



## 海带配子体 $\gamma$ -碳酸酐酶的基因克隆与功能鉴定

许玲<sup>1</sup>, 毕燕会<sup>1,2</sup>, 周志刚<sup>3\*</sup>

(1. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 本研究采用cDNA末端快速扩增(RACE)等技术获得海带配子体细胞一个 $\gamma$ -亚型碳酸酐酶(CA)基因的cDNA及DNA全长序列。其cDNA长为1 618 bp, 编码由305个氨基酸组成的蛋白; DNA长为11 812 bp, 具6个内含子, 将开放阅读框(ORF)分割成7个外显子; 其具有一个 $\gamma$ -CA的结构域, 并具有一个独特的左手平行 $\beta$ -螺旋结构域; 由36个CA的氨基酸序列所构建的聚类图显示, 该CA与其他物种的 $\gamma$ -CA聚为一支。因而, 将该克隆的基因命名为*Sjy-CA*。为了解其编码蛋白的功能, 将*Sjy-CA*的ORF亚克隆至表达载体pET28a上, 导入大肠杆菌表达菌株BL21中, 培养并诱导目的基因表达, 亲和层析以纯化重组蛋白。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE电泳)、免疫印迹和质谱技术鉴定结果表明, 纯化所获得的重组蛋白是*Sjy-CA*。利用电极法和分光光度计法分别检测重组的*Sjy-CA*在 $\text{CO}_2$ 与 $\text{HCO}_3^-$ 中的水合反应及在乙酸对硝基苯酯水解反应中的活性, 结果显示, 重组*Sjy-CA*的水合酶比活力为0.82 U/mg, 但没有酯酶活性, 从而从功能上鉴定了*Sjy-CA*。该研究为后续探讨*Sjy-CA*在海带配子体乃至孢子体细胞或组织中的亚细胞定位等研究奠定了基础。

**关键词:** 海带; 碳酸酐酶; 亚型; 基因克隆; 功能鉴定

**中图分类号:** Q 785; S 917.3

**文献标志码:** A

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)是一种含锌金属酶, 能够有效地催化 $\text{HCO}_3^-$ 与 $\text{CO}_2$ 之间的可逆反应, 将 $\text{CO}_2$ 运输到1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RuBisCO)周围, 有助于提高藻类的光合作用效率。到目前为止, 在藻类中已报道的CA有6种亚型, 分别为 $\alpha$ -CA、 $\beta$ -CA、 $\gamma$ -CA、 $\delta$ -CA、 $\zeta$ -CA和 $\theta$ -CA<sup>[1-3]</sup>。其中,  $\gamma$ -CA最早发现于甲烷八叠球菌(*Methanosarcina thermophila*)<sup>[4]</sup>, 也在一些真核藻类中得到证实。例如, 莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)有3个 $\gamma$ -CA的基因, 其编码蛋白均定位于线粒体, 但未见功能研究的

报道<sup>[5]</sup>; 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)有4个 $\gamma$ -CA基因, 其中2个 $\gamma$ -CA(CA-IX、CA-VIII)均定位于线粒体上, 但功能尚未知<sup>[6]</sup>; 在假微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)中报道5个 $\gamma$ -CA基因, 对应蛋白除Tp $\gamma$ -CA2(CA-10)定位在细胞质外, 其他的如Tp $\gamma$ -CA1(CA-9)、Tp $\gamma$ -CA3(CA-12)和Tp $\gamma$ -CA4(CA-13)均定位于线粒体中, Tp $\gamma$ -CA5(CA-8)因无法扩增其基因的全长cDNA序列而未定位<sup>[7]</sup>; 在假微型海链藻的线粒体 $\gamma$ -CA中, Tp $\gamma$ -CA3表达水平极高, 表明它可能是这个家族的最重要成员<sup>[7]</sup>; 在缺刻缘绿藻(*Myrmecea*

收稿日期: 2019-05-27 修回日期: 2019-10-23

资助项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0901500); 国家自然科学基金(41376136); 国家“双一流”水产学科

通信作者: 周志刚, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

*incisa*)的转录组数据库中也发现1个编码 $\gamma$ -CA的基因<sup>[8]</sup>。这些结果表明 $\gamma$ -CA确实广泛地存在于藻类中。

在海带(*Saccharina japonica*)基因组<sup>[9]</sup>及转录组数据库<sup>[10-11]</sup>的基础上, Bi等<sup>[12]</sup>总结性地认为海带有3个 $\gamma$ -CA基因, 并已得到了全长mRNA测序结果的证实<sup>[13]</sup>。为进一步了解这些 $\gamma$ -CA基因的特征与功能, 本研究通过基因克隆技术获得海带配子体第1个 $\gamma$ -CA的基因序列, 并分析了其结构与特征, 通过原核表达获得重组蛋白, 并测定了其水合酶活性和酯酶活性, 从而鉴定了该基因的功能。这些结果为海带 $\gamma$ -CA的亚细胞定位及无机碳在各细胞器之间的有效转运以提高海带光合作用的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

在温度(17±1)°C、光强40  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和光周期16/8(光照/黑暗)条件下<sup>[14]</sup>, 将海带雌(RF♀1)、雄(RF♂40)配子体培养于PES培养基中<sup>[15]</sup>, 每2个星期更换1次培养基。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 感受态细胞、BL21(DE3)感受态细胞[天根生化科技(北京)有限公司]培养于LB培养基中。

### 1.2 核酸的提取及cDNA的合成

采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取海带配子体基因组DNA, 采用TRIzol试剂法抽提海带配子体总RNA, 利用反转录试剂盒(TaKaRa公司)对RNA进行反转录(RT)PCR反应合成cDNA, 使用Smart<sup>TM</sup>RACE cDNA扩增试剂盒(Clontech公司)反转录获得5'端和3'端的cDNA。具体操作参照各试剂盒的说明书进行。-20或-80°C分别保存DNA或RNA以备用。

### 1.3 海带配子体 $\gamma$ -CA基因的cDNA全长序列克隆

本实验室从通过高通量测序的海带中得到了一条长为918 bp的重叠序列(contig序列), 利用NCBI数据库进行BlastX搜索, 发现其与长囊水云(*Ectocarpus siliculosus*)一个 $\gamma$ -CA(GenBank登录号: CBN79571.1)所编码的蛋白具有83%的序列一致性。根据该contig序列设计1对引物 $\gamma$ -CAF/ $\gamma$ -CAR(表1), 以合成的cDNA为模板进行PCR扩增

以验证该contig序列。反应程序: 94°C预变性5 min; 94°C变性45 s, 66.4°C退火45 s, 72°C延伸1 min, 35个循环; 72°C延伸10 min。

表 1 本研究所使用的引物序列

Tab. 1 Nucleotide sequence of primers employed in this study

引物 primers	序列 (5'-3') sequences	退火温度 /°C annealing temperature
<b>克隆验证</b> cloning for verification		
$\gamma$ -CAF	TGCAGCAGGCACGAAGCGCGGT	66.4
$\gamma$ -CAR	TTCGGGTGTCGTCGGCTTCTCG	
<b>cDNA末端快速扩增</b> rapid amplification of cDNA ends (RACE) cloning		
$\gamma$ 5G2	ACGGTAGCGTTAGGAGCCACGAAGGAGG	66.0
$\gamma$ 5NG2	GTGCGTCTCTAGCGCAACTCC	61.5
$\gamma$ 3G2	GAGAAGGCCAGCCGCGACCCAACCTTACG	66.3
$\gamma$ 3NG2	GTTCAACACCAACTTGCGCGAGCCCGAC	64.6
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	58.7
<b>DNA克隆</b> DNA cloning		
$\gamma$ 1F	ACCATTGCTGTTTTTATTATTTTATTCGG	61.0
$\gamma$ 1R	GAAGCTGTCGTCATATGCAAGTCCACC	
$\gamma$ 2F	GGTGGACTTGCATATGACGACAGCTTC	64.3
$\gamma$ 2R	GGTCCATCAACAGCTACCTGCTCG	
$\gamma$ 3F	CGAGCAGGTAGCTGTTGATGGACC	62.6
$\gamma$ 3R	AACACCGAACACTAACGTGCCGAC	
$\gamma$ 4F	GTCGGCACGTTAGTGTTCGGTGT	62.6
$\gamma$ 4R	CAGGCGGTACGACGAAGAACGCATA	
$\gamma$ 5F	TATGCGTTCTTCGTCGTACCGCTCG	62.6
$\gamma$ 5R	TACTGCTGTAGCTCCAGCCTCGTG	
$\gamma$ 6F	GATGTTGAGACGAGCTGGGACAGGA	64.3
$\gamma$ 6R	GGCAGCGGAGCGTCTCTGTGGTA	
$\gamma$ 7F	ACCAGCCACGTGGAGAACGGCAG	66.0
$\gamma$ 7R	GGCTCCTAACGCTACCGTCGTCG	
$\gamma$ 8F	CGACGACCGTAGCGTTAGGAGCC	64.3
$\gamma$ 8R	GACCTGAAATATGTTCTTGTCCTCG	
<b>异源表达</b> heterologous expression		
BamH I-918F	ggatccATGCTGCAGCAGGCACGAAGCGCG	72.1
Not I-918R	gcggccgcTTAAGCTTTTGCCCCAGTAGC	

注: 小写字母指示酶切位点

Notes: lower-case letter denotes the restriction site

PCR扩增结束后,取20  $\mu\text{L}$ 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DH5 $\alpha$ 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测序。

根据验证的contig序列分别设计5'端和3'端的特异性引物 $\gamma 5G2/\gamma 5NG2$ 和 $\gamma 3G2/\gamma 3NG2$ (表1),利用RACE技术经过两轮PCR扩增获得 $\gamma$ -CA基因5'或3'末端序列。第一轮的反应是以上合成的5'端或3'端的cDNA为模板,以 $\gamma 5G2$ 或 $\gamma 3G2$ 为引物;反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s,退火(表1)45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min,40个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸10 min。第二轮为巢式PCR,即取1  $\mu\text{L}$ 第一轮的反应产物为模板,以 $\gamma 5NG2$ 或 $\gamma 3NG2$ 为引物,反应程序基本类同第一轮。第二轮反应结束后,取20  $\mu\text{L}$ 的PCR产物经电泳检测、胶回收、连接、转化、重组子的筛选和鉴定后,挑取阳性重组子测序,拼接后获得 $\gamma$ -CA的cDNA全长序列。

#### 1.4 海带配子体 $\gamma$ -CA基因(*Sjy-CA*)的DNA序列克隆

根据*Sjy-CA*的全长cDNA序列设计8对引物(表1),以基因组DNA作为模板进行PCR反应扩增*Sjy-CA*基因,反应体系及程序基本类同contig序列的验证,并在各对引物所对应的退火温度(表1)复性。反应结束后,取20  $\mu\text{L}$ 的PCR产物经电泳检测、胶回收、连接、转化、重组子的筛选和鉴定后,挑取阳性重组子测序,拼接后获得*Sjy-CA*的DNA全长序列。

#### 1.5 海带配子体 $\gamma$ -CA基因的序列特征分析

通过NCBI数据库中的ORF Finder进行开放阅读框的预测,以及BLAST程序进行序列的同源性搜索和比对。利用ProtParam tool(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质的分子量和等电点,利用TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)和Phobius(<http://phobius.sbc.su.se/>)预测跨膜区,利用SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和iPSORT(<http://ipsort.hgc.jp/>)预测N端信号肽,利用ChloroP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)预测叶绿体转运肽,利用TargetP(<http://www.sexuebao.cn>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)和Protein Prowler([http://bioinf.scmb.uq.edu.au/pprowler\\_webapp\\_1-2/](http://bioinf.scmb.uq.edu.au/pprowler_webapp_1-2/))预测亚细胞定位,利用PHYRE(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>)预测蛋白质结构,利用MEGA7软件中的邻接法和最大似然法进行聚类分析。

#### 1.6 *Sjy-CA*的重组表达载体的构建与转化

根据*Sjy-CA*的ORF序列和克隆质粒pTOPO及表达质粒pET28a的多克隆位点序列设计带酶切位点的引物*Bam*H I-918F/*Not* I-918R,扩增*Sjy-CA*的ORF。按照Zero Background pTOPO-TA简单克隆试剂盒(Aidlab公司)说明书构建携带目的基因的克隆质粒pTOPO-*SjyCA*。挑选单克隆做菌液PCR检测并测序以确保目的基因的正确插入。

利用质粒提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取pTOPO-*SjyCA*和表达质粒pET28a,并用限制性核酸内切酶*Bam*H I和*Not* I(TaKaRa公司)将这两种质粒于37 $^{\circ}\text{C}$ 分别进行双酶切反应4 h,再将纯化的目的产物用T<sub>4</sub>连接酶连接,得到含目的片段的重组表达质粒pET28a-*SjyCA*。利用热激法将测序正确并经双酶切验证的pET28a-*SjyCA*转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态宿主细胞,得到转基因株ET28a-*SjyCA*/BL21,冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。用pET28a空载作阴性对照。

#### 1.7 重组*Sjy-CA*的诱导表达与鉴定

采用Ye等<sup>[16]</sup>的方法,将携带重组表达质粒pET28a-*SjyCA*和空载pET28a的菌液进行活化、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- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG),在37 $^{\circ}\text{C}$ 下、以180 r/min的转速诱导表达4 h后收集菌体,取样用于十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测。将重悬的样品在液氮中反复冻融3次并超声破碎至溶液透亮。在4 $^{\circ}\text{C}$ 下、以14 000 r/min的转速离心10 min。收集上清液并用1 $\times$ 磷酸缓冲液(PBS)按10:1(菌液:1 $\times$  PBS)的比例重悬沉淀,分别留样进行SDS-PAGE检测。自转目的基因的菌液中分离出包涵体,经过2 mol/L尿素、0.1%的Triton X-100依次洗涤后,再用8 mol/L尿素溶解包涵体<sup>[17]</sup>,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)的说明书纯化重组的*Sjy-CA*(即r*Sjy-CA*)。

在将纯化的r*Sjy-CA*样品进行SDS-PAGE电泳时,按照陈晶等<sup>[18]</sup>的Western blot方法,将蛋白转

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,稀释2 000倍)作为一抗,HRP标记的羊抗兔二抗(稀释4 000倍)作为二抗,检测重组目的蛋白融合表达的聚组氨酸标签。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。

在SDS-PAGE电泳后,从凝胶上分离出目的条带,使用胰蛋白酶对蛋白质样品进行酶解,然后使用液相色谱—质谱—质谱(nanoLC-QE)联用对酶解后的多肽样品进行分析。采集多肽和多肽碎片的质量电荷比,通过搜索蛋白质质谱数据库,并与*Sj $\gamma$ -CA*所编码蛋白进行序列比对,以鉴定r*Sj $\gamma$ -CA*的氨基酸序列。

### 1.8 r*Sj $\gamma$ -CA*的复性

将经鉴定并纯化的r*Sj $\gamma$ -CA*,用100×体积的复性缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L GSH、0.2 mmol/L GSSG、1 mmol/L EDTA、4 mol/L尿素、Arg 0.4 mol/L、5%甘油, pH 8.0)在4°C下透析24 h;之后依次在尿素浓度为2、1和0 mol/L的透析缓冲液中透析12 h以复性<sup>[19-20]</sup>。在4°C下、以10 000 r/min的转速离心30 min,取上清液,测定蛋白浓度并浓缩,利用SDS-PAGE电泳检测,置于4°C冰箱保存备用。

### 1.9 r*Sj $\gamma$ -CA*的水合酶活性测定

根据Wilbur等<sup>[21]</sup>的电极法原理测定纯化后r*Sj $\gamma$ -CA*的CO<sub>2</sub>水合酶活性。在预冷的4 mL巴比妥缓冲液(pH 8.4)中加入2 mL纯化后的重组蛋白溶液,待pH计读数稳定在8.3后,立即加入2 mL饱和的CO<sub>2</sub>水(将CO<sub>2</sub>通入到0°C的去离子H<sub>2</sub>O中,持续通气1 h以上即可)。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。本实验设置2组:不加酶液组(空白对照组)和加入酶液组,每组3个重复。将1个酶活性单位(U)定义为 $(t_0-t)/t$ <sup>[22]</sup>,  $t_0$ 和 $t$ 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,r*Sj $\gamma$ -CA*的比活力则以 $(t_0-t)/t/\text{mg蛋白质}$ 来计算。

### 1.10 r*Sj $\gamma$ -CA*的酯酶活性测定

鉴于有些CA能将乙酸对硝基苯酯(p-NPA)水解成对硝基苯酚(p-NP)<sup>[23]</sup>,本研究于0.05 mL Tris-HCl缓冲液(pH 8.0, 50 mmol/L)中加入839  $\mu$ L待测

酶液,混匀后加入0.05 mL 3 mmol/L乙腈溶解的p-NPA,构建酯酶反应体系并利用分光光度法立即记录下此时的OD<sub>405</sub>,随后每隔3 min测一次OD<sub>405</sub>。以Tris-HCl缓冲液为空白对照,根据对照组和实验组的OD<sub>405</sub>数值变化来确定其酯酶活性,每组3个重复。若一个酶活性单位(U)定义为在0°C下、每min产生1  $\mu$ mol的p-NP<sup>[24]</sup>,r*Sj $\gamma$ -CA*的比活力即可用 $(C-C_0)\times V/t/\text{g蛋白质}$ 来计算, $C$ 、 $C_0$ 分别代表加酶组和对对照组产生的p-NP浓度( $\mu$ mol/mL), $V$ 为总反应体积(mL), $t$ 为反应时间(min)。

## 2 结果

### 2.1 海带配子体 $\gamma$ -CA基因的cDNA和DNA序列克隆

自海带高通量测序数据中搜索到一条长为918 bp的contig,根据此序列设计1对特异性引物 $\gamma$ -CAF和 $\gamma$ -CAR(表1),以海带配子体的cDNA为模板,扩增出单一条带(图1-a,泳道1)的产物。经克隆、测序及比对,该产物与918 bp的contig序列完全一致。这不仅验证了该序列,也说明海带配子体细胞中存在着该基因的转录产物。在此基础上,利用RACE技术扩增到该基因5'-及3'-RACE的PCR产物,经克隆、测序,它们分别长281和671 bp(图1-a,泳道2,3)。将这3段序列经拼接并重新设计引物进行扩增、克隆、测序等验证,可知该基因的cDNA序列全长1 618 bp(不包括poly A尾巴),包括一个长为918 bp的开放阅读框架(ORF)、191 bp的5'-非翻译区(UTR)以及509 bp的3'-UTR,并且具有明显的poly A尾(图1-b)。

经ORF Finder预测可知,该基因的ORF编码的蛋白由305个氨基酸组成,相对分子质量为31.26 ku,等电点为4.84。通过NCBI数据库同源性搜索和比对发现,该蛋白属于 $\gamma$ -CA家族,与相近物种长囊水云 $\gamma$ -CA基因(GenBank登录号:CBN79571.1)编码的蛋白<sup>[25]</sup>序列具有高达83%的一致性,并在第1位的蛋氨酸(Met)至第236位的酪氨酸(Tyr)之间存在一个 $\gamma$ -CA的结构域(图2),因此将该基因暂命名为*Sj $\gamma$ -CA*。

基于*Sj $\gamma$ -CA*的全长cDNA序列设计引物,经多次实验后,用8对引物( $\gamma$ 1F和 $\gamma$ 1R、 $\gamma$ 2F和 $\gamma$ 2R、 $\gamma$ 3F和 $\gamma$ 3R、 $\gamma$ 4F和 $\gamma$ 4R、 $\gamma$ 5F和 $\gamma$ 5R、 $\gamma$ 6F和 $\gamma$ 6R、 $\gamma$ 7F和 $\gamma$ 7R以及 $\gamma$ 8F和 $\gamma$ 8R)(表1),以基因组DNA为模板可扩增到产物条带,经克隆、测序,它们

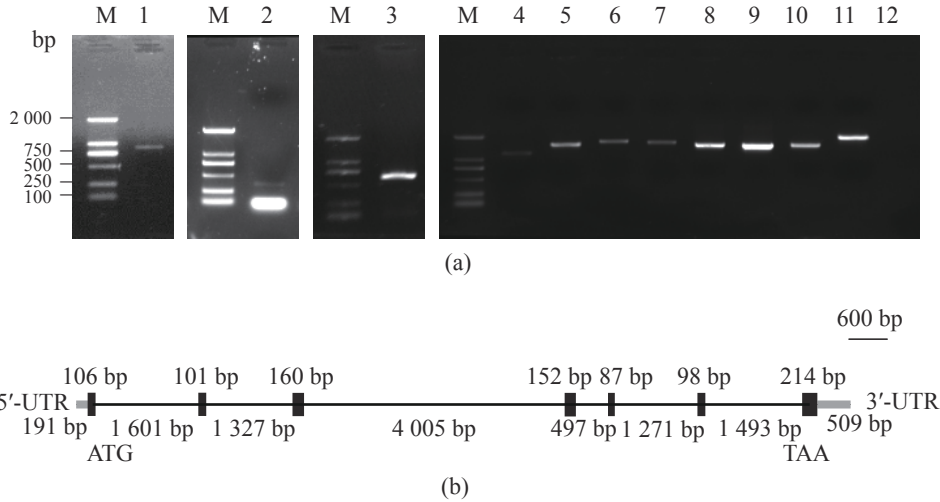


图 1 *Sjγ-CA*的cDNA和DNA扩增产物电泳图(a)及基因组结构示意图(b)

(a) 1.  $\gamma$ -*CA*基因的cDNA片段, 2. 5'-RACE的PCR产物, 3. 3'-RACE的PCR产物, 4~11.  $\gamma$ -*CA*基因的DNA扩增产物, 12. 空白对照, M. D2000的分子量标准; (b)外显子和内含子分别用黑框和黑线来表示, 非翻译区用灰线来表示

Fig. 1 Electrophoresis of cDNA and DNA amplified products (a) and gene structure (b) of *Sjγ-CA*

(a) 1. cDNA fragments of  $\gamma$ -*CA* gene, 2. products of 5'-RACE, 3. products of 3'-RACE, 4-11. products of segmental DNA amplification, 12. control only with H<sub>2</sub>O as a template, M. D2000 marker of DNA standard; (b) exons and introns are shown in black boxes and lines, respectively, and UTRs are indicated by grey lines

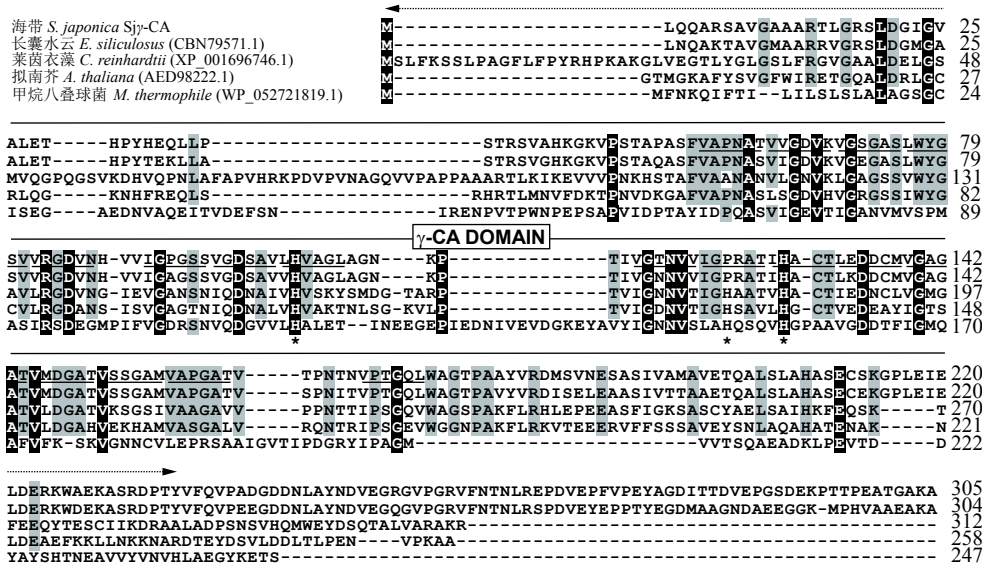


图 2  $\gamma$ -*CA*蛋白的多序列比对

灰色阴影表示80%一致性的氨基酸, 黑色阴影表示保守氨基酸, 下划线表示部分六肽重复单元, “\*”表示可能的锌结合位点

Fig. 2 Alignment of deduced amino acid sequences of  $\gamma$ -*CA* in *S. japonica*

Amino acids with 80% identity are shaded in grey, and the conserved amino acids are shaded in black, the underline indicates the hexapeptide repeat unit, asterisks indicate the putative Zn-binding sites

的大小自图1泳道4至泳道11分别为1 198、1 437、1 616、1 567、1 450、1 450、1 475和1 988 bp。将这些序列与cDNA拼接, 可知*Sjγ-CA*的DNA序列长为11 812 bp。把该DNA序列与*Sjγ-CA*的cDNA序列进行比对, 发现*Sjγ-CA*的ORF内存在6个内含子, 它们的大小从5'-UTR开始依次为

1 601、1 327、4 005、497、1 271和1 493 bp, 从而将该基因的ORF分隔成7个外显子(图1-b)。

2.2 *Sjγ-CA*的序列特征分析

将*Sjγ-CA*所编码蛋白与长囊水云、莱茵衣藻和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)及第一个在甲烷八

叠球菌中所报道的 $\gamma$ -CA<sup>[4]</sup>进行氨基酸序列比对, 发现包含Sj $\gamma$ -CA在内的4个植物型 $\gamma$ -CA均相对保守, 但它们与甲烷八叠球菌的 $\gamma$ -CA(即CAM)差异较大。尽管如此,  $\gamma$ -CA功能上重要的活性位点残基却高度保守, 例如可能构成Sj $\gamma$ -CA锌配位的His104、Pro124、His129, 以及Arg83、Asp85、Gly98、Asp99等氨基酸残基分别与CAM锌配位的3个组氨酸(His)残基(His115、His151和His156)和Arg93、Asp95、Gln109、Asp110位点完全对应<sup>[26]</sup>。不过在海带和长囊水云这2种褐藻中, 对应于CAM的第2个His残基是由脯氨酸(Pro)残基来代替, 第109位的谷氨酰胺(Gln)残基由Gly残基代替(图2)。

利用PHYRE对Sj $\gamma$ -CA进行结构预测, 结果显示每个Sj $\gamma$ -CA单体都包含7个由 $\beta$ -片层所组成

的 $\beta$ -螺旋平行结构, 即左手平行 $\beta$ -螺旋结构域(L $\beta$ H)<sup>[27]</sup>, 呈三棱柱状; 在 $\beta$ -螺旋的顶部有一个短的 $\alpha$ -螺旋, 还有1个 $\alpha$ -螺旋位于羧基端, 但与 $\beta$ -螺旋的轴反向平行;  $\beta$ -螺旋的横切面呈等边三角形, 每边都是由六肽构成的不完全重复序列, 每个六肽单元的第二个残基一般是异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)或缬氨酸(Val)等脂肪族氨基酸(图2)。

将自NCBI中同源搜索获得的35条不同物种CA与Sj $\gamma$ -CA的氨基酸序列用最大似然法(ML)和邻接法(NJ)进行聚类分析。结果显示, 这36条序列明显地被聚成3大支, 分别对应于 $\alpha$ -CA(NJ和ML的靴带值分别为98%/94%)、 $\beta$ -CA(NJ和ML的靴带值分别为97%/63%) and  $\gamma$ -CA(NJ和ML的靴带值分别为100%/81%)(图3), 支持了 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -CA等各类CA应是趋同进化的结论<sup>[28]</sup>。本研究自海带

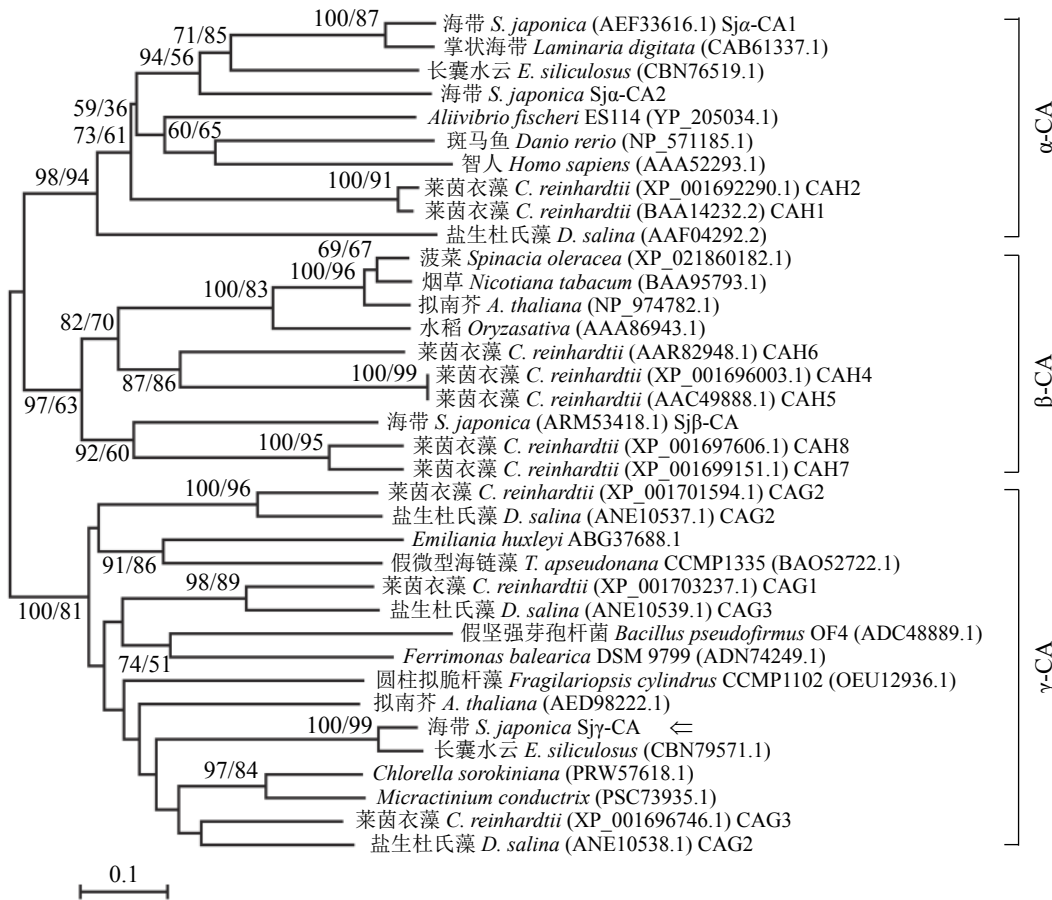


图3 基于CA的氨基酸序列所构建的聚类图

箭头所指示的是Sj $\gamma$ -CA; 每个物种拉丁学名后面的括号内信息表明该物种的CA蛋白序列号; 在节点处斜杠前后的数据, 分别为邻接法(NJ)和最大似然法(ML)的靴带值

Fig. 3 Phylogenetic tree inferred from the deduced amino acid sequences of CA amino acid from several species

Sj $\gamma$ -CA is marked by an arrow; the accession numbers of CA proteins are shown in the parentheses behind Latin names of each species; the numbers before and after slash at the nodes indicate the neighbour-joining and maximum likelihood bootstrap proportion (BP) values (only values  $\geq 50\%$  are shown), respectively

中所克隆的CA位于 $\gamma$ -CA分支,与同属于褐藻的长囊水云 $\gamma$ -CA关系最近;在 $\gamma$ -CA分支中,假微型海链藻CCMP1335的T $\gamma$ -CA3(GenBank登录号:BAO52722.1)功能已得到证实<sup>[7]</sup>,从而表明Sj $\gamma$ -CA应属于 $\gamma$ -CA家族。

利用TMHMM和Phobius软件对Sj $\gamma$ -CA进行分析,结果显示该蛋白无跨膜区;经SignalP和iPSORT预测,该蛋白也无信号肽;经TargetP、Protein Prowler预测,Sj $\gamma$ -CA可能在线粒体中发挥其作用;鉴于莱茵衣藻<sup>[5]</sup>、三角褐指藻<sup>[6]</sup>、假微型海链藻<sup>[7]</sup>等其他真核藻类中的多数 $\gamma$ -CA是定位于线粒体中,推测Sj $\gamma$ -CA是一个定位于线粒体的蛋白;但经ChloroP预测,Sj $\gamma$ -CA具有由65个氨基酸构成的叶绿体转运肽,这意味着它也有可能存在于叶绿体中。因此,有关其亚细胞定位需采用免疫胶体金等手段来确定。

### 2.3 Sj $\gamma$ -CA的重组与表达

在对Sj $\gamma$ -CA进行生物信息学分析后,发现它不具有跨膜区、信号肽等序列特征,据此设计1对带酶切位点的引物BamH I-918F和Not I-918R,扩增Sj $\gamma$ -CA的完整ORF序列。扩增产物经电泳检测可见单一条带(图4,泳道1),经克隆、测序可知,其大小为932 bp(含918 bp的目的基因片段和14个碱基的酶切位点片段),与理论PCR产物片段大小一致。将扩增产物纯化后并连接在克隆载体pTOPO上,得到克隆质粒pTOPO-Sj $\gamma$ CA;利用BamH I和Not I分别双酶切pTOPO-Sj $\gamma$ CA及表

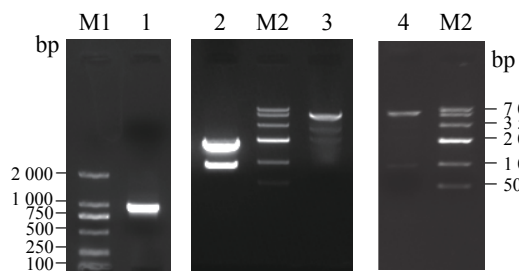


图4 pET28a-Sj $\gamma$ CA构建过程中相关产物的电泳图谱

1. 带有酶切位点引物的Sj $\gamma$ -CA cDNA产物, 2. pTOPO-Sj $\gamma$ CA的双酶切产物, 3. pET28a的双酶切产物, 4. pET28a-Sj $\gamma$ CA的双酶切产物, M1和M2. 分别为D2000和Marker IV的DNA分子量标准

#### Fig. 4 Electrophoresis patterns of related products in the construction of recombinant vector pET28a-Sj $\gamma$ CA

1. products of primers with restriction sites for amplification of partial Sj $\gamma$ -CA cDNA, 2. double enzyme digestion products of pTOPO-Sj $\gamma$ CA, 3. double enzyme digestion products of pET28a, 4. double enzyme digestion products of pET28a-Sj $\gamma$ CA, M1 and M2. D2000 and Marker IV of DNA standard, respectively

<http://www.scxuebao.cn>

达质粒pET28a(图4,泳道2和3),连接目的片段以构建含目的基因的重组表达质粒pET28a-Sj $\gamma$ CA。提取该表达质粒,经BamH I和Not I双酶切反应和电泳检测(图4,泳道4),酶切产物中出现一条与目的片段大小(932 bp)一致的条带,测序后证明该条带包含了目的基因的序列且插入方向正确。

将pET28a-Sj $\gamma$ CA及空载pET28a转化至大肠杆菌BL21的感受态细胞中,分别获得转基因株ET28a-Sj $\gamma$ CA/BL21和ET28a/BL21。经过扩大培养并添加IPTG诱导目的基因的表达后,提取这些菌体的总蛋白,经SDS-PAGE电泳图分析可知,与ET28a/BL21相比(图5,泳道3),携带目的基因的转基因株ET28a-Sj $\gamma$ CA/BL21(图5,泳道2)显然多出一条约38 ku的蛋白条带,推测应是目的基因的表达产物;但它比目的基因所编码蛋白的理论分子量(包含31.26 ku由目的基因编码的蛋白和3.56 ku由表达质粒pET28a中His标签及多克隆位点碱基所编码的多肽)大了约3 ku。

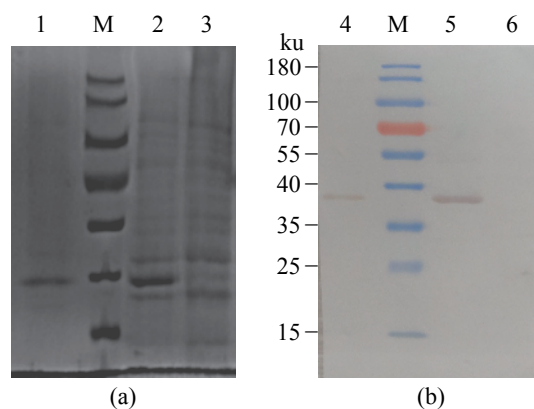


图5 Sj $\gamma$ -CA重组蛋白的SDS-PAGE电泳图(a)与聚组氨酸标签免疫印迹图(b)

M. 蛋白质分子量标准品, 1和4. 纯化的rSj $\gamma$ -CA蛋白, 2和5. 经IPTG诱导培养4 h后的转目的基因菌液蛋白, 3和6. 携带空载的菌液蛋白ET28a/BL21作对照

#### Fig. 5 SDS-PAGE pattern (a) and Western blot analysis with anti-His<sub>6</sub>-tag antibody (b) of the recombinant Sj $\gamma$ -CA

M. prestained protein ladder, 1 and 4. purified recombinant Sj $\gamma$ -CA, 2 and 5. the whole-cell protein of transformant ET28a-Sj $\gamma$ CA/BL21 induced for 4 h by IPTG, 3 and 6. the whole-cell protein of ET28a/BL21 as a control

### 2.4 重组蛋白rSj $\gamma$ -CA的纯化与鉴定

将诱导培养的菌液反复冻融及超声波破碎,分别取上清液和沉淀中的蛋白进行电泳检测,发现上清液和沉淀中均出现与目的蛋白大小相

近的条带。由于上清液中的目的蛋白无法与亲和层析柱的镍结合, 难以从上清液中纯化到目的蛋白, 只能从包涵体中纯化重组蛋白。

首先对自转基因菌株中提取的包涵体进行洗涤、溶解, 再利用Bio-Scale™ Mini Profinity™ IMAC Cartridges蛋白亲和层析纯化预装柱, 对自包涵体中提取的蛋白用含不同浓度咪唑的洗脱缓冲液进行纯化。其中, 用含250 mmol/L咪唑的洗脱缓冲液洗脱下来的产物, 经SDS-PAGE电泳和染色, 在目的蛋白大小处只显现1条带(图5, 泳道1)而无杂带, 这样就得到纯化的重组蛋白rSjy-CA。

为了证明这个重组的蛋白是目的蛋白, 进行了两个方面的实验。由于是利用pET28a来构建携带Sjy-CA的重组表达质粒, 其中目的蛋白是与载体中的聚His标签融合表达的, 因此可以利用商业提供的抗聚His标签的抗体, 对自转基因菌株中提取的总蛋白和纯化的重组蛋白进行Western blot分析。结果显示, 只在大约38 ku的位置有单一条带的印迹(图5, 泳道4和5), 与电泳检测结果(图5, 泳道1和2)一致。表明纯化所获得的蛋白(图5, 泳道1和4)携带聚His标签。

与此同时, 从SDS-PAGE上割胶分离约38 ku的目的条带, 经胰蛋白酶酶解后, 上样至Trap, 利用液相色谱—质谱—质谱联用技术, 采集多肽和多肽碎片的质荷比, 并搜索蛋白质谱数据库, 检测到8个肽段, 共146个aa, 虽只占其总长度(305 aa)的47.87%, 但每个肽段均与Sjy-CA所编码蛋白的相应片段完全匹配(图6-b)。

总之, 由Western blot及质谱分析的结果证明, 纯化得到的重组蛋白即为目的基因Sjy-CA所编码的蛋白。质谱数据显示蛋白分子量大小为31.26 ku, 与目的基因所编码蛋白的理论分子量一致, 加上pET28a载体上的His6-tag等部分碱基所编码蛋白(共34 aa, 3.56 ku)的分子量, 使得其分子量达到35 ku。而重组蛋白在电泳染色后显示其分子量接近38 ku(图5), 推测这3 ku的差异可能是由于蛋白的修饰而引起。

### 2.5 Sjy-CA重组蛋白的酶活性检测

异源表达的rSjy-CA是从包涵体中纯化的, 因折叠错误而不具备生物学活性, 因此在进行酶活性检测之前, 必须对纯化的rSjy-CA进行复性。经过对不同梯度浓度尿素的复性液透析后

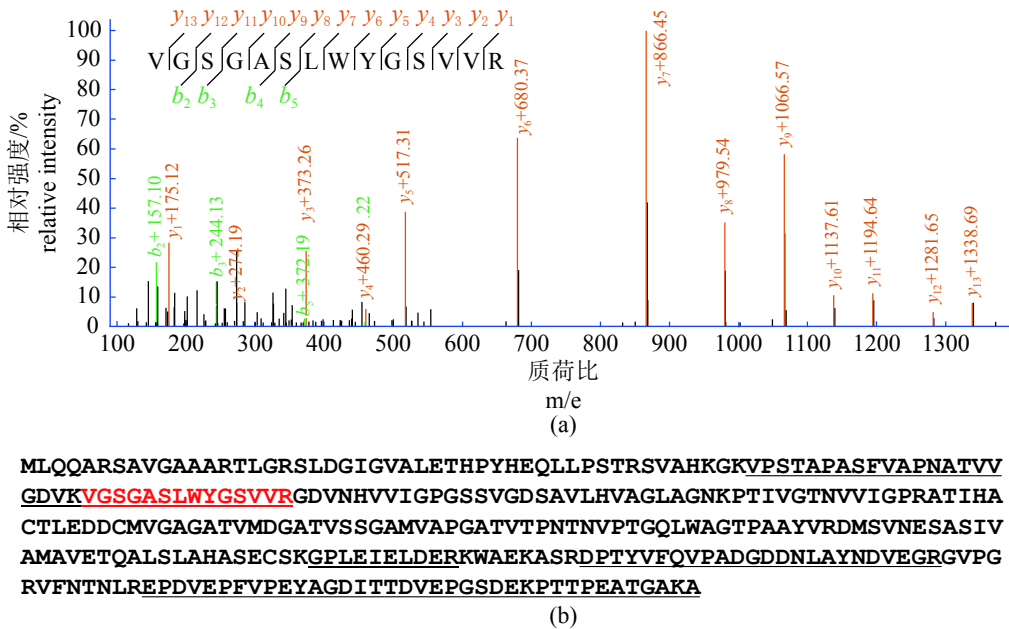


图 6 rSjy-CA一个肽段的质谱图及该肽段在Sjy-CA蛋白中的位置

(a) 质谱图; (b) 肽段序列, 下划线部分表示质谱检测到的肽段序列, 红色部分表示质谱图所对应的氨基酸序列

Fig. 6 Mass spectrum of a peptide digested from the recombinant Sjy-CA (a) and location of this peptide in the deduced amino acids encoded by Sjy-CA

(a) mass spectrometry; (b) peptide sequences, the underlined residues panel indicate peptide sequences, red parts show the amino acid sequence corresponding to the panel



得到复性的rSj $\gamma$ -CA, 浓缩后经紫外分光光度法测定, 其蛋白的浓度为0.117 mg/mL。

在体外构建CO<sub>2</sub>的水合反应(即CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O→HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>+H<sup>+</sup>)体系, 利用电极法测定可知, 在添加纯化复性的rSj $\gamma$ -CA反应体系中, 需要2.08 min (n=3), pH就从8.3下降到7.3; 而在不加rSj $\gamma$ -CA的体系中, 则需要2.49 min(n=3), pH才能下降到7.3; 经双侧检验, 加rSj $\gamma$ -CA与不加rSj $\gamma$ -CA反应体系的时间有极显著差异(P=0.000<0.01)。结果表明, 经复性后的rSj $\gamma$ -CA具有酶活性, 可以加速CO<sub>2</sub>的水合反应能力, 从而使反应体系在指定的时间内形成更多的H<sup>+</sup>, 这样下降1个pH单位所需的时间就短。通过计算可知, rSj $\gamma$ -CA的水合反应比活力为(0.82±0.023) U/mg蛋白(n=3)。

鉴于有些CA具有酯酶活性<sup>[3]</sup>, 实验还构建了体外反应体系将p-NPA水解成p-NP, 来了解rSj $\gamma$ -CA是否具有酯酶活性。根据不同浓度的p-NP标准液与405 nm波长处的吸光度之间的关系绘制的标准曲线中, 获得了OD<sub>405</sub>与蛋白浓度的关系:  $y=0.0162x+0.0189$ 。其中R<sup>2</sup>=0.9987, 满足实验对精度的要求。

将不加酶液组(空白对照组)和加入酶液组分别进行酯酶活性测定, 发现加入酶液组未检测到活性。因此, 重组的Sj $\gamma$ -CA与其他 $\gamma$ -CA一样不具有酯酶活性<sup>[29]</sup>, 只具有水合酶活性, 从而鉴定了Sj $\gamma$ -CA所编码蛋白的功能。

### 3 讨论

本研究通过基因克隆等技术从海带配子体中获得一个 $\gamma$ -CA基因(Sj $\gamma$ -CA) cDNA的全长(图1), 其编码305个氨基酸, 与相近物种长囊水云中的 $\gamma$ -CA(GenBank登录号: CBN79571)大小相近, 且具有高达83%的序列一致性; 经BlastP搜索发现, Sj $\gamma$ -CA在第1个Met至第236个Tyr之间存在一个gamma-CA保守结构域(图2); 同源建模显示它独特的L $\beta$ H结构域, 使Sj $\gamma$ -CA单体呈现三棱柱状的空间结构; 在聚类图中, 该CA与其他物种的 $\gamma$ -CA聚为一支(图3)。这些结果表明, 此蛋白应属于 $\gamma$ -CA家族。通过异源表达获得该基因融合表达的重组蛋白rSj $\gamma$ -CA, 利用电极法检测纯化后的rSj $\gamma$ -CA水合酶活性, 计算出其水合反应比活力为0.82 U/mg蛋白, 表明rSj $\gamma$ -CA具有将CO<sub>2</sub>水合成HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>的功能, 进而从功能上鉴定了该基因。

<http://www.sxuebao.cn>

1994年, Alber等<sup>[4]</sup>将甲烷八叠球菌中编码CAM的基因克隆至pUC18载体上, 并转入大肠杆菌中, 测得重组表达的蛋白活性为2.3 U/mg蛋白。近年来, 通过重组普通念珠藻(*Nostoc commune*)<sup>[30]</sup>、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas haloplanktis*)<sup>[31]</sup>、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)<sup>[32]</sup>等的 $\gamma$ -CA, 发现它们与CAM一样, 具有较高的CO<sub>2</sub>水合酶活性。张朝晖等<sup>[33]</sup>异源重组了嗜热菌(*Methanocella conradii* HZ254)中一个 $\beta$ -CA, 测得其水合酶的比活为0.41 U/mg蛋白, 且无酯酶活性。Qu等<sup>[34]</sup>也异源重组了生长于南极冰中一种衣藻(*Chlamydomonas* sp. ICE-L)的一个 $\alpha$ -CA蛋白, 并测定其比活力为0.437 U/mg。而本研究中通过异源重组海带中的Sj $\gamma$ -CA, 测得其CO<sub>2</sub>水合酶活性虽低于CAM的比活力, 但明显高于嗜热菌及衣藻的CA, 表明rSj $\gamma$ -CA的水合反应能力应在可接受的范围内。

CA具有多种功能, 如催化CO<sub>2</sub>与HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>之间相互转化, 转运、积累H<sup>+</sup>和HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>以维持pH稳态, 离子运输等, 这些功能取决于它们在细胞或组织中的位置<sup>[35]</sup>。经TargetP、Protein Prowler软件预测, 将Sj $\gamma$ -CA定位在线粒体中; 根据在莱茵衣藻、三角褐指藻、假微型海链藻等真核藻类 $\gamma$ -CA的报道结果<sup>[36-37]</sup>, 以及本研究有关rSj $\gamma$ -CA水合酶活性的检测结果, 推测Sj $\gamma$ -CA能将线粒体中的CO<sub>2</sub>转化为HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 而后, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>经胞质再转运到叶绿体基质中, 从而将呼吸作用产生的CO<sub>2</sub>用于光合作用, 实现CO<sub>2</sub>的“重捕获”。但值得注意的是, 经ChloroP软件预测, Sj $\gamma$ -CA具有由65个氨基酸构成的叶绿体转运肽, 这意味着它也有可能存在于叶绿体中, 将叶绿体基质的HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>脱水为CO<sub>2</sub>, 为基质中的RuBisCO提供CO<sub>2</sub>; 或将进入叶绿体基质的CO<sub>2</sub>水合成HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 避免CO<sub>2</sub>因易透过膜而泄漏, 达到无机碳的富集目的<sup>[38]</sup>。因此, 有关Sj $\gamma$ -CA在海带配子体细胞中的作用只有待其亚细胞定位确认后能更清楚地阐明。

### 参考文献:

- [1] Moroney J V, Ma Y B, Frey W D, et al. The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles[J]. *Photosynthesis Research*, 2011, 109(1-3): 133-149.

- [ 2 ] 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.
- [ 3 ] Kikutani S, Nakajima K, Nagasato C, *et al.* Thylakoid luminal  $\theta$ -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(35): 9828-9833.
- [ 4 ] Alber B E, Ferry J G. A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(15): 6909-6913.
- [ 5 ] Aspatwar A, Haapanen S, Parkkila S. An update on the metabolic roles of carbonic anhydrases in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Metabolites*, 2018, 8(1): 22.
- [ 6 ] Kitao Y, Harada H, Matsuda Y. Localization and targeting mechanisms of two chloroplastic  $\beta$ -carbonic anhydrases in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Physiologia Plantarum*, 2008, 133(1): 68-77.
- [ 7 ] Samukawa M, Shen C, Hopkinson B M, *et al.* Localization of putative carbonic anhydrases in the marine diatom, *Thalassiosira pseudonana*[J]. *Photosynthesis Research*, 2014, 121(2-3): 235-249.
- [ 8 ] 梅守华, 毕燕会, 周志刚. 缺刻缘绿藻碳酸酐酶(CA)基因的序列克隆及特征分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(5): 658-668.
- Mei S H, Bi Y H, Zhou Z G. Molecular cloning and characterization of carbonic anhydrase (CA) genes from *Myrmecia incisa* Reisingl H4301[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(5): 658-668(in Chinese).
- [ 9 ] Ye N H, Zhang X W, Miao M, *et al.* *Saccharina* genomes provide novel insight into kelp biology[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6986.
- [ 10 ] Deng Y Y, Yao J T, Wang X L, *et al.* Transcriptome sequencing and comparative analysis of *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae) under blue light induction[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39704.
- [ 11 ] Wang W J, Wang F J, Sun X T, *et al.* Comparison of transcriptome under red and blue light culture of *Saccharina japonica* (Phaeophyceae)[J]. *Planta*, 2013, 237(4): 1123-1133.
- [ 12 ] Bi Y H, Zhou Z G. Absorption and transport of inorganic carbon in kelps with emphasis on *Saccharina japonica*[M]//Najafpour M M. *Applied Photosynthesis—New Progress*. Rijeka, Croatia: InTechOpen, 2016: 111-131.
- [ 13 ] 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.
- [ 14 ] 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.
- [ 15 ] Bouck G B. Fine structure and organelle association in brown algae[J]. *Journal of Cell Biology*, 1965, 26(2): 523-537.
- [ 16 ] 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.
- [ 17 ] 乔亚明. 海带配子体 $\alpha$ -碳酸酐酶2(CA2)的基因克隆、原核表达与亚细胞定位研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- Qiao Y M. Gene cloning, prokaryotic expression and subcellular localization of  $\alpha$ -carbonic anhydrase 2 (CA2) from the gametophytes of *Saccharina japonica*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [ 18 ] 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 J, Wang L L, Shi W W, *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(in Chinese).
- [ 19 ] 张艳敏. 对虾溶菌酶重组蛋白在大肠杆菌表达及包涵体复性研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2014.
- Zhang Y M. Recombinant expression of shrimp lysozyme in *Escherichia coli* and refolding of shrimp lysozyme inclusion bodies[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2014 (in Chinese).
- [ 20 ] 孙卫国, 郑本献, 熊志红, 等. 人血小板衍生生长因子

- BB亚型包涵体复性与纯化[J]. *生物技术通讯*, 2018, 29(3): 382-386.
- Sun W G, Zheng B X, Xiong Z H, *et al.* Renaturation and purification of inclusion body of platelet-derived growth factor BB[J]. *Letters in Biotechnology*, 2018, 29(3): 382-386(in Chinese).
- [21] Wilbur K M, Anderson N G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1948, 176(1): 147-154.
- [22] Haglund M M, Ojemann G A, Hochman D W. Optical imaging of epileptiform and functional activity in human cerebral cortex[J]. *Nature*, 1992, 358(6388): 668-671.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Cock J M, Sterck L, Rouz e P, *et al.* The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae[J]. *Nature*, 2010, 465(7298): 617-621.
- [26] Parisi G, Perales M, Fornasari M S, *et al.* Gamma carbonic anhydrases in plant mitochondria[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(2): 193-207.
- [27] Parisi G, Fornasari M, Echave J. Evolutionary analysis of  $\gamma$ -carbonic anhydrase and structurally related proteins[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, 14(3): 323-334.
- [28] Moroney J V, Bartlett S G, Samuelsson G. Carbonic anhydrases in plants and algae[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2001, 24(2): 141-153.
- [29] Innocenti A, Supuran C T. Paraoxon, 4-nitrophenyl phosphate and acetate are substrates of  $\alpha$ - but not  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\zeta$ -carbonic anhydrases[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20(21): 6208-6212.
- [30] De Luca V, Del Prete S, Carginale V, *et al.* Cloning, characterization and anion inhibition studies of a  $\gamma$ -carbonic anhydrase from the Antarctic cyanobacterium *Nostoc commune*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 25(21): 4970-4975.
- [31] Vullo D, De Luca V, Del Prete S, *et al.* Sulfonamide inhibition studies of the  $\gamma$ -carbonic anhydrase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 25(17): 3550-3555.
- [32] Del Prete S, Vullo D, De Luca V, *et al.* Anion inhibition profiles of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -carbonic anhydrases from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2016, 24(16): 3413-3417.
- [33] 张朝晖, 马晓舟. 一种嗜热型碳酸酐酶基因的克隆表达及酶学性质[J]. *工业微生物*, 2015, 45(4): 1-6.
- Zhang Z H, Ma X Z. Cloning and expression of a thermophilic carbonic anhydrase and its enzymatic properties[J]. *Industrial Microbiology*, 2015, 45(4): 1-6(in Chinese).
- [34] Qu C F, He Y 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.
- [35] Kisker C, Schindelin H, Alber B E, *et al.* A left-handed  $\beta$ -helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*[J]. *EMBO Journal*, 1996, 15(10): 2323-2330.
- [36] 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.
- [37] Tachibana M, Allen A E, Kikutani S, *et al.* Localization of putative carbonic anhydrases in two marine diatoms, *Phaeodactylum tricorutum* and *Thalassiosira pseudonana*[J]. *Photosynthesis Research*, 2011, 109(1-3): 205-221.
- [38] Fromm S, Braun H P, Peterhansel C. Mitochondrial gamma carbonic anhydrases are required for complex I assembly and plant reproductive development[J]. *New Phytologist*, 2016, 211(1): 194-207.

## Cloning and functional characterization of a $\gamma$ -carbonic anhydrase (CA) gene from the gametophytes of *Saccharina japonica*

XU Ling<sup>1</sup>, BI Yanhui<sup>1,2</sup>, ZHOU Zhigang<sup>3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Exploitation and Utilization of Aquatic Germplasm Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. International Research Center for Marine Biosciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In this study, the full-length cDNA and DNA of a  $\gamma$ -type carbonic anhydrase (CA) gene was obtained from the gametophyte of *Saccharina japonica* by the rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. The results showed that the cDNA of this gene was 1 618 bp in length, encoding a protein consisting of 305 amino acids, and the genomic DNA was 11 812 bp long, with 6 introns, so that the open reading frame (ORF) was divided into 7 exons. It had a gamma-CA domain and a unique L $\beta$ H domain. The Neighbor-joining and the Maximum Likelihood phylogenetic tree constructed from the deduced amino acid sequences of 36 CAs showed that the cloned CA was clustered with other  $\gamma$ -CAs. Therefore, the gene was designated *Sj $\gamma$ -CA*. In order to understand the function of the encoded protein, the ORF of *Sj $\gamma$ -CA* was subcloned and ligated into the expression vector pET-28a to generate pET28a-Si $\gamma$ CA. Subsequently, this construct was introduced into *Escherichia coli* BL21 for the heterologous expression of target protein. The recombinant Sj $\gamma$ -CA was purified by affinity chromatography. After SDS-PAGE electrophoresis, Western blotting analysis and mass spectrometry, the purified recombinant Sj $\gamma$ -CA was identified. The activity of rSj $\gamma$ -CA in the hydration reaction of CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> was detected by electrode method and its specific activity was 0.82 U/mg. The hydrolysis of p-nitrophenyl acetate was detected by spectrophotometer, but no esterase activity was detected. Sj $\gamma$ -CA was thus identified functionally. This study provides a basis for the subcellular localization of Sj $\gamma$ -CA in gametophyte and sporophyte cells or tissues of *S. japonica*.

**Key words:** *Saccharina japonica*; carbonic anhydrase; isoform; gene cloning; functional characterization

**Corresponding author:** ZHOU Zhigang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

**Funding projects:** National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901500); National Natural Science Foundation of China (41376136); State Double First-Class Discipline Project of Aquaculture