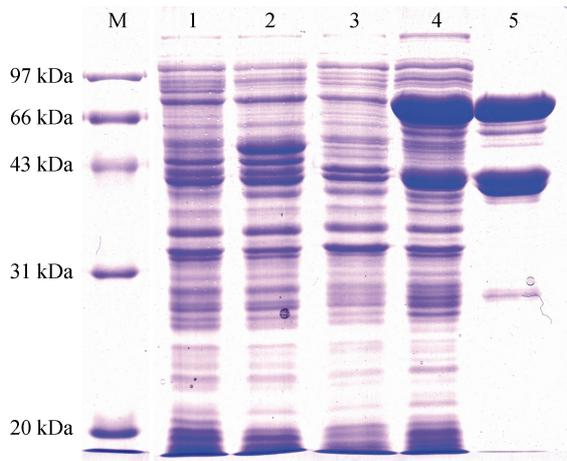


图 4 12% SDS-PAGE 检测 PhCA 的诱导表达

Fig. 4 12% SDS-PAGE assay for the induced PhCA gene expression

M: 蛋白质低分子量 Marker; 1: TB1 加 IPTG 诱导; 2: TB1 (pMAL) 加 IPTG 诱导; 3: TB1 (pMAL- PhCA)未加 IPTG 诱导; 4: TB1 (pMAL- PhCA)加 IPTG 诱导; 5: 纯化的融合蛋白

M: Protein marker; 1: TB1 cells induced by IPTG; 2: TB1 cells with plasmid pMAL induced by IPTG; 3: TB1 cells with recombinant plasmid pMAL-PhCA not induced by IPTG; 4: TB1 cells with recombinant plasmid pMAL-PhCA induced by IPTG; 5: The map of the purified protein

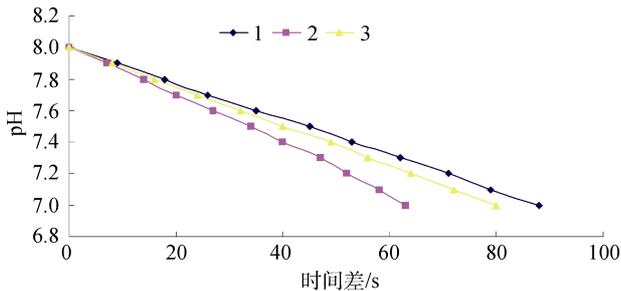


图 5 表达 PhCA 蛋白活性的测定

Fig. 5 The activity of the induced protein PhCA

1: 对照组; 2: 加蛋白样品; 3: 加蛋白样品和胞外碳酸酐酶抑制剂
1: Control group; 2: Protein added; 3: Protein and extracellular CA inhibitor added

所需要的时间最长, 其次是加蛋白样品和胞外碳酸酐酶抑制剂 AZ 的实验组, 时间最短的是加蛋白样品实验组。这表明诱导表达出的 PhCA 蛋白具有碳酸酐酶的活性, 并且胞外碳酸酐酶抑制剂 AZ 可以减弱一部分 CA 的活性。

3 讨论

在海水的碱性环境中, 溶解无机碳(dissolved inorganic carbon, DIC)主要是以 HCO_3^- 的形式存在, 海水中 CO_2 的浓度非常低。而游离的 CO_2 是藻类光

合作用的原料, 许多研究表明藻类主要通过 3 种机制提高细胞内 CO_2 含量, 分别为通过自由扩散或主动运输的方式将海水中游离的 CO_2 运入细胞^[22], 利用胞外碳酸酐酶将 HCO_3^- 解离成 CO_2 后运入细胞^[23], 以主动运输形式将 HCO_3^- 直接运往细胞, 利用内碳酸酐酶将其解离成 CO_2 ^[24]。不同的藻类对无机碳的利用途径不同, 例如紫球藻(*Porphyridium cruentum*) 的无机碳利用方式主要是主动运输细胞外游离 CO_2 , 没有发现胞外碳酸酐酶的活性^[25]; 海带雌配子体只以游离的 CO_2 为无机碳源, 不能利用 HCO_3^- ^[26]; 条斑紫菜叶状体利用无机碳的主要途径是转运胞外碳酸酐酶解离 HCO_3^- 产生的 CO_2 ^[27]。即使是同一物种, 在不同品系间或生长状态下对无机碳利用的方式也不完全相同^[28], 骆其君等^[29]的研究结果初步认为坛紫菜自由丝状体的无机碳利用以对 HCO_3^- 的主动运输为主, 而邹定辉和高坤山^[21]的实验结果表明坛紫菜叶状体利用 HCO_3^- 作为光合作用的碳源时, 其机制主要是胞外 CA 催化的 HCO_3^- 脱水作用。

坛紫菜生活史属于特殊的异型世代交替, 孢子体世代和配子体世代具有明显不同的形态和生物学特征, 两者发育和生长阶段所处环境不同, 其无机碳的利用方式及光合作用代谢机制也有不同之处。本研究采用 RACE 技术, 首次在坛紫菜中获得了 CA 基因的全长序列, 经相关生物信息学软件分析显示该基因序列长度为 1 081 bp, 含有一个完整的长度为 825 bp 的 ORF, 为 β 型的 CA, 与来自植物、藻类和细菌的碳酸酐酶均有一定的一致性。另外, 将其在原核表达系统中成功表达, 并检测出所表达的蛋白具有碳酸酐酶的活性。碳酸酐酶的成功克隆与表达对于对进一步研究其功能奠定了基础, 同时对进一步深入研究坛紫菜不同世代间的碳代谢、光合作用等生理反应有着重要作用。

参考文献:

- [1] Smith K S, Ferry J G. Prokaryotic carbonic anhydrases [J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(4): 335-366.
- [2] Tripp B C, Smith K, Ferry J G. Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme [J]. J Biol Chem, 2001, 276(52): 48615.
- [3] 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]. Mol Phylogeny Evol, 1996, 5(1): 50-77.

- [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] Giordano M, Beardall J, Raven J A. CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56: 99-131.
- [6] Aizawa K, Miyachi S. Carbonic anhydrase and CO₂ concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1986, 39(3): 215-233.
- [7] Sültemeyer D. Carbonic anhydrase in eukaryotic algae: characterization, regulation, and possible function during photosynthesis [J]. *Can J Bot*, 1998, 76(6): 962-972.
- [8] Moroney J, Bartlett S, Samuelsson G. Carbonic anhydrases in plants and algae [J]. *Plant, Cell Environ*, 2001, 24(2): 141-153.
- [9] Lane T W, Saito M A, George G N, et al. Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom [J]. *Nature*, 2005, 435: 42.
- [10] McGinn P J, Morel F M M. Expression and regulation of carbonic anhydrases in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* and in natural phytoplankton assemblages from Great Bay, New Jersey [J]. *Physiol Plant*, 2008, 133(1): 78-91.
- [11] So A K C, Espie G S, Williams E B, et al. A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (ϵ class) is a component of the carboxysome shell [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(3): 623-630.
- [12] Reith M, Munholland J. A high-resolution gene map of the chloroplast genome of the red alga *Porphyra purpurea* [J]. *The Plant Cell Online*, 1993, 5(4): 465-475.
- [13] Hamada J, Shin J, Miura A. Mapping of centromere distances of light green and light red genes in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta, Bangiales) [J]. *Jpn J Phycol*, 1994, 42: 401-406.
- [14] Liu Q Y, Baldauf S L, Reith M E. Elongation factor 1 α genes of the red alga *Porphyra purpurea* include a novel, developmentally specialized variant [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 31(1): 77-85.
- [15] Xiaolei F, Yongjun F, Songnian H, et al. Generation and analysis of 5318 expressed sequence tags from the filamentous sporophyte of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) [J]. *J Phycol*, 2007, 43(6): 1287-1294.
- [16] Haglund K, Björk M, Ramazanov Z, et al. Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic-carbon assimilation in the red alga *Gracilaria tenuistipitata* [J]. *Planta*, 1992, 187(2): 275-281.
- [17] Rowlett R S, Chance M R, Wirt M D, et al. Kinetic and structural characterization of spinach carbonic anhydrase [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 1994, 33(47): 13967-13976.
- [18] Mitsunashi S, Mizushima T, Yamashita E, et al. X-ray structure of β -carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO₂ hydration [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5521-5526.
- [19] Smith K S, Jakubzick C, Whittam TS, et al. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes [J]. *PNAS*, 1999, 96(26): 15184-15189.
- [20] Fukuzawa H, Suzuki E, Komukai Y, et al. A gene homologous to chloroplast carbonic anhydrase (*icfA*) is essential to photosynthetic carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942 [J]. *PNAS*, 1992, 89(10): 4437-4441.
- [21] 邹定辉, 高坤山. 坛紫菜光合作用对重碳酸盐的利用 [J]. *科学通报*, 2002, 47(12): 926-930.
- [22] Rotatore C, Colman B, Kuzma M. The active uptake of carbon dioxide by the marine diatoms *Phaeodactylum ticornutum* and *Cyclotella* sp. [J]. *Plant, Cell Environ*, 2006, 18(8): 913-918.
- [23] Nimer N A, Iglesias-Rodriguez M D, Merrett M J. Bicarbonate utilization by marine phytoplankton species [J]. *J Phycol*, 2008, 33(4): 625-631.
- [24] Merrett M, Nimer N, Dong L. The utilization of bicarbonate ions by the marine microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd [J]. *Plant, Cell Environ*, 2006, 19(4): 478-484.
- [25] Huertas I E, Colman B, Espie GS, et al. Active transport of CO₂ by three species of marine microalgae

- [J]. *J Phycol*, 2001, 36(2): 314-320.
- [26] 岳国峰, 戢勇骋. 海带雌配子体对无机碳的利用[J]. *海洋科学*, 2000, 24: 33-35.
- [27] 岳国峰, 周百成. 条斑紫菜对无机碳的利用[J]. *海洋与湖沼*, 2000, 31(3): 246-251.
- [28] 岳国峰, 王金霞, 朱明远, 等. 藻类无机碳营养的研究进展()——藻类利用无机碳的机理及其调节[J]. *海洋科学*, 2003, 27: 31-34.
- [29] 骆其君, 裴鲁青. 坛紫菜自由丝状体对无机碳的利用[J]. *水产学报*, 2002, 26(5): 477-480.

Gene cloning, expression and enzyme activity analysis of the carbonic anhydrase from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta)

HUAN Li^{1, 2}, JIA Zhao-jun³, ZHANG Bao-yu¹, NIU Jian-feng¹, LIN A-peng¹, HE Lin-wen¹, WANG Guang-ce¹

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. School of Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Received: Jan., 4, 2013

Key words: *Porphyra haitanensis*; carbonic anhydrase; sequence analysis; prokaryotic expression; enzyme activity

Abstract: Carbonic anhydrase (CA), a zinc-containing enzyme is widespread in living organisms, catalyses the reversible hydration of CO₂ and HCO₃⁻. In this study, a full-length cDNA of CA was isolated from *Porphyra haitanensis* with rapid amplification of cDNA ends (RACE). This sequence was 1 081 bp in length and encodes a polypeptide of 274 amino acid residues. The deduced polypeptide showed high identities with the CA genes ranging from unicellular algae and bacteria to green plant. Phylogenetic tree analysis showed that the CA gene from *P. haitanensis* was more closely assembled with algae and bacteria. A ~72 kDa fused protein was obtained by the recombinant prokaryotic expression and the enzyme activity analysis showed that it had the activity of CA.

(本文编辑: 张培新)