

研究简报

湛江二叉刺藻的碳酸酐酶及其与光合作用的关系*

赵新明 姚南瑜

(辽宁师范大学生物系, 大连)

提要 湛江二叉刺藻 (*Dicrateria zhanjiangensis*) 细胞表面的碳酸酐酶 (CA) 活性占细胞全部碳酸酐酶活性的一半以上。匀浆经高速离心后, 碳酸酐酶主要分布在上清液中, 因此酶活性较高。

NO_3^- , NO_2^- 和 I^- 三种阴离子对碳酸酐酶有抑制作用, 其中以 NO_2^- 的抑制效果为最佳, 0.5 mol/L NO_2^- 即能抑制酶活性 61.01%。乙酰唑磺胺 (AZM) 和对氨基苯磺酰胺 (SNM) 对碳酸酐酶有很强的抑制作用, 其半抑制浓度分别为 $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 和 $2.3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。这两种抑制剂在低浓度下对光合作用有明显的抑制作用。乙酰唑磺胺、碳酸酐酶和 NaHCO_3 对完整细胞悬浮的光诱导 pH 变化有不同程度的抑制作用。乙酰唑磺胺通过抑制光合作用来阻碍光诱导 pH 上升。加入碳酸酐酶和 NaHCO_3 到细胞悬浮液中则通过加快大气 CO_2 补充和加大悬浮液的缓冲能力来抑制光诱导 pH 上升。

以上实验结果表明, 湛江二叉刺藻的碳酸酐酶对维持藻细胞的正常光合作用起着非常重要的作用; 湛江二叉刺藻可能属于能够利用 HCO_3^- 作光合碳源的微藻类型。

碳酸酐酶是光合植物中普遍存在的一种酶^[1]。在高等植物中, 碳酸酐酶在 C_3 植物中的活性比在 C_4 植物中的活性要高得多^[2], 而且主要存在于细胞的叶绿体内^[10,12]。在蓝绿藻和绿藻中也发现有较高的碳酸酐酶活性, 有的碳酸酐酶只存在于细胞的内部, 也有的碳酸酐酶存在于细胞的表面, 而且发现这些微藻的碳酸酐酶活性的大小依赖于周围生活的环境如培养液 CO_2 气体的浓度^[4,7]。目前对碳酸酐酶在光合作用中所起的作用还不十分清楚, 特别是在一些微藻细胞表面存在活性较高的碳酸酐酶, 其生理意义更不清楚^[8]。许多研究表明, 位于微藻细胞表面的碳酸酐酶能催化细胞表面的 HCO_3^- , 从而使其转化为 CO_2 , 然后再以 CO_2 分子形式透过质膜进入到细胞内^[13]。Aizawa 和 Miyachi^[1] 把碳酸酐酶在微藻中的分布位置和微藻在光合作用中利用无机碳的形式联系起来, 他们发现, 利用 CO_2 作光合碳源的细胞, 碳酸酐酶只限于存在于细胞内部; 而利用 HCO_3^- 的细胞, 碳酸酐酶却存在于它的表面。目前, 大多数研究没有涉及海洋微藻。本文采用湛江二叉刺藻这种海洋微藻来研究碳酸酐酶的分布位置、特性和它在光合作用中可能的生理意义。

* 乙酰唑磺胺 (Sigma Chem. Co.) 由 Shigetoh Miyachi 教授 (东京大学) 提供, 特表谢意。

收稿日期: 1988年5月6日。

一、材料和方法

1. 微藻的培养

湛江二叉刺藻 (*Dicrateria zhanjiangensis*) 系从山东海洋学院购得, 镜检无污染混杂, 用 F/2 培养液于 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 温度下培养, 光照条件为窗下自然漫射光, 一般晴天中午光强为 $42 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 早晨或傍晚为 $14 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。培养 5—7d 后收获。

2. 碳酸酐酶的提取和测定

细胞悬浮液经 1500r/min 离心 10min, 收集沉淀, 取出其中一小部分完整细胞, 其余部分加 Tris- H_2SO_4 缓冲液 (0.1mol/L , $\text{pH} = 8.3$), 在低温下制备匀浆, 取出部分匀浆, 余下的匀浆以 $14\ 650 \times g$ 在低温条件下离心 25min, 以电极性^[4]分别测定完整细胞、匀浆、上清液和沉淀各部分中的碳酸酐酶活性。

3. 光合作用的测定

藻细胞经离心收集后, 悬浮于新鲜培养液中, 以氧电极法, 于 25°C 温度、光强 $42 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下测定。如果在反应液中加入抑制剂, 则需平衡 2min 后开始测定。

4. 抑制剂的抑制作用和光诱导 pH 变化的测定

将 NaNO_3 , NaNO_2 , NaI , 乙酰唑磺胺和对氨基苯磺酰胺溶于 0.05mol/L 的 NaOH 溶液中, 平衡 2min 后再测定酶活性和光合作用; 在测定光诱导 pH 变化时, 光强为 $42 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、温度为 25°C , NaHCO_3 和碳酸酐酶加入后平衡 2min 开始测定。以 0.7mol/L 山梨醇溶液作反应介质。

5. 叶绿素含量的测定

取离心收集的完整藻细胞 $0.1\text{—}0.3\text{ml}$, 在 -5°C 下冻融两次以破碎藻体, 加入蒸馏水至 2ml, 再加入丙酮至 10ml, 轻轻摇动后, 在暗中放置 5min, 离心后立即测定 O.D._{652} (在 652nm 光下的光密度)。空白对照用 80% 的丙酮溶液。叶绿素含量按 $\text{chl}(\text{mg/L}) = \text{O.D.}_{652} \times 1\ 000/34.5$ 求出。

二、结 果

1. 细胞内碳酸酐酶的分布

采用分级分离法^[9], 将细胞分成完整细胞、匀浆、上清液和沉淀四个部分。由表 1 看到, 完整细胞的碳酸酐酶活性较高, 占总酶活性(匀浆部分)的一半以上; 上清液部分的酶活性比完整细胞部分的酶活性高, 且大大高于沉淀部分。

2. 抑制剂对碳酸酐酶的抑制效果

许多阴离子可与碳酸酐酶中的金属离子 Zn^{2+} 结合, CO_2 虽仍可以结合在酶的活性部位但不能被水化, 这样酶就失去活性。三种无机阴离子在 0.5mol/L 时对碳酸酐酶的抑制作用以 NO_2^- 为最突出, NO_3^- 和 I^- 的抑制效果大致相同(见表 2)。乙酰唑磺胺和对氨基苯磺酰胺是两种专一性很强的抑制剂, 对湛江二叉刺藻碳酸酐酶的抑制作用见图 1, 其半抑制浓度 (I_{50}) 分别为 $1.5 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ 和 $2.3 \times 10^{-5}\text{mol/L}$, 两种抑制剂的半抑制浓度相差不大。

3. 乙酰唑磺胺和对氨基苯磺酰胺对光合作用的影响以及乙酰唑磺胺、 NaHCO_3 和

碳酸酐酶对光诱导 pH 变化的影响

当乙酰唑磺胺和对氨基苯磺酰胺浓度在半抑浓度数量级时，对光合作用有较明显的

表 1 碳酸酐酶的分布

Tab. 1 Distribution of carbonic anhydrase

部 分	碳酸酐酶活性 (单位/mg)
完整细胞	110.56
匀 浆	207.91
上 清 液	145.95
沉 淀	67.41

表 2 阴离子对碳酸酐酶的抑制作用

Tab. 2 Inhibition of carbonic anhydrase by anions

阴 离 子	碳酸酐酶活性 (单位/mg)	抑制百分率 (%)
对 照	72.73	0
NO ₂ ⁻	28.36	61.01
NO ₃ ⁻	44.91	38.25
I ⁻	44.36	39.01

阴离子浓度均为 0.5m mol/L。

表 3 抑制剂对光合作用的影响

Tab. 3 Effect of inhibitors on photosynthesis

抑 制 剂	浓 度 (mol/L)	光合速率 [$\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$]	抑制百分率 (%)
对 照		84.58	0
乙酰唑磺胺	4.5×10^{-3}	58.07	31.34
对氨基苯磺酰胺	5.8×10^{-3}	54.58	35.46

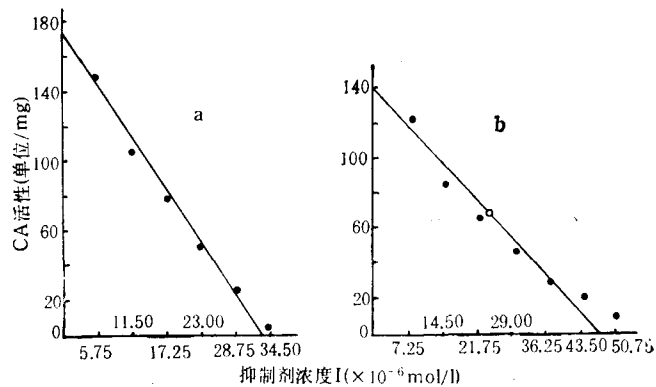


图 1 乙酰唑磺胺和对氨基苯磺酰胺对碳酸酐酶 (CA) 的抑制作用

Fig. 1 Effect of acetazolamide and sulfanilamide on carbonic anhydrase

a. $I_{50} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; b. $I_{50} = 2.3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.

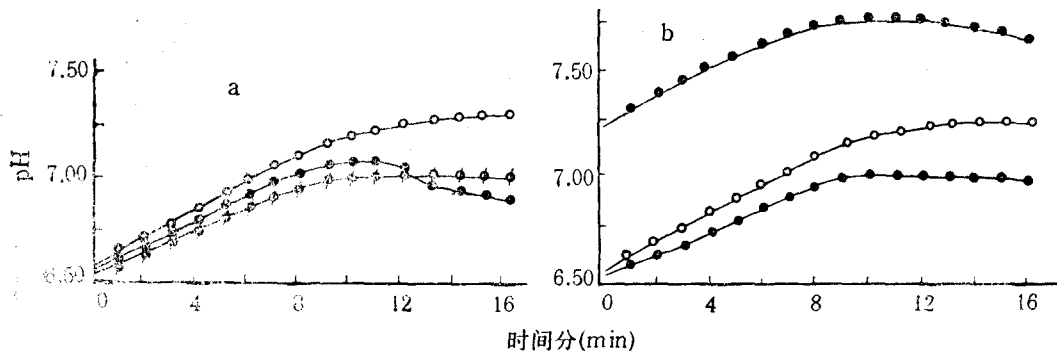


图2 乙酰唑磺胺 (AZM)、碳酸酐酶 (CA) 和 NaHCO_3 对光诱导 pH 变化的影响

Fig. 2 Effect of acetazolamide (AZM), carbonic anhydrase and bicarbonate on light-induced pH changes

a. $\circ-\circ-\circ$ 对照 (b 同), $\bullet-\bullet-\bullet$ CA, $\square-\square-\square$ AZM; b. $\bullet-\bullet-\bullet$ NaHCO_3 , 0.5 mmol/L. 细胞悬浮在 0.7 mol/L 山梨醇溶液中。

抑制效果,两者的抑制效果较为接近 (见表3)。乙酰唑磺胺能较大地抑制光诱导 pH 上升 (图 2a)。加入碳酸酐酶, pH 上升的速率大于加入乙酰唑磺胺时的 pH 上升速率 (图 2a), 但小于对照。在暗中 (照光 8min 后, 停止照光 8min) pH 恢复较快。

加入 0.5 mmol/L NaHCO_3 , 光诱导 pH 上升受抑制 (图 2b), 这与乙酰唑磺胺所起效果一样, 而且在不同起始 pH 条件下, NaHCO_3 的这种阻碍作用几乎相同。

三、讨论与结论

1. 根据 Aizawa 和 Miyachi^[1] 的研究, 在细胞表面存在碳酸酐酶的微藻能吸收 HCO_3^- , 即通过细胞表面的碳酸酐酶将 HCO_3^- 转化为 CO_2 , CO_2 再透过质膜被细胞利用。湛江二叉刺藻细胞表面碳酸酐酶活性较高, 说明它可能属于吸收 HCO_3^- 的光合无机碳的微藻类型。

2. 阴离子对湛江二叉刺藻碳酸酐酶的抑制效果与它对高等植物碳酸酐酶的抑制效果相比, 前者表现小。这可能是因为生活在海洋环境中的湛江二叉刺藻, 其细胞表面存在较多的碳酸酐酶, 致使许多阴离子特别是海水中含量较多的阴离子的抑制作用变小。乙酰唑磺胺和对氨基苯磺酰胺对湛江二叉刺藻碳酸酐酶的抑制效果比较接近, 这与几种淡水微藻的情况不同^[2,15]。在淡水微藻中, 乙酰唑磺胺对碳酸酐酶的抑制效果比对氨基苯磺酰胺高出几百倍。目前还没有看到对氨基苯磺酰胺对高等植物碳酸酐酶有抑制的报道, 但已有的结果表明, 这种抑制剂对石莼 (*Ulva pertusa*) 的碳酸酐酶有较大抑制作用^[6]。尽管如此, 现在还不能说这种抑制剂对所有海洋植物的碳酸酐酶均具有较大的抑制作用。

3. 本文实验结果表明, 乙酰唑磺胺和对氨基苯磺酰胺对湛江二叉刺藻完整细胞悬浮液的光合作用有明显的抑制作用。据报道, 乙酰唑磺胺不能透过细胞质膜^[9], 那么它对光合作用的抑制作用是通过抑制细胞表面碳酸酐酶的结果所致。由此可见, 细胞表面的碳酸酐酶在光合作用中起很重要的作用。

乙酰唑磺胺对光合作用的影响还可以从它抑制光诱导 pH 变化这一现象中得到更进一步的证实。Graham 和 Reed^[5,11] 的实验证明, 缺乏碳酸酐酶的藻细胞其悬浮液光诱导 pH 变化小, 并解释为悬浮液中 CO₂ 进入到细胞内的速率低。所以乙酰唑磺胺通过抑制细胞表面的碳酸酐酶来抑制光合作用, 表现出光诱导 pH 上升受阻。

4. 加入外源的碳酸酐酶没有表现出光诱导 pH 上升, 可能是因为它加快了大气中 CO₂ 补充到悬浮液的交换过程, 这从悬浮液在暗中 pH 恢复快的这一现象可以得到证实。另一方面也说明, 它没有附在细胞表面上起细胞表面碳酸酐酶的那种作用, 因此它不能加速细胞表面的 HCO₃⁻ 转化为 CO₂ 的反应。由此可以假定, 只在细胞内存在碳酸酐酶的微藻, 加入外源的碳酸酐酶不可能把它从吸收 CO₂ 的类型转化为吸收 HCO₃⁻ 的类型。

此外, 加入 NaHCO₃ (0.5 mol/L) 对光诱导 pH 上升也有阻碍作用, 这并不是因为它抑制了光合作用(实验加入 0.5 mol/L HCO₃⁻ 能促进光合作用, 数据未列), 而是因为加大了悬浮液供给 CO₂ 的能力, 这与加入外源碳酸酐酶的情况相似。

以上实验结果表明, 湛江二叉刺藻细胞表面的碳酸酐酶在光合作用中起着极其重要的作用。湛江二叉刺藻可能属于吸收 HCO₃⁻ 的光合无机碳的微藻类型。

参 考 文 献

- [1] Aizawa, K., S. Miyachi, 1984. Carbonic anhydrase located on the cell surface increase the affinity for inorganic carbon in photosynthesis of *Dunaliella tertiolecta*. *FEBS Lett.* **173**: 41—44.
- [2] Bundy, H. F., S. Cote, 1980. Purification and properties of carbonic anhydrase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* **19**: 2 531—2 534.
- [3] Everson, R. G., V. R. Slack, 1968. Distribution of carbonic anhydrase in relation to the C₄ pathway of photosynthesis. *Phytochemistry* **7**: 581—584.
- [4] Findenegg, G. R., 1974. Relation between carbonic anhydrase activity and uptake of HCO₃⁻ and Cl⁻ in photosynthesis by *Scenedesmus obliquus*. *Planta* **116**:123—132.
- [5] Graham, D., C. A. Atkins, M. L. Reed, B. D. Patterson, R. M. Smillie, 1971. Carbonic anhydrase, photosynthesis, and light-induced pH changes. In photosynthesis and photorespiration, ed by M. D. Hatch, C. B. Osmond, R. O. Slayter. Wiley-Interscience, New York, pp. 267—274.
- [6] Ikemori, M., K. Nishida, 1968. Carbonic anhydrase in marine algae *Ulva pertusa*. *Physiol. Plant* **21**: 292—297.
- [7] Ingle, P. K., B. Coleman, 1975. Carbonic anhydrase levels in blue-green algae. *Can. J. Bot.* **53**: 2 385—2 387.
- [8] Jacobson, B. S., F. Fong, R. L. Heath, 1975. Carbonic anhydrase of spinach. *Plant Physiol.* **55**: 468—474.
- [9] Miyachi, S., M. Tsuzuki, S. T. Avramova, 1983. Utilization modes of inorganic carbon for photosynthesis in various species of *Chrella*. *Plant and Cell Physiol.* **24**: 441—451.
- [10] Poincelot, R. P., 1972. Intracellular distribution of carbonic anhydrase and photosynthesis in leaves of spinach. *Plant Physiol.* **52**: 229—232.
- [11] Reed, M. L., D. Graham, 1981. Carbonic anhydrase in plants: Distribution, properties and possible physiological roles. In progress in phytochemistry. Vol. 7, ed by L. Reinhold, J. B. Harborne, T. Swain. Pergamon Press, Oxford, pp. 47—94.
- [12] Troilo, L., D. Bagnare, L. Anselmi, C. Bassanelli, 1974. Carbonic anhydrase activity and localization in some plant species. *Physiol. Plant* **31**: 86—89.
- [13] Tsuzuki, M., 1983. Mode of HCO₃⁻ utilization by the cells of *Chlamydomonas reinhardtii* grown under ordinary air. *Z. Pflanzen Physiol.* **110**: 29—37.
- [14] Wilbur, K. M., N. G. Anderson, 1948. *J. Biol. Chem.* **176**: 147.
- [15] Yagawa, Y., Y. Shiraiwa, S. Miyachi, 1984. Carbonic anhydrase from the blue-green algae *Anabaena variabilis* *Plant and Cell Physiol.* **25**: 775—783.

CARBONIC ANHYDRASE OF *DICRATERIA ZHANJIANGENSIS* AND ITS RELATION WITH PHOTOSYNTHESIS

Zhao Xinming and Yao Nanyu

(*Liaoning Normal University, Dalian*)

ABSTRACT

Carbonic anhydrase (CA) exhibited more than half of all catalytic activity on the cell surface of *Dicrateria zhanjiangensis*. The crude homogenate was centrifuged. The majority of the activity was found in the supernatant rather than precipitate.

Among the three anions— NO_2^- , NO_3^- and I^- , NO_2^- was the most effective inhibitor which inhibited 61.01% of the CA activity at 0.5m mol/L. The concentration of acetazolamide (AZM) and sulfanilamide (SNM) required for 50% inhibition were 1.5×10^{-5} mol/L and 2.3×10^{-5} mol/L respectively. Correspondingly, both of them partially inhibited the photosynthesis of cell suspension under low concentration.

AZM, CA and NaHCO_3 inhibited the light-induced pH changes of the medium to different extent. By limiting the photosynthesis of the cells, AZM reduced the rate of the light-induced pH change evidently. CA inhibited the rise of pH by enhancing the supplementary rate of dissolving CO_2 into the medium, while the addition of NaHCO_3 increased directly the buffer capacity of the medium.

These results indicated that CA of the cell surface is very important to maintain the normal photosynthesis, and the species may belong to the type which could utilize HCO_3^- for photosynthesis.