

# 藓羽藻 (*Bryopsis hypnoides*) 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的分离与活性测定\*

田超 张炎 王广策<sup>†1)</sup> 曾呈奎<sup>†</sup>

(中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071;  
中国科学院研究生院 北京 100039)

<sup>†</sup>(中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071)

**摘要** 采用硫酸铵分部沉淀与凝胶过滤的方法,进行藓羽藻 Rubisco 的分离研究。结果表明,分离的藓羽藻 Rubisco 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测呈两条清晰条带,分别为 Rubisco 大亚基与小亚基;与菠菜相比,藓羽藻 Rubisco 大亚基分子量与菠菜基本相同,而小亚基较之稍大一些。藓羽藻 Rubisco 活力测定结果表明,Rubisco 分离过程中用硫酸铵分部沉淀后活力降低许多,分离后活力有所上升,但仍比粗提液活力弱;在 Rubisco 活力测定过程中,藓羽藻 Rubisco 的活化温度与其它物种 Rubisco 活化的温度不同,在低温下活化效果较好。这些结果说明 Rubisco 的酶活力受硫酸铵的影响而且藓羽藻 Rubisco 相对陆地高等植物结构不稳定。

**关键词** Rubisco, 酶活力, 藓羽藻, 分离, 酶活力测定

**中图分类号** Q93

核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (EC 4.1.1.39, 简称 Rubisco) 是光合碳同化中的关键酶,在卡尔文循环中催化 CO<sub>2</sub> 与 1,5-二磷酸核酮糖 (RuBP) 反应生成两分子的 3-磷酸甘油酸,起到固定 CO<sub>2</sub> 的作用 (沈同等, 1991)。陆地高等植物和海洋绿藻等的 Rubisco 一般由 8 个大亚基与 8 个小亚基组成,大亚基由叶绿体基因组编码,而小亚基由核基因组编码。Rubisco 在自然界中含量非常丰富,在 C<sub>3</sub> 植物中约占细胞可溶性蛋白的 50% 以上 (王维光, 1985; 李立人, 1999)。

在陆地高等植物中,许多物种如菠菜、西红柿、烟草、大豆等 Rubisco 的研究开展得较早,而且研究方法已相当成熟 (McCurry *et al.*, 1982; Paech *et al.*, 1986)。海洋植物中藻胆蛋白、磷酸甘油酸变位酶等的生理和分子生物学研究也已开展得较多 (王广策等, 2001, 2002)。海洋植物对 Rubisco 的研究主要借鉴陆地高等植物的研究方法

与思,但海洋植物也有其特殊性,比如海带含糖较多、破碎细胞较难 (Gerard *et al.*, 1996),因此在 Rubisco 的制备上与陆地高等植物有所不同。

海洋绿藻在海洋中分布较广,生物量丰富,在分类上接近陆地高等植物 (福迪, 1980),以往研究主要集中在石莼等物种 (Bischof *et al.*, 2002; Beer *et al.*, 1991)。藓羽藻 (*Bryopsis hypnoides*) 是一种多核单细胞绿藻,目前对编码 Rubisco 大亚基的基因已有一些报道 (Kono *et al.*, 1991),但对其生理研究开展较少。本实验中对藓羽藻的 Rubisco 进行了一些生理生化研究,以期为进一步开展海洋碳同化研究积累资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

藓羽藻 (*Bryopsis hypnoides*) 于 2002 年 11 月至 12 月采自青岛汇泉角潮间带,菠菜购自青岛农贸市场。

\* 国家自然科学基金资助项目, B34022401 号; 中国科学院知识创新重要方向性项目, KZCX2-211 号; 中国科学院海洋研究所前沿方向性项目资助, 2002—2004。田超, 硕士研究生, E-mail: tianchao@ms.qdio.ac.cn

1) 通讯作者, 王广策, 博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: gcwang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2003-10-29, 收修改稿日期: 2003-12-29

## 1.2 方法

**1.2.1 Rubisco 的分离纯化** 实验操作均在 0—4℃ 间进行。取新鲜采集的藓羽藻用海水冲洗干净,晾干。剪碎藓羽藻藻体,挤出其原生质体,溶于适量冰预冷的提取缓冲液(50mmol/L HEPES, pH 8.0, 1mmol/L EDTA, 20mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 10mmol/L β-mercaptoethanol)中,4 层纱布过滤,滤液在 800g、4℃ 条件下离心 10min,去掉上清,沉淀用提取缓冲液洗 1 次,然后在 30W 条件下超声破碎叶绿体 2min。破碎液 15000g、4℃ 离心 30min,去掉沉淀后得到粗提液。粗提液用 35%—50% 饱和硫酸铵分部沉淀。分部沉淀后的沉淀溶解在少量的提取缓冲液中,然后过预先用提取缓冲液平衡的 Sephadex G-200 柱并在 280nm 下检测,每 3ml 收集一管,收集第 1 峰样品。

将菠菜叶片洗净剪成碎片,加入适量预冷的提取缓冲液(100mmol/L Tris, pH7.6, 2mmol/L EDTA, 10mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 10mmol/L β-mercaptoethanol)并用组织捣碎机捣碎匀浆。匀浆液用 4 层纱布过滤,然后在 15000g、4℃ 条件下离心 30min,去掉沉淀得到粗提液。其他步骤同藓羽藻 Rubisco 分离方法。

**1.2.2 Rubisco 的活性测定** Rubisco 活性的测定仪器为岛津 UV-240 分光光度计。Rubisco 活性测定方法参考王维光(1985)并加以改进。反应总体积为 1ml,反应混合液含 100mmol/L Tris (pH 8.0)、10mmol/L MgCl<sub>2</sub>、5mmol/L ATP、5mmol/L DTT、0.2mmol/L NADH、10mmol/L NaHCO<sub>3</sub>、0.1mmol/L EDTA、5 单位 G<sub>3</sub>PDH/PGK、0.3mmol/L RuBP。Rubisco 活化后在室温下测定其活性。反应液在加入 RuBP 前先测定 340nm 处 NADH 自然氧化值,然后加入 RuBP 继续测定 340nm 处 NADH 变化值。

**1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳** SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳参照文献(萨姆布鲁克等, 1996),采用 12% 分离胶和 5% 浓缩胶检测分离的 Rubisco;染色采用银染方法(郭尧君, 1999)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 藓羽藻与菠菜 Rubisco 分离纯化的比较

硫酸铵分部沉淀与凝胶过滤相结合分别分离藓羽藻与菠菜 Rubisco,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,藓羽藻样品从 Sephadex G-200 层析柱收

集的洗脱液中,第 1 峰前一小部分除了藓羽藻 Rubisco 大亚基与小亚基外还有少量杂带,后部分则基本为藓羽藻 Rubisco。菠菜 Rubisco 经检测并没有得到很好的纯化,所收集的洗脱液中除了 Rubisco,还有一些杂蛋白。藓羽藻 Rubisco 大亚基分子量与菠菜的基本相同,而小亚基则比菠菜的稍大(图 1)。

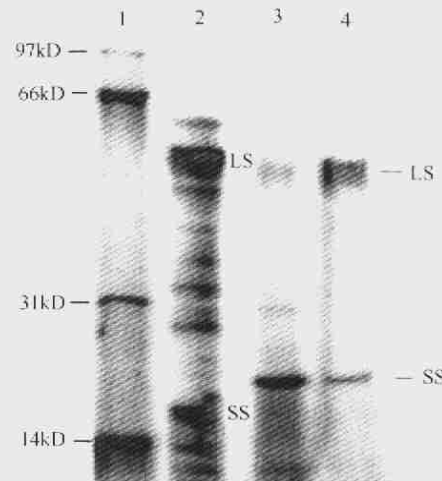


图 1 藓羽藻与菠菜 Rubisco 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of isolated Rubisco from *B. hypnoides* and spinach

第 1 道为蛋白分子量标准;第 2 道为菠菜经 Sephadex G-200 凝胶过滤洗脱液;第 3、4 道为藓羽藻经 Sephadex G-200 凝胶过滤后第一峰出来收集到的样品

Rubisco 的分离纯化方法有多种,其中最常用的是硫酸铵分部沉淀与凝胶过滤结合(McCurry *et al.*, 1982),其它方法包括结晶法(李立人, 1999)、阴离子交换柱(Uemura *et al.*, 1996)、蔗糖超速离心(Paech *et al.*, 1986)等。本文中采用的是常用的 Rubisco 分离纯化方法。结果表明,常用的分离纯化方法可以得到较纯的藓羽藻 Rubisco,而要得到较纯的菠菜 Rubisco 则需要进一步纯化,例如经过 DEAE-52 柱或其它方法进一步纯化(McCurry *et al.*, 1982; Uemura *et al.*, 1996)。为了比较藓羽藻与菠菜 Rubisco 生化特性的不同,使菠菜的分离方法与藓羽藻的分离方法保持一致,本文中并没有将菠菜 Rubisco 进一步纯化。在破碎粗提过程中,一般在破碎缓冲液中均加入 PVP 或 PVPP 去除多酚与多糖,甚至一些蛋白酶抑制剂抑制蛋白酶(Gerard *et al.*, 1996; Uemura *et al.*, 1996),这些都是根据不同物种的特性而定。藓羽藻属海洋绿藻,多酚与多糖较少,故没必要加入 PVP 或 PVPP。至于

藓羽藻 Rubisco 相对菠菜较易纯化, 可能是因为藓羽藻 Rubisco 是直接从其叶绿体中提取, 去除了原生质体中的大量杂蛋白, 因而较易纯化。

另外, 电泳显示藓羽藻 Rubisco 小亚基较菠菜 Rubisco 小亚基稍大, 可能是因为藓羽藻较陆地高等植物低等, 其 RNA 拼接剪切机制没有陆地高等植物完善, 一些内含子并没有去除, 从而使其小亚基偏大。

## 2.2 藓羽藻与菠菜 Rubisco 分离纯化过程中活性比较

分别测定粗提液、硫酸铵分部沉淀后以及 Sephadex G-200 凝胶过滤后洗脱液的 Rubisco 活性, 发现藓羽藻粗提液的 Rubisco 活性比后面分离纯化后的 Rubisco 活性高, 而菠菜粗提液则相反, 藓羽藻与菠菜粗提液经硫酸铵分步沉淀后 Rubisco 活性均暂时较低。菠菜 Rubisco 活力总体上较藓羽藻的高(表 1)。

表 1 藓羽藻与菠菜分离纯化过程中 Rubisco 活力测定  
[ $\mu\text{mol CO}_2/(\text{min} \cdot \text{A}_{280})$ ]

Tab.1 Determination of Rubisco activity from *B. hypnoides* and spinach during the isolation [ $\mu\text{mol CO}_2/(\text{min} \cdot \text{A}_{280})$ ]

纯化步骤	藓羽藻	菠菜
粗提液	0.0437	0.1373
硫酸铵分部沉淀	0.0057	0.0076
Sephadex G-200 凝胶分离	0.0274	0.2525

许多陆地高等植物 Rubisco 的活性一般都是随着纯度的升高其活力会越来越高, 本文中菠菜纯化过程中的 Rubisco 活力测定验证了这一点, 但是在硫酸铵分部沉淀这一步酶活力显著减少, 应该与硫酸铵对酶活性的影响有关, 去除了硫酸铵, 其酶活力又得到恢复, 同时随着酶越来越纯, 活力也越高。藓羽藻 Rubisco 在分离纯化过程中酶活力的变化趋势则与陆地高等植物有些不同, 硫酸铵对藓羽藻 Rubisco 的影响与菠菜的相同, 但是随着酶的纯化, 其活力却有所下降, 有时更是测不出活性, 表明藓羽藻的 Rubisco 稳定性不高, 在体外环境下酶活力迅速下降。作者曾测定过亚历山大藻 (*Alexandrium sp.*) 等其它低等藻类的 Rubisco 活性, 但粗提液 Rubisco 活性要么测定不出来, 要么活性非常低, 这可能与实验条件有关, 但更可能是与酶的稳定性有关。有报道说两种甲藻 (*Symbiodinium sp.* and *Amphidinium carterae*) Rubisco 活力在

体外迅速下降 (Whitney *et al.*, 1995)。另外, 本文中参考的 Rubisco 活性测定方法主要是测定陆地高等植物 Rubisco 的方法, 可能不太适合海洋藻类, 因为海藻细胞有可能直接利用海水中的  $\text{HCO}_3^-$  作为碳源 (Badger *et al.*, 1994)。作者主要是为了获得藓羽藻与陆地高等植物菠菜 Rubisco 活性的比较结果, 所以参考陆地高等植物的 Rubisco 活性测定方法。

## 2.3 藓羽藻 Rubisco 的活化温度

一般在测定 Rubisco 活性时, 为充分活化, 在反应前需要与  $\text{NaHCO}_3$  及  $\text{MgCl}_2$  进行预保温, 使酶达到最大活性 (李立人, 1999)。在藓羽藻 Rubisco 活力的测定过程中, 测定了活化温度对藓羽藻 Rubisco 活力测定的影响。结果显示, 在 0—10℃ 的低温条件下藓羽藻 Rubisco 活性相对较高; 随着温度升高, 藓羽藻 Rubisco 活性下降(表 2)。

表 2 不同温度对藓羽藻粗提液 Rubisco 活力的影响  
[ $\mu\text{mol CO}_2/(\text{min} \cdot \text{A}_{280})$ ]

Tab.2 Effects of temperature on the activity of Rubisco in crude extract from *B. hypnoides* [ $\mu\text{mol CO}_2/(\text{min} \cdot \text{A}_{280})$ ]

温度(℃)	0	10	20	30
酶活力	0.0437	0.0670	0.0379	0.0262

陆地高等植物中菠菜的 Rubisco 活化温度是 30℃, 大豆是 25℃ (Paech *et al.*, 1986)。海洋藻类 Rubisco 活化温度与陆地高等植物则不同, 石莼在测定酶活前先冰浴半小时 (Bischof *et al.*, 2002), 海带在测定反应进行前需冰浴 1h (Gerard *et al.*, 1996), 甲藻 *Symbiodinium sp.* 和 *A. carterae* 粗提液在 Rubisco 活性测定之前一直在冰浴条件下, 有时甚至活性测定也是在冰浴条件下进行, 温度的升高会使其 Rubisco 活性下降极快 (Whitney *et al.*, 1995)。由此可见海洋藻类的 Rubisco 活化温度与陆地高等植物相比有其特殊性。陆地高等植物 Rubisco 在一定温度下通过氨基甲酰化作用先与  $\text{CO}_2$  结合, 然后与  $\text{Mg}^{2+}$  结合形成酶- $\text{CO}_2$ - $\text{Mg}^{2+}$  三元复合物, 从而使酶反应达到最大速度 (李立人, 1999)。海洋藻类 Rubisco 之所以不能像陆地高等植物 Rubisco 一样在较高的温度下进行活化, 可能是因为海洋藻类 Rubisco 稳定性不高, 温度升高会使酶活力迅速下降, 因而需要一直控制在低温条件下。

## 参 考 文 献

- 王广策, 曾呈奎, 2001. 紫球藻两种藻红蛋白特性的比较研究—— $\gamma$ 亚基在稳定藻红蛋白结构方面的作用. 海洋与湖沼, 32(6): 653—657
- 王广策, 孙海宝, 曾呈奎, 2002. 三角褐指藻磷酸甘油酸变位酶基因可能侧翼序列的筛选、克隆以及序列的测定. 海洋与湖沼, 33(3): 259—264
- 王维光, 1985. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 125—128
- 李立人, 1999. 植物生理与分子生物学(第二版). 北京: 科学出版社, 223—236
- 沈同, 王镜岩主编, 1991. 生物化学(第二版)下册. 北京: 高等教育出版社, 142—147
- 郭尧君编著, 1999. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 141—143
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 1996. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 880—885
- 福迪 B 著, 罗迪安译, 1980. 藻类学. 上海: 上海科学技术出版社, 3—4: 206
- Badger M R, Price G D, 1994. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 45: 369—392
- Beer S, Sand-Jensen K, Vindbaek Madsen T *et al*, 1991. The carboxylase activity of Rubisco and the photosynthetic performance in aquatic plants. Oecologia, 87: 429—434
- Bischof K, Krabs G, Wiencke C *et al*, 2002. Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. Planta, 215: 502—509
- Gerard V A, Driscoll T, 1996. A spectrophotometric assay for Rubisco activity: application to the kelp *Laminaria saccharina* and implications for radiometric assay. J Phycol, 32: 880—884
- Kono M, Satoh H, Okabe Y, 1991. Nucleotide sequence of the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase from the green alga *Bryopsis maxima*. Plant Mol Biol, 17(3): 505—508
- McCurry S D, Gee R, Tolbert N E, 1982. Ribulose-1, 5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase From Spinach, Tomato, or Tobacco Leaves. Methods In Enzymology. Academic Press, Vol.90, 515—521
- Paech C, Dybing C D, 1986. Purification and degradation of Ribulose Bisphosphate Carboxylase from soybean leaves. Plant Physiol, 81: 97—102
- Uemura K, Suzuki Y, Shikanai T *et al*, 1996. A rapid and sensitive method for determination of relative specificity of Rubisco from various species by anion-exchange chromatography. Plant Cell Physiol, 37(3): 325—331
- Whitney S M, Yellowlees D, 1995. Preliminary investigations into the structure and activity of Ribulose bisphosphate carboxylase from two photosynthetic dinoflagellates. J Phycol, 31: 138—146

## ISOLATION AND ACTIVITY ASSAY OF RIBULOSE-1, 5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE FROM MARINE ALGA *BRYOPSIS HYPNOIDES*

TIAN Chao, ZHANG Yan, WANG Guang-Ce<sup>†</sup>, ZENG Cheng-Kui (C. K. Tseng)<sup>†</sup>  
(Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences,  
Qingdao, 266071; Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

<sup>†</sup>(Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) plays an important role in photosynthetic carbon fixation by controlling the initial stage of the Calvin cycle and possessing the functions of both CO<sub>2</sub> fixation and ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) oxygenation. Rubisco is commonly composed of eight large and eight small subunits. The large subunit is encoded by chloroplast genome and the small subunit by nuclear genome. Rubisco is the most abundant enzyme in nature and comprises up to 50% of the soluble protein in the leaf of C<sub>3</sub> plants. Rubisco from high plants has been studied in many plant species and the isolation method on alga is similar to that of high plants. Regarding marine alga, many studies have previously been undertaken on *Ulva* and Kelp etc. In this paper some physiological characteristics of *Bryopsis hypnoides*, a multi-nuclear unicellular green marine alga are discussed.

Activity of Rubisco isolated from *B. hypnoides* was measured at different stages of the isolation. The isolation method was similar to higher plants but for the preparation of crude extract. Chloroplasts of *B. hypnoides* were extracted in 50mmol/L HEPES-KOH buffer (pH 8.0) containing 1mmol/L EDTA, 20mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 10mmol/L β-mercaptoethanol and disintegrated by sonication, then centrifuged and the precipitate was discarded. The supernatant was fractionated with ammonium sulfate. The precipitate between 35% and 50% saturation was collected and loaded onto a Sephadex G-200 column equilibrated with extract buffer. The first peak monitored at 280nm absorbance comprising mostly of Rubisco was collected. SDS-PAGE showed that enzymes from spinach eluted from the gel column were not purified but those from *B. hypnoides* purified. The molecular weight of the large subunit of Rubisco from *B. hypnoides* was the same as that from spinach, while the small subunit of Rubisco from *B. hypnoides* was larger. Enzyme activity was also measured using the spectrophotometric assay at three steps (crude extract, fractionated with ammonium sulfate and eluted from the gel column) during the period of isolation. Rubisco was activated at different temperatures before the determination and the assay mixture contained 100mmol/L Tris (pH 8.0), 10mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5mmol/L ATP, 5mmol/L DTT, 0.2mmol/L NADH, 10mmol/L NaHCO<sub>3</sub> and 0.1mmol/L EDTA. After, that 5 units of C<sub>3</sub>PDH/PGK were added to the mixture and absorbance at 340nm (A<sub>340</sub>) was recorded every 20 seconds for 3 minutes to get a native rate of NADH oxidation, then the reaction was initiated by adding RuBP to a final concentration of 0.3mmol/L and the determination was continued with A<sub>340</sub> being recorded for 3 minutes. Rubisco activity was calculated according to the formula and the native rate of NADH oxidation should be considered. Compared with spinach, results of the assay indicated that the activity of Rubisco from *B. hypnoides* was weak and exhibited obvious decline during the period of isolation. It was also found that enzyme activity value in crude extract from *B. hypnoides* varied according to different pre-incubated temperatures before the enzyme assay. All results showed that activity of Rubisco was affected by ammonium sulfate and that Rubisco from *B. hypnoides* was less stable than that from higher plants.

**Key words** Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), Enzyme activity, *Bryopsis hypnoides*, Isolation, Enzyme activity assay