



海带配子体β-碳酸酐酶的基因克隆与亚细胞定位

郝慧敏¹, 周志刚^{2*}

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. 上海海洋大学科技部海洋生物科学国际研究中心, 上海 201306

摘要

碳酸酐酶 (Carbonic anhydrase, CA), 作为一种含锌金属酶, 能够催化CO₂与HCO₃⁻之间的可逆水合反应, 在藻类CO₂浓缩机制中发挥重要的作用。本研究采用cDNA末端快速扩增 (RACE) 等技术获得海带 (*Saccharina japonica*) 配子体细胞一个β-CA基因的cDNA及DNA序列, 将该基因命名为Sjβ-CA。根据其cDNA序列设计引物, 克隆不含信号肽的开放式阅读框序列, 构建原核表达载体pET28a-SjβCA, 并将其转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21pLysS中以诱导表达, 获得了分子量大小约为36kDa的重组蛋白。利用Bio-Scale Mini预装滤柱纯化重组蛋白Sjβ-CA, 通过电极法测得该水合酶的比活力大小为1.54U/mg; 利用重组的Sjβ-CA免疫新西兰大白兔制备Sjβ-CA多克隆抗体; 利用该抗体对海带雌、雄配子体粗蛋白进行免疫印迹, 结果证实了该抗体的特异性。并通过免疫共沉淀法证实该CA确实存在于海带配子体中。利用免疫胶体金电镜技术对其进行亚细胞定位, 结果观察到绝大多数胶体金颗粒分布在海带配子体细胞的周质空间中, 推测它可能是将海带细胞周围水环境中的HCO₃⁻转化成CO₂以进入细胞甚至叶绿体促进光合作用。

前言

由人类活动引起大气中CO₂含量的增加, 是温室效应加剧并最终导致全球变暖、海水酸化的主要原因。作为地球上CO₂排放的主要接收库, 海洋在过去的200年里, 吸收了全球大约50%的CO₂。虽然CO₂在海水中的溶解度很低, 扩散速率也非常慢, 但海带等大型经济褐藻的光合作用效率却远高于陆地植物, 主要是因为它们具有一种无机碳的浓缩机制 (inorganic carbon concentrating mechanism, CCM), 以增加Rubisco位点周围CO₂的浓度, 从而提高了藻类植物光合作用效率。

结论

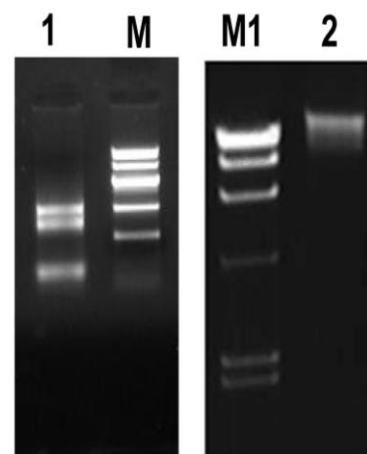


图1 海带配子体的总RNA和DNA电泳图

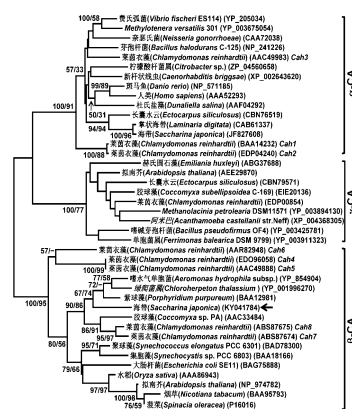


图3 基于CA蛋白氨基酸序列所构建的NJ聚类图

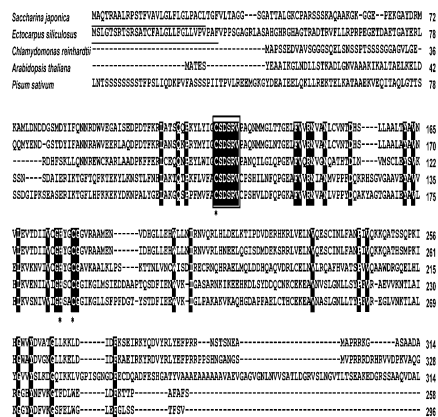


图2 CA蛋白的多序列比对

同源性70%以上的氨基酸用“阴影”表示, 保守区用“方框”表示, 锌结合位点用“*”表示, 预测的信号肽用“下划线”表示

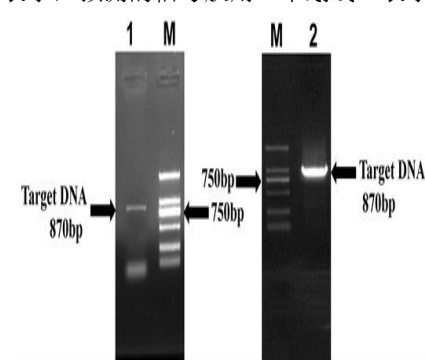


图4 以cDNA为模板扩增的产物及菌液PCR电泳图

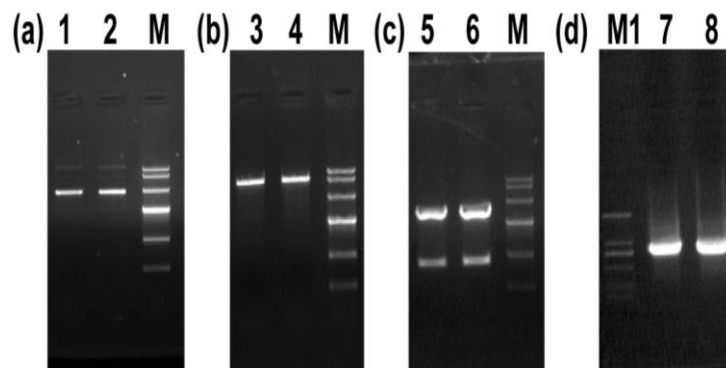


图5 原核表达载体的构建

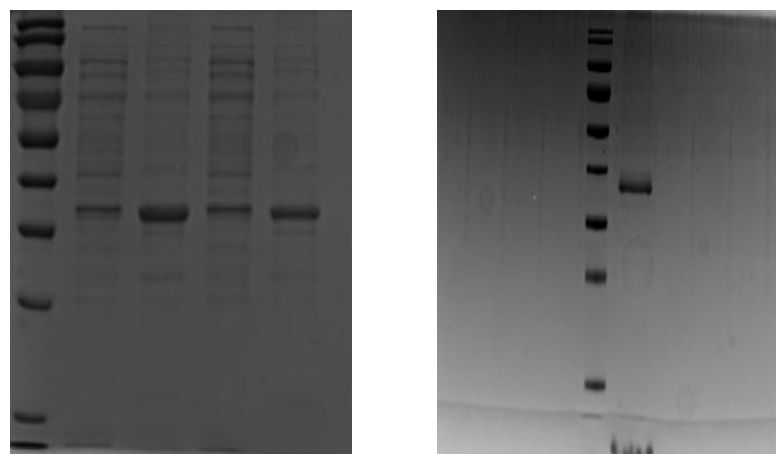


图6 蛋白诱导图, 1-4泳道分别是3小时沉淀、上清, 4小时沉淀上清

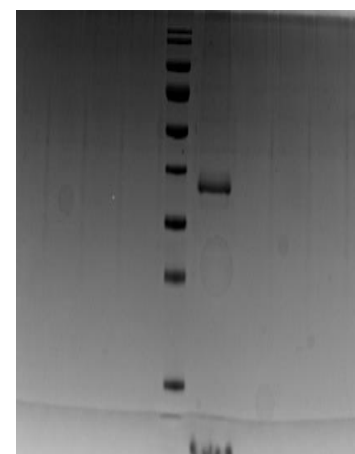


图7 蛋白纯化图, 有条带泳道为200mM咪唑洗脱

对照 (无酶) t ₀	实验组 (加酶) t	(t ₀ -t)/t	比活力 (U/mg)		
8.4-7.4	2'32"	8.34-7.34	1'43"	0.48	1.6
8.39-7.39	2'29"	8.34-7.34	1'43"	0.45	1.5
8.4-7.4	2'33"	8.35-7.35	1'45"	0.46	1.53

表1 电极法检测β-CA酶活性表.

讨论

通过上述实验, 在新西兰大白兔中成功制备了抗Sjβ-CA的多克隆抗体, 利用纯化后的重组Sjβ-CA蛋白特异性地亲和纯化了该抗体, 通过ELISA和免疫印迹技术对该多抗进行检测, 结果显示该抗体效价、纯度和特异性都很高。在海带雌、雄配子体中进行免疫印迹实验证实了Sjβ-CA确实存在于海带雌、雄配子体中, 且纯化的抗体只特异地识别配子体中的Sjβ-CA, 但Sjβ-CA在雌、雄配子体中的表达量无明显差异。所以在免疫电泳实验中必须要选择合适的方法保护抗原表位。我们知道, Sjβ-CA属于β-CA家族。β-CA在光合生物物种的亚细胞分布大致有线粒体、叶绿体基质、周质空间。莱茵衣藻中即有6个β-CA, 其中, CAH7、CAH8这两个CA比较相近, 都位于周质空间中; CAH8应该是无机碳转运系统的组成部分, 把细胞膜表面的CO₂穿过细胞膜或者是把碳酸盐转化为CO₂透过细胞膜来供光合作用利用。在蓝藻中, 发现有一个位于羧酶体里的β-CA, 主要是向羧酶体逐级转运CO₂, 促进光合反应的进行。我们所研究的β-CA应该与前人研究的β-CA功能应该类似, 因为他们都是生活在海水中的藻类, 都具有CCM浓缩机制等, 所以也应该是帮助CO₂或把HCO₃⁻转化成CO₂穿过细胞膜进入到周质空间, 经过一系列的反应为光合作用提供底物, 保证海带具有较高光合速率。