

海带配子体碳酸酐酶(CA)基因的克隆及其特征分析

余贞^{1,2}, 毕燕会^{1,2}, 周志刚^{1,2*}

(1. 上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306;

2. 上海高校水产养殖 E-研究院, 上海 201306)

摘要: 根据海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库 2 个长为 376 bp 的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), Blastn 搜索发现它们与掌状海带的碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA) 基因序列(GenBank 登录号: AJ130777) 有 70% 的相似性, 结合该 EST 以及掌状海带 CA 基因保守序列设计引物, 扩增得到海带配子体 CA 基因部分开放阅读框(open reading frame, ORF) 序列, 再以此为基础设计基因特异性引物, 然后利用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE), 克隆得到一条长 2 804 bp 的 cDNA 序列(GenBank 登录号: JF827608), 其中 5'-非翻译区(untranslated region, UTR) 长 166 bp, 3'-UTR 长 1 765 bp, 且具有明显的 polyA 尾巴, ORF 长 873 bp。它编码一个由 290 个氨基酸组成的前体蛋白, 预测在 20 Gly-21 Val 处有一个典型的信号肽酶切位点, 酶切后的成熟蛋白由 270 个氨基酸组成, 具有 3 个锌结合的 His 残基所构成的催化活性中心, 其分子量为 30.44 ku, 等电点为 5.06。无论在 cDNA 或者 DNA 序列上, 雌、雄配子体 CA 基因都没有差异, 且无内含子。Southern-blotting 杂交结果显示, 海带配子体 CA 基因为单拷贝基因。蛋白同源搜索, 发现该基因的编码蛋白与掌状海带的 α -CA 蛋白有 87% 的同源性。基于 36 个 CA 蛋白的氨基酸序列所构建的邻接(Neighbor-Joining) 系统进化树显示, 自海带配子体中所克隆的 CA 基因位于 α -CA 蛋白所组成的一支, 推测它可能为 α -型, 因而不在线粒体中起作用。实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, Q-RT-PCR) 结果表明, 在增加 CO₂ 浓度的条件下, CA 基因在海带雌、雄配子体中的日表达量均较未增加的条件下有所增加, 由此推测该 CA 基因不属于胞外 CA; 基于海带配子体 CA 蛋白仅具有一个信号肽, 可以推测它是定位于叶绿体外膜上, 以泵的方式为叶绿体光合作用提供充足的 CO₂。

关键词: 海带; 配子体; 碳酸酐酶基因; 克隆; 荧光定量 PCR

中图分类号: S 917

文献标志码: A

随着大气 CO₂ 量的增加, 溶解在海水中的 CO₂ 也不断上升, 从而产生大量的 HCO₃⁻ 和 H⁺, 导致海水酸化, 进而影响海洋生物的生存环境, 甚至破坏稳定的海洋生态系统。但海藻等海洋植物却能充分利用水中的 CO₂ 以确保光合作用的进行^[1-2]。当这些养殖的海藻被人工采收后, 它们所固定的碳就脱离了原海洋生态系统的碳循环途径, 因此, 经济海藻的养殖对阻止海水的酸化起着

非常重要的作用。

陆地高等植物主要是通过叶片上的气孔来吸收 CO₂。而海藻却不同, 它们形态结构简单, 不具备分化的气孔, 主要是借助碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA), 自海水中吸收 CO₂^[3]。CA 是一种含锌金属酶, 能够催化 CO₂ 与 HCO₃⁻ 之间的快速转换, 以供应叶绿体光合作用所需的 CO₂, 且又不影响水中 CO₂ 浓度的平衡^[4]。

收稿日期: 2011-05-17 修回日期: 2011-06-20

资助项目: 国家自然科学基金(30671627); 上海市教育委员会海洋生物学重点学科资助项目(J50701)

通讯作者: 周志刚, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

海带 (*Laminaria japonica*) 隶属褐藻门 (Phaeophyta)、海带目 (Laminariales), 是我国海水养殖业中重要的经济海藻之一, 它不仅具有较高的经济价值, 其养殖对近海海洋环境保护与海水养殖业可持续发展也起着不可估量的作用^[5-9]。近年来, 关于藻类 CA 的研究虽然越来越多^[10-14], 但就海带是如何利用 CA 来吸收 CO₂^[15-17], 特别是有关海带 CA 的分子生物学等研究报道甚少^[18]。

为此, 本研究在海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库筛选到与掌状海带 (*L. digitata*) CA 基因 (GenBank 登录号: AJ130777) 有关的 2 个表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 基础上^[19-20], 利用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 克隆海带 CA 基因的 cDNA 序列, 运用生物信息学方法分析其序列特征, 基于 CA 的系统演化树, 分析海带配子体 CA 基因的类别, 并利用荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, Q-RT-PCR) 探讨它在不同碳源条件下表达量的变化规律, 以进一步分析其功能与细胞定位, 为海带吸收并固定 CO₂ 的分子机理研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 海带配子体无性繁殖体系培养

海带雌 (RF ♀ 1)、雄 (RF ♂ 12) 配子体无性繁殖体系是本实验室长期保存的种质, 按已报道的方法^[21-22]在 PES 培养基^[23]中培养。培养温度为 (17 ± 1) °C、光照强度为 40 μmol photons/(m² · s)、光周期为 16 h: 8 h (光照: 黑暗)。

将海带雌、雄配子体用粉碎机 (Philips) 制成悬浮液, 离心收集配子体细胞并分装于 100 mL 锥形瓶中, 每瓶分装 15 g 鲜重配子体细胞, 于正常条件下先培养 7 d 后, 接着置于上述白色光源下, 以同样的温度和光周期但不同碳源条件 (过滤空气、过滤空气 + 3% CO₂、1 mol/L NaHCO₃) 下充气 (100 L/h) 培养。分别于 00:00、08:00、16:00、24:00 收集配子体, 提取总 RNA 以探讨 CA 基因的日表达谱。

1.2 海带雌、雄配子体 CA 基因 cDNA 全长序列克隆

将海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库中筛选到的 EST 序列经过 Blastn 比对, 发现其中 2 个

EST 序列与掌状海带 CA 基因序列相似性高达 70%, 根据这 2 个已知序列以及掌状海带 CA 基因 ORF 区保守序列设计一对基因特异性引物 J1-U 和 J1-D (表 1)。离心收集海带雌、雄配子体, 利用 TRIzol (TaKaRa 公司) 法提取总 RNA。先按照反转录 PrimeScriptTM RT 试剂盒 (TaKaRa 公司) 操作手册进行 cDNA 第一链的合成, 再利用 PCR 扩增克隆 CA 基因的 cDNA 片段。25 μL 的 PCR 反应体系包括 10.5 μL 灭菌双蒸水、12.5 μL 的 2 × pfu PCR Master Mix (天根生化科技有限公司)、各 0.5 μL 的 J1-U 和 J1-D (10 μmol/L)、1 μL 模板 cDNA。反应条件为 94 °C 预变性 3 min; 30 个循环包括 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min; 最后 72 °C 延伸 5 min。获得 PCR 产物 F₁。

1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增反应产物。按照天根生化科技有限公司的 DNA 胶回收试剂盒说明书操作步骤回收并纯化 PCR 扩增产物, 然后在 16 °C 将 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体 (TaKaRa 公司) 中, 再转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli* JM109) DH5α 感受态细胞中 (天根生化科技有限公司), 最后通过蓝白斑筛选, 并将菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆送至上海桑尼生物科技有限公司测序。

按照 SMARTTM RACE cDNA 扩增反应试剂盒 (Clontech 公司) 反转录合成 3'-RACE 和 5'-RACE 的 cDNA。5 μL 反应体系包含 2 μL 总 RNA、1 μL 的 3'-CDS 或 5'-CDS primer A、1 μL 的 SMART II A Oligo 及 1 μL 无菌水, 70 °C 孵育 2 min, 冰上冷却 2 min; 然后加入 2 μL 的 5 × 第一链缓冲液、1 μL 的 DTT (20 mmol/L)、1 μL 的 dNTP (10 mmol/L) 及 1 μL 的 MMLV 反转录酶, 42 °C 反应 1.5 h 后, 加 100 μL 的 tricine-EDTA 缓冲液, 72 °C 下再反应 7 min。

根据上述获得的海带雄配子体 CA 基因 F₁ 片段的 cDNA 序列设计特异性引物 GSP1、GSP1'、GSP2 (表 1), 按照 BD AdvantageTM 2 PCR 试剂盒 (Clontech 公司) 操作步骤进行 PCR 扩增。3'-RACE 的 25 μL 反应体系包括 16.5 μL 的 H₂O、2.5 μL 的 10 × Advantage 2 PCR 缓冲液、2.5 μL 的 10 × UPM、2 μL 的 3'-RACE cDNA、0.5 μL 的 GSP2 (10 μmol/L)、0.5 μL 的 dNTP (10 mmol/L) 及 0.5 μL 的 50 × Advantage 2

polymerase Mix。PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 3 min;37 个循环包括 94 ℃ 变性 30 s、68 ℃ 退火 1 min、72 ℃ 延伸 2 min;最后 72 ℃ 延伸 7 min。5'-RACE 第一轮的反应体系包含 18.5 μL 的 H₂O、2.5 μL 的 10 × Advantage 2 PCR 缓冲液、0.5 μL 的 10 × UPM、2 μL 的 5'-RACE cDNA、0.5 μL 的 GSP1 (10 μmol/L)、0.5 μL 的 dNTP (10 mmol/L) 及 0.5 μL 的 50 × Advantage 2 polymerase Mix。经过 20 个循环,包括 94 ℃ 变性 30 s、68 ℃ 退火 30 s 及 72 ℃ 延伸 2 min,得到的产物直接取出 1 μL 作为巢式 PCR 的模板,以 NUP 和 GSP1' (表 1)作为上、下游进行第二轮 PCR 扩增,反应条件为 30 个循环包括 94 ℃ 变性 30 s、65 ℃ 退火

1 min 及 72 ℃ 延伸 2 min。按上述方法对 PCR 扩增反应产物进行检测、纯化、连接、转化,最后通过蓝白斑筛选,并将阳性克隆送至上海桑尼生物科技有限公司测序。将得到的序列进行拼接、比对后,发现 cDNA 序列不够完整,再以得到的 cDNA 序列为基础,设计两条引物 5R-1、5R-2 (表 1),按上述扩增 5'-RACE cDNA 的方法进行巢式 PCR,对反应产物进行检测、纯化、连接、转化,最后通过蓝白斑筛选,并将阳性克隆送至上海桑尼生物科技有限公司测序。

按照上述同样的方法扩增海带雌配子体 CA 基因的 cDNA 序列。

表 1 本研究所使用的引物序列及其退火温度
Tab. 1 Sequences and annealing temperature of the primers employed in the present research

引物 primer	引物序列(5'→3') primer sequence	退火温 度/℃ <i>T_m</i>	PCR 产物大小/bp PCR amplified products
cDNA 克隆 cDNA cloning			
J1-U	GAGATCGAGCACCTGTGG	57	684
J1-D	GGTAAGGGTAAATAAACGGG		
GSP1	CGAAGAGGGCGACGGACGTACGGAA	68	—
GSP1'	TGAGAGAACACAGGGTTGGAAGGCA	65	—
GSP2	ACAGACGGTGCCACGTGGAGACAATAC	68	—
5R-1	CGTGCTCGTCCACCTTGAG	68	—
5R-2	GAACTCGTCGAGCTGCATCTTG	65	—
10 × Universal Primer A Mix (UPM)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT (long) CTAATACGACTCACTATAGGGC (short)	68	—
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	65	—
DNA 克隆 DNA cloning			
Y-U	TCTCGCCCTTTTCTCCGCT	59	
Y-D	TATGCCACTGTTTGTGCT		
5R1-U	CCCGAGCGACTGGCACAAG	60	364
5R1-D	GAACAGCACGCCACAACA		
ORF1-U	AGACGAGCGGGTGTGGGAGAT	60	569
ORF1-D	AATGCTCTCCGAACGGTTTGG		
YZ1-U	GTGGTAAGGGTAAATAAACGG	55	1 386
YZ1-D	AACATAATTAGAACGAGGACA		
荧光定量 PCR Q-RT-PCR			
D1-U	GGTCTTCACTACCCGTAT CTAC	59.6	—
D1-D	CGATCCACTTCACGCCCTCAG		
18S-U	TCGGACGGTTTGTGGTG	59.6	—
18S-D	CCTTCCTGGATGTGGTAGCC		

1.3 海带雌、雄配子体 CA 基因 DNA 序列扩增
用 CTAB 法^[24]分别从海带雌、雄配子体中提取基因组 DNA。根据 CA 基因的 cDNA 序列,设

计 5 对引物: Y-U 和 Y-D、5R1-U 和 5R1-D、ORF1-U 和 ORF1-D、J1-U 和 J1-D 以及 YZ1-U 和 YZ1-D (表 1),利用 PCR 进行 CA 基因的 DNA 序

列克隆。25 μL 反应体系包括 15.8 μL 灭菌双蒸水、2.5 μL 缓冲液、2.5 μL 的 Mg^{2+} 、上、下游引物各 0.4 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)、2 μL 的 dNTP (10 $\mu\text{mol/L}$) 及 0.4 μL 的 *rTaq* 酶。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 35 个循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、分别按表 1 中相应引物的退火温度退火 1 min 及 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。按上述方法对 PCR 扩增反应产物进行胶回收、克隆及测序。

1.4 海带配子体 CA 基因序列分析

利用 NCBI 中的 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 对获得的海带配子体 CA 基因的 cDNA 全长序列进行核酸、蛋白质、氨基酸序列同源性搜索, 并利用 expasy 中工具 ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 在线分析蛋白质氨基酸组成、分子量、等电点。利用 BioEdit^[25] 软件分析其疏水性。通过 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/> 在线预测 CA 基因的蛋白质二级与三级结构。利用 MEGA 4.0 软件^[25] 构建系统演化树。

1.5 海带配子体 CA 基因的 Southern-blotting

根据克隆得到的海带配子体 CA 基因的 ORF 序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物、检测酶切位点, 按照 North2South 生物素标记和化学发光检测试剂盒 (上海前尘生物科技有限公司) 说明书的方法和操作步骤合成探针并用生物素进行标记。探针引物为 ORF1-U、ORF1-D (表 1), 由上海生工生物有限公司合成。合成的探针大小为 569 bp, 使用前将探针进行稀释、定量和纯化。纯化的具体步骤包括: 首先, 加入 5 μL NH_4Ac 于上述 50 μL 反应离心管, 吹打均匀; 然后, 加入 110 μL 冰上预冷的无水乙醇, 充分混匀, 冰浴或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min, 离心 15 min, 观察沉淀情况, 小心吸取出上清, 风干沉淀; 其次, 用冰冷的 70% 的乙醇洗涤一次, 12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 观察沉淀情况, 小心吸取出上清, 风干沉淀; 最后, 用 50 μL TE 或无 RNase 的水溶解沉淀 (-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存)。

按上述方法提取海带配子体基因组 DNA, 按照 North2South 生物素标记和化学发光检测试剂盒说明书的方法和操作步骤进行操作。首先, 选择限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 对 DNA 进行酶切, 酶切后基因组 DNA (约 2 μg) 应用 0.8% 琼

脂糖凝胶进行电泳, 再通过碱变性、中和、转移, 将 DNA 从琼脂糖凝胶电泳转到固相支持物; 转移结束后进行洗膜, 然后进行预杂交, 再将 DNA 探针进行热变性, 变性完成后将其加入杂交液中进行杂交; 杂交结束后进行严谨洗膜; 最后进行化学发光检测并照相。

1.6 荧光定量 PCR (Q-RT-PCR)

按上述方法提取海带配子体总 RNA 并进行 cDNA 第一链的合成。在 iCycler iQ5 (Bio-Rad 公司) 上完成 Q-RT-PCR 反应。根据 CA 基因 ORF 区的序列设计一对引物 D1-U、D1-D (表 1), 以海带的 18S rRNA 基因 (GenBank 登录号: EU293553) 为管家基因, 根据其编码序列设计引物 18S-U 和 18S-D (表 1)。20 μL 反应体系包括 10.5 μL 的 SYBR ScriptTM (TaKaRa 公司)、正向引物和反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL 、上述合成的 cDNA 第一链 2 μL 。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 s 后进行 40 个循环, 包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s、59.6 $^{\circ}\text{C}$ 退火并延伸 1 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物特异性。同一个样品重复 3 个反应, 用 $2^{-\Delta C_t}$ 来表示基因的相对转录量, 其中 ΔC_t = 目标基因扩增的 C_t 值 - 内参 18S rRNA 的 C_t 值, 结果为 3 个反应的平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD)。用 *t* 检验来进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 海带雌、雄配子体 CA 基因克隆与序列特征

根据海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库中 2 个 EST 序列以及掌状海带 CA 基因序列设计一对引物 J1-U 和 J1-D (表 1), 对反转录产物进行 PCR 扩增反应, 经胶回收、克隆和测序, 获得一 684 bp 大小的产物 F_1 (图 1-a)。经过 Blastn 搜索, 发现 F_1 与掌状海带 CA 基因 ORF 的 cDNA 序列相似性高达 88%。

在 F_1 序列的基础上, 采用 RACE 方法, 经过 PCR 扩增、克隆、测序, 分别获得一条长度为 532 bp 的 5'-末端 (图 1-b) 和 1 584 bp 的 3'-末端产物 (图 1-d)。其中, 在 5'-末端的扩增产物中, 出现 4 条带, 经胶回收、克隆和测序, 确认大小为 532 bp 的片段为目的片段, 其余 3 条为杂带。由于序列不够完整, 对 5'-端进行进一步的扩增, 结果得到一条长度为 930 bp 的产物 (图 1-c), 分别将 5'-末端和 3'-末端产物与 F_1 片段的序列进行拼接, 并

经过重新设计引物、PCR 扩增与序列分析,得到一条长 2 804 bp 的 cDNA 序列(GenBank 登录号:JF827608)。其中,5'-UTR 长 166 bp,3'-UTR 长 1 765 bp 且具有明显的 polyA 尾巴,ORF 长 873 bp。

用同样的方法获得雌配子体 CA 基因的 cDNA 序列(图 1),通过 Blastn 搜索发现它与雄配子体 CA 基因的 cDNA 序列完全一致。因此可以认为雌、雄配子体 CA 基因在 cDNA 序列上没有差异。

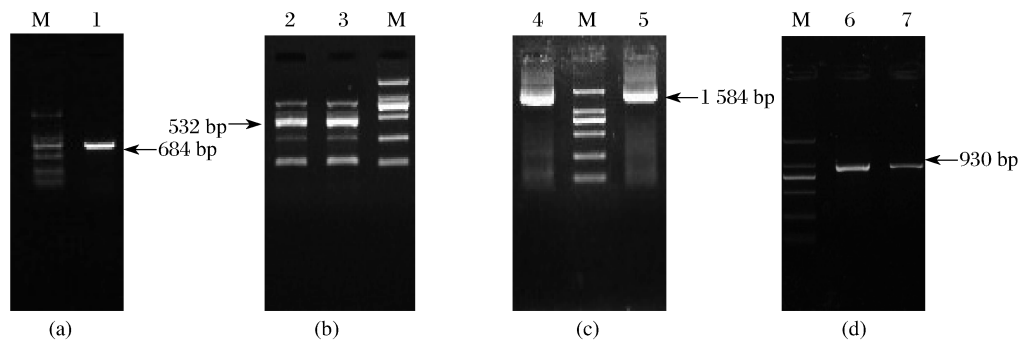


图 1 海带配子体 CA 基因全长 cDNA 序列克隆的电泳图

(a) 扩增产物 F₁ 的电泳图; (b) 第一次 5'-末端扩增产物电泳图; (c) 3'-末端扩增产物电泳图; (d) 第二次 5'-末端扩增产物电泳图; M:DL-2000 分子量标准; 1 泳道:扩增产物 F₁; 2 和 3 泳道:分别为雌、雄配子体第一次 5'-末端扩增产物; 4 和 5 泳道:分别为雌、雄配子体 3'-末端扩增产物; 6 和 7 泳道:分别为雌、雄配子体第二次 5'-末端扩增产物。

Fig. 1 Electrophoresis patterns of full-length cDNA sequence cloning of CA gene from *L. japonica* gametophytes
(a) electrophoresis patterns of amplified product of F₁, (b) 5'-end RACE of first run, (c) 3'-end RACE; M:DL-2000 marker, (d) 5'-end RACE of second run; Lane 1: amplified product of F₁; Lanes 2 and 3: amplified products of 5'-end of first run from female and male gametophytes, respectively; Lanes 4 and 5: amplified products of 3'-end from female and male gametophytes, respectively; Lanes 6 and 7: amplified products of 5'-end of second run from female and male gametophytes, respectively.

根据海带雌、雄配子体 CA 基因的 cDNA 序列设计引物,分别以雌、雄配子体基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,将得到的各片段拼接后获得长度为 2 747 bp 的 CA 基因 DNA 序列,将其与相应的 cDNA 序列进行比对,发现海带配子体 CA 基因的 DNA 序列与其相应的 cDNA 序列一致,且雌、雄配子体 CA 基因在 DNA 序列上也没有差异。因此,海带配子体 CA 基因无内含子,属于单外显子基因。

根据 CA 基因序列合成探针,与经 *EcoR* I、*Xba* I 限制性内切酶作用的海带配子体基因组 DNA 进行 Southern-blotting,化学发光检测结果发现(图 2),海带雌、雄配子体中均只出现有一条杂交信号,说明克隆到的 CA 基因是单拷贝基因。

2.2 海带配子体 CA 基因的生物信息学分析

海带配子体 CA 基因编码一个含 290 个氨基酸的前体蛋白,其分子量为 32. 53 ku,等电点为 5. 12。经 Blastp 搜索,发现该基因所编码的蛋白与掌状海带的 α-CA 基因所编码蛋白有 87% 的同源性。将 16 个 α-CA 基因的编码蛋白进行比对发现(图 3),海带配子体 CA 蛋白具有 α-CA 的显

著特征^[26-27]:它与其它 15 种 CA 蛋白具有共同的保守区,且有一个对保守区起重要作用的 Cys-231 残基,能与其它的 Cys 残基形成 - S - S - 二硫键,以稳定蛋白的空间结构,说明该 CA 蛋白具有较强的保守性;海带配子体 CA 蛋白还具有 3 个锌结合位点,即 His-139、His-141 与 His-158(图 3,以前体蛋白的氨基酸来计数的),以构成 α-CA 的催化活性中心^[28-29]。

推测的氨基酸组成结果显示,海带配子体 CA 编码蛋白富含 Gly (8. 3%)、Leu (7. 6%)、Ser (7. 2%)、Val (7. 2%)、Thr (6. 9%)、Asp (6. 6%) 等氨基酸,且疏水性氨基酸 (Gly、Val、Leu、Ala、Ile、Phe、Tyr、Trp、Pro、Met) 含量较高,约占 51%,表明该蛋白具有较强的疏水性,有利于蛋白向内部折叠形成二级结构和三级结构,保证蛋白的稳定性。

应用 SMART (<http://www.expasy.ch/SMART>) 预测 CA 蛋白的信号肽,结果与 SignalP-HMM (<http://www.expasy.ch>) 一致,表明在 20 Gly-21 Val 处有典型的信号肽酶切位点,酶切后的成熟蛋白是一个由 270 个氨基酸组成的多肽,蛋白质分子量为 30. 44 ku,等电点为 5. 06。

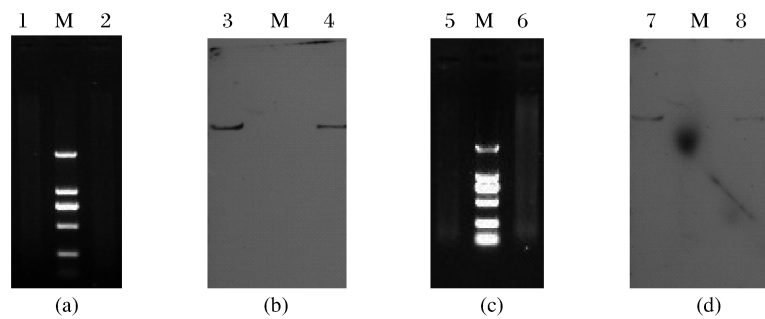


图2 海带配子体CA基因Southern-blotting

(a)和(c)分别为海带雌、雄配子体基因组DNA酶切电泳图,(b)和(d)分别为海带雌、雄配子体基因组DNA杂交图谱;M:DL-2000分子量标准;1和2泳道:分别为经EcoRI、XbaI酶切的雌配子体基因组DNA;3和4泳道:分别为经EcoRI、XbaI酶切的雌配子体基因组DNA杂交图;5和6泳道:分别经EcoRI、XbaI酶切的雄配子体基因组DNA;7和8泳道:分别经EcoRI、XbaI酶切的雄配子体基因组DNA杂交图。

Fig. 2 Southern-blotting profiles of CA gene from *L. japonica* gametophytes

Electrophoresis profiles of endonuclear digested DNA from the female(a)and male(c),respectively,gametophytes of *L. japonica*; Southern-blotting patterns on endonuclear digested DNA from the female(b)and male(d),respectively,gametophytes of *L. japonica*; M:DL-2000 marker; Lanes 1 and 2:digested DNA from the females by EcoRI and XbaI, respectively; Lanes 3 and 4:Southern blotting patterns on the digested DNA from the females by EcoRI and XbaI, respectively; Lanes 5 and 6:digested DNA from the males by EcoRI and XbaI, respectively; Lanes 7 and 8:Southern blotting patterns on the digested DNA from the males by EcoRI and XbaI, respectively.

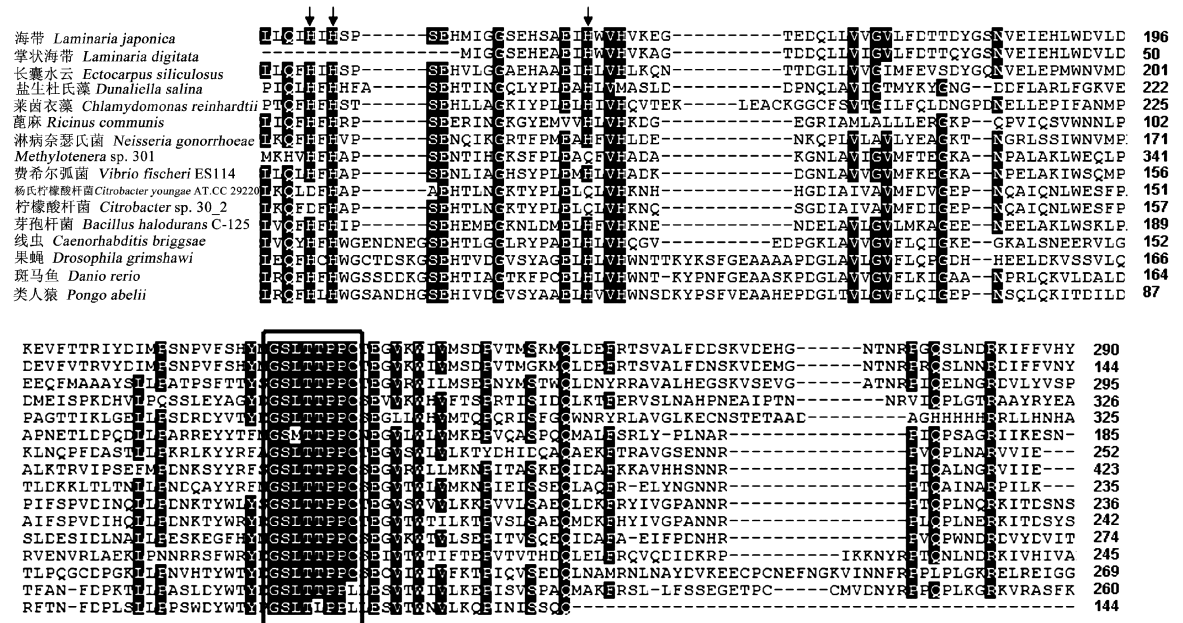


图3 α -CA基因编码蛋白的同源序列比对

每种蛋白序列用其所来源的物种拉丁名表示,它们的蛋白序列号见图5。同源性70%以上的氨基酸用完全加黑表示,锌结合位点用箭头标示, α -CA蛋白的保守区用方框标示。

Fig. 3 Alignment of CA proteins from various species containing Zn⁺-binding sites

Corresponding latin-names of each species illustrate the protein sequence,the accession numbers of the proteins are indicated in Fig. 5. Amino acids of high identities more than 70% are indicated by shaded letters,the arrows show the Zn-binding sites,the box indicates the conservative region of α -CA protein.

海带配子体CA前体蛋白二级结构预测结果显示,该蛋白可能含有6个 α -螺旋,分别位于2 Thr-19 Glu、58 Ser-63 Gly、65 Pro-67 Cys、184 ser-

195 Leu、210 Ile-213 Ile、248 Ser-260 Ala,另外可能还含有17个 β -折叠,分别位于2 Thr-7 Leu、39 Ala-41 Glu、75 Ile-77 Leu、81 Leu-85 Val、93 Lys-

94 Phe、103 Glu-108 Ala、111 Arg-117 Phe、125 His-128 Phe、132 Arg-142 Ser、147 Met-148 Ile、151 Ser-152 Glu、154 Ser-164 Glu、170 Leu-179 Thr、220 Phe-224 Met、235 Gly-241 Met、245 Val-247 Met、284 Lys-289 His。

对 CA 成熟蛋白的三级结构进行预测,结果(图 4)表明,在蛋白质核心区有 5 个明显的 α -螺旋,与 CA 前体蛋白二级结构的预测结果(除 2 Thr-19 Glu 这个位于信号肽中的外)一致,这些 α -螺旋都非常短,难以跨膜,这与 CA 蛋白的跨膜区预测结果相吻合。该 CA 成熟蛋白还含有 16 个 β -折叠,与上文中 CA 前体蛋白二级结构的预测结果(除 2 Thr-7 Leu 这个位于信号肽中的外)也一致,它们在空间上大多呈平行方向排列,可能对蛋白空间结构的稳定起着重要作用。从预测结果中还可以看出,在海带配子体 CA 蛋白核心区有 3 个明显的 His 锌结合位点(His-118、His-120 与 His-137),构成 CA 蛋白的活性中心,另外还有两对半胱氨酸(Cys-46 和 Cys-211、Cys-99 和 Cys-78)可以形成两个 -S-S-键,对稳固 CA 蛋白的

空间结构起着重要的作用。

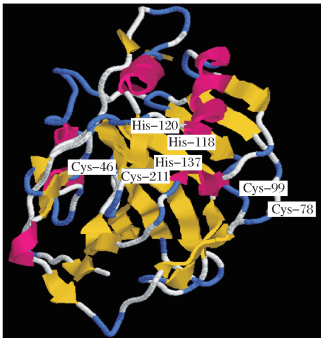


图 4 海带配子体成熟 CA 蛋白质的三级结构预测
Fig. 4 The predicted tertiary structure of the matured CA in *L. japonica* gametophytes

2.3 基于 CA 蛋白质序列构建的系统演化树

基于 36 条 CA 蛋白序列构建的 Neighbor-Joining(NJ)系统演化树(图 5)显示,它们很明显地分成 α -CA、 β -CA、 γ -CA 三支,且每支 Bootstrap 值都为 100,说明他们的进化祖先来源不同,而且是独立进化的,但是它们在进化过程中功能趋向

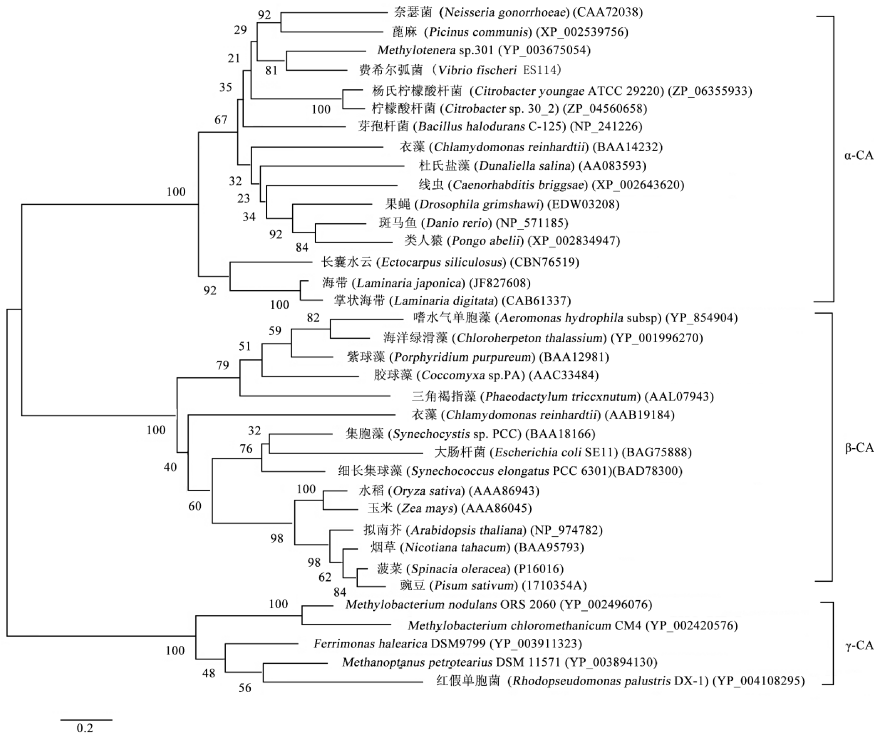


图 5 基于 CA 蛋白质的氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树
每个物种 CA 蛋白的序列号标示在拉丁名后面的括号内。
Fig. 5 Neighbour-Joining phylogenetic tree inferred from the deduced amino acid sequences of CA genes from several species
The accession numbers of the CA proteins are indicated in the parentheses after the Latin names of each species.

一致,都在 CO_2 和 HCO_3^- 的可逆转化过程中起着非常重要的作用,属于趋同进化。红假单胞菌等细菌类 CA 蛋白聚类在一起组成 γ -CA;水稻、玉米、菠菜等高等植物,衣藻、集胞藻、三角褐指藻等藻类和大肠杆菌等的 CA 蛋白聚类在一起组成 β -CA;海带配子体 CA 蛋白与掌状海带、衣藻、杜氏盐藻、一些细菌类以及动物的 CA 蛋白聚类在一起组成 α -CA,它与长囊水云、掌状海带等褐藻门藻类有着更近的亲缘关系,且与掌状海带 α -CA 蛋白的 Bootstrap 值高达 100。由此可以推测,本研究克隆的海带配子体 CA 基因也属于 α -CA。

2.4 海带配子体 CA 基因在不同碳源条件下的转录量分析

海带配子体 CA 基因的转录量,在不同碳源条件下变化比较复杂。当在连续光照、不同碳源条件下培养,海带配子体 CA 基因在 1 d 内的相对转录量结果(图 6)显示,CA 基因在雌、雄配子体中的转录量总体变化趋势相同。在仅充入过滤

空气的对照组中,CA 基因在配子体的日转录量变化均先增后减,在 16:00 时达到最大峰值。而当过滤空气中添加了 CO_2 时,CA 基因在配子体中的日转录量发生了显著性的变化,呈现逐渐增加的趋势,在 24:00 时达到最大值,并且当对同一采样时间的样品进行比较时,发现添加 CO_2 培养配子体的 CA 基因转录量较未添加的高,特别在 24:00 时差异最显著。当碳源为 NaHCO_3 时,CA 基因在配子体中的日转录量与仅充入过滤空气的对照组相似均先增后减,但它们在 08:00 时达到最大峰值。

3 讨论

自从 1933 年 MELDRUM 和 ROUGHTON 发现牛的血红细胞中存在 CA 以来,不仅在所有哺乳动物的组织和细胞类型中发现了它,而且在高等植物、原核藻类和真核藻类^[30-33]中也发现了丰富的 CA。CA 对于许多真核生物的生理过程,如呼吸作用、光合作用、离子运输、钙化作用和酸碱平衡等都是必需的^[34-37]。氨基酸序列比较和晶体结构分析表明,CA 可分为 α 类、 β 类、 γ 类等不同的类别,它们的序列之间没有显著的相似性,表现为独立进化,本研究的 NJ 进化树分析结果(图 5)也说明了这一点。 α -CA 存在于所有哺乳动物、部分藻类以及很少的细菌界原核生物中。本研究结果显示,自海带配子体中克隆的这个 CA 基因与其它不同物种之间的 α -CA 虽然在氨基酸序列上存在不同程度的差异(图 3),但是都具有 3 个共同的锌结合位点,且在保守区都有一个半胱氨酸残基,能与其他的半胱氨酸残基形成 $-S-S-$ 二硫键,以稳固蛋白的空间结构(图 3 和图 4)^[38-39]。再结合 NJ 树的分析结果(图 5),我们推测海带配子体这个 CA 基因应属于 α -型。

本研究通过探讨海带配子体 CA 基因表达量在不同碳源条件下的日变化情况,对该基因的结构与功能做了进一步的了解。CA 是一种诱导酶,一般情况下,在高浓度 CO_2 环境条件下,细胞的胞外 CA 活性常受到抑制,胞外 CA 基因转录水平也会随着 CO_2 浓度的增加而降低^[40]。由荧光定量 PCR 的研究结果(图 6)可以看出,本研究克隆得到的海带配子体 CA 基因的日表达量,在增加 CO_2 量的培养条件下较没有增加 CO_2 培养的高(图 6),这与胞外 CA 基因的转录量变化趋势相反。因此,我们认为海带配子体这个 CA 基因所

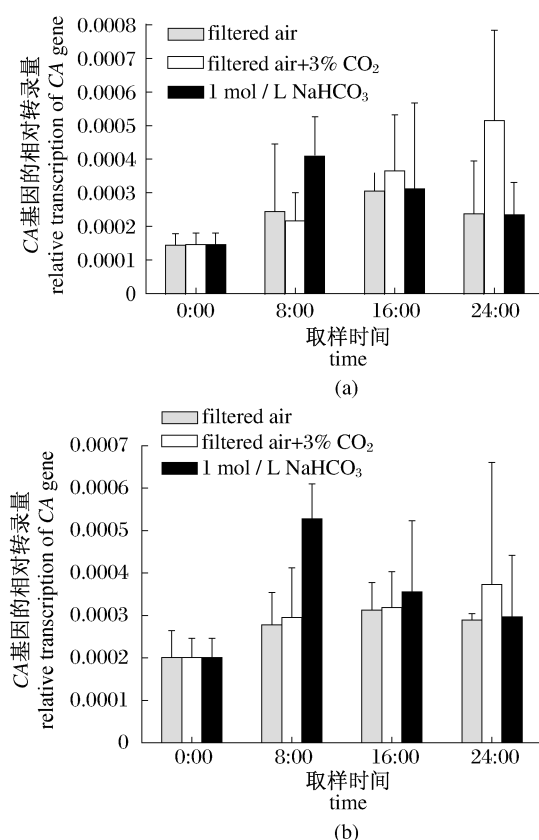


图 6 不同碳源条件下,CA 基因在海带雌(a)、雄(b)配子体中的日转录图谱

Fig. 6 Diurnal transcription pattern of CA gene from *L. japonica* female (a) and male (b) gametophytes grown under different carbon sources

编码蛋白不属于胞外 CA。

研究证实^[11,18,26],高等植物与藻类细胞内 CA 主要包括细胞质 CA、叶绿体 CA 和线粒体 CA 这 3 种类型,其中,线粒体 CA 几乎都是 β -CA^[41],而序列特征及系统演化树(图 5)都表明海带配子体 CA 基因属于 α -型,因此认为它不属于线粒体 CA。本研究还发现,海带配子体这个 CA 蛋白有一个典型的信号肽酶切位点,据此可以推测该基因不属于细胞质 CA。所以,该 CA 基因应该属于叶绿体 CA。

海带的叶绿体结构比较特殊,除了具有和大多数植物一样的两层膜以外,外层还被内质网膜所包裹,共具有四层膜结构^[42]。然而海带配子体 CA 蛋白仅具有一个信号肽,缺乏转运肽,只能跨过内质网膜。因此,推测海带配子体这个 CA 蛋白为叶绿体膜结合蛋白,而且它主要结合在叶绿体外膜上^[43-44],以泵的方式给叶绿体光合作用提供充足的 CO₂^[45-46]。但有关其具体定位还要通过免疫荧光、胶体金等细胞定位方式以进一步确定。

参考文献:

- [1] KAPLAN A, REINHOLD L. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, 50: 539–570.
- [2] RAVEN J A. Photosynthetic and non-photosynthetic roles of carbonic anhydrase in algae and cyanobacteria [J]. Phycologia, 1995, 34(2): 93–101.
- [3] 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]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(10): 4437–4441.
- [4] SMITH K S, JAKUBZICK C, WHITTAM T S, et al. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme wide spread in prokaryotes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(26): 15184–15189.
- [5] ZHANG Q, LI Z, ZHOU G, et al. Immunosuppressive activities of fucoidan from *Laminaria japonica* [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2003, 21(4): 324–328.
- [6] BARTSCH I, WIENCKE C, BISCHOF K, et al. The genus *Laminaria sensu lato*: recent insights and developments [J]. European Journal of Phycology, 2008, 43(1): 1–86.
- [7] TRIPP B C, SMITH K, FERRY J G. Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(52): 48615–48618.
- [8] NIMER N A, IGLESIAS-RODRIGUEZ M D, MERRETT M J. Bicarbonate utilization by marine phytoplankton species [J]. Journal of Phycology, 1997, 33(4): 625–631.
- [9] 曲建升, 孙成权, 张志强. 全球变化科学中的碳循环研究进展与趋向 [J]. 地球科学进展, 2003, 18(6): 980–987.
- [10] COLEMAN J R. The molecular and biochemical analyses of CO₂-concentrating mechanisms in cyanobacteria and microalgae [J]. Plant, Cell and Environment, 1991, 14(8): 861–867.
- [11] MORONEY J V, BARTLETT S G, SAMUELSSON G. Carbonic anhydrases in plants and algae [J]. Plant, Cell and Environment, 2001, 24(2): 141–153.
- [12] THOMS S, PAHLOW M, WOLF-GLADROW D A. Model of the carbon concentrating mechanism in chloroplasts of eukaryotic algae [J]. Journal of Theoretical Biology, 2001, 208(3): 295–313.
- [13] ROBERTS K, GRANUM E, LEEGOOD R C, et al. Carbon acquisition by diatoms [J]. Photosynthesis Research, 2007, 93(1–3): 79–88.
- [14] SPALDING M H. Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms: *Chlamydomonas* inorganic carbon transporters [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(7): 1463–1473.
- [15] AXELSSON J, MERCADO J M, FIGUEROA F L. Utilization of HCO₃⁻ at high pH by the brown macroalga *Laminaria saccharina* [J]. European Journal of Phycology, 2000, 35(1): 53–59.
- [16] SCHMID R, MILLS J A, DRING M J. Influence of carbon supply on the stimulation of light-saturated photosynthesis by blue light in *Laminaria saccharina*: implications for the mechanism of carbon acquisition in higher brown algae [J]. Plant, Cell and Environment, 1996, 19(4): 383–391.
- [17] DRING M J, FORSTER R M, SCHMID R. Ecological significance of blue light stimulation of photosynthetic capacity in *Laminaria* spp. and other brown algae [J]. Marine Ecology Progress Series, 1994, 113(3): 271–277.
- [18] MOULIN P, CRÉPINEAU F, KLOAREG B, et al. Isolation and characterization of six cDNAs involved in carbon metabolism in *Laminaria digitata*

- (Phaeophyceae) [J]. Journal of Phycology, 1999, 35 (6): 1237–1245.
- [19] 史西志, 毕燕会, 周志刚. 海带雄性配子体差异表达基因片段的克隆及筛选[J]. 水产学报, 2005, 29 (5): 666–669.
- [20] 陆广琴, 欧阳珑玲, 周志刚. 海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库的生物信息学分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(2): 221–229.
- [21] 周志刚, 吴超元. 海带无性繁殖系的形成及孢子体诱导[J]. 生物工程学报, 1998, 14(1): 109–111.
- [22] 曾呈奎, 吴超元. 海带养殖学[M]. 北京: 科学出版社, 1962.
- [23] 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(suppl.): 1-106.
- [24] RICHARDS E, REICHARDT M, ROGERS S. Preparation of genomic DNA from plant tissue[M] // AUSUBEL F M, BRENT R, KINGSTON R, et al. Current protocols in molecular biology, New York: John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [25] SHRESTHA S, NYAKU M, EDBERG J C. Variations in CCL3L gene cluster sequence and non-specific gene copy numbers [J]. BMC Research Notes, 2010, 3: 74.
- [26] HEWETT-EMMETT D, TASHIAN R E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1996, 5(1): 50–77.
- [27] PREMKUMAR L, BAGESHWAR U K, GOKHMAN I, et al. An unusual halotolerant α -type carbonic anhydrase from the alga *Dunaliella salina* functionally expressed in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2003, 28(1): 151–157.
- [28] FUKUZAWA H, FUJIWARA S, YAMAMOTO Y, et al. cDNA cloning, sequence, and expression of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*; regulation by environmental CO₂ concentration [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87 (11): 4383–4387.
- [29] FUJIWARA S, FUKUZAWA H, TACHIKI A, et al. Structure and differential expression of two genes encoding carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87 (24): 9779–9783.
- [30] SMITH K S, FERRY J G. Prokaryotic carbonic anhydrases [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(4): 335–366.
- [31] VEITCH F P, BLANKENSHIP L C. Carbonic anhydrase in bacteria [J]. Nature, 1963, 197 (1): 76–77.
- [32] 李为, 余龙江, 徐辉碧. 原核生物的碳酸酐酶[J]. 生命的化学, 2002, 22(6): 526–529.
- [33] YU S, XIA D, LUO Q, et al. Purification and characterization of carbonic anhydrase of rice (*Oryza sativa* L.) expressed in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2007, 52(2): 379–383.
- [34] WANG X, QIU H, CAI Z, et al. The research on the adsorption effect on metal ions by immobilized marine algae [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 25 (2): 153–158.
- [35] SKIRROW G, RILEY J P. The dissolved gases-carbon dioxide in chemical oceanography [M]. London: Academic Press, 1965.
- [36] MORONEY J V, HUSIC H D, TOLBERT N E. Effect of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Physiology, 1985, 79(1): 177–183.
- [37] BAILLY J, COLEMAN J R. Effect of CO₂ concentration on protein biosynthesis and carbonic anhydrase expression in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Physiology, 1988, 87(4): 833–840.
- [38] QIAN A, WANG X, DENG Y, et al. Heavy metal biosorption sites studies of *Laminaria japonica* [J]. Marine Science Bulletin, 2005, 7(1): 87–91.
- [39] PREMKUMAR L, GREENBLATT H M, BAGESHWAR U K, et al. Three-dimensional structure of a halotolerant algal carbonic anhydrase predicts halotolerance of a mammalian homolog [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(21): 7493–7498.
- [40] XIA J R, GAO K S. Impacts of elevated CO₂ concentration on biochemical composition, carbonic anhydrase, and nitrate reductase activity of freshwater green algae [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2005, 47(6): 668–675.
- [41] FABRE N, REITER I M, BECUWE-LINKA N, et al. Characterization and expression analysis of genes encoding α and β carbonic anhydrases in *Arabidopsis* [J]. Plant, Cell and Environment, 2007, 30(5): 617–629.
- [42] BOUCK G B. Fine structure and organelle associations in brown algae [J]. Journal of Cell

- Biology, 1965, 26(2): 523–537.
- [43] ATKINS C, SMITH P, MANN A, *et al.* Localization of carbonic anhydrase in legume nodules [J]. Plant, Cell and Environment, 2001, 24(3): 317–326.
- [44] NEWMAN J R, RAVEN J A. Carbonic anhydrase in *Ranunculus penicillatus* spp. *pseudofluitans*: activity, location and implications for carbon assimilation [J]. Plant, Cell and Environment, 1993, 16(5): 491–500.
- [45] KLENELL M, SNOEIJIS P, PEDERSÉN M. The involvement of a plasma membrane H^+ -ATPase in the blue-light enhancement of photosynthesis in *Laminaria digitata* (Phaeophyta) [J]. Journal of Phycology, 2002, 38(6): 1143–1149.
- [46] KLENELL M, SNOEIJIS P, PEDERSÉN M. Active carbon uptake in *Laminaria digitata* and *L. saccharina* (Phaeophyta) is driven by a proton pump in the plasma membrane [J]. Hydrobiologia, 2004, 514(1–3): 41–53.

Cloning and characterization of carbonic anhydrase (CA) gene from *Laminaria japonica* gametophytes

YU Zhen^{1,2}, BI Yan-hui^{1,2}, ZHOU Zhi-gang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: A suppressive subtracted cDNA library from the male gametophyte of *Laminaria japonica* was constructed and two 376 bp expressed sequence tags (ESTs) were screened from this library as a carbonic anhydrase gene due to their 70% identity to *Laminaria digitata* (GenBank accession number: AJ130777). Combined with the sequences of the ESTs and the conserved region of *L. digitata*, primers were designed to get part of sequences of the open reading frame (ORF) of CA gene from *L. japonica*. Based upon this obtained sequence, we designed gene-specific primers and cloned a full length cDNA (GenBank accession number: JF827608) of CA from *L. japonica* by use of rapid amplification of cDNA ends (RACE). It was composed of 2 804 bp in length, which included 166 bp 5'-untranslated region (UTR), 1 765 bp 3'-UTR with a poly-A tail at its end and 873 bp ORF. The deduced precursor protein of *L. japonica* CA consisted of 290 amino acids, which possessed a typical signal peptide cleavage site between 20 Gly and 21 Val. The mature protein after digestion was composed of 270 amino acids, which contained a catalytic active center constituted by 3 His residues and atomic Zn. The molecular weight of the mature protein after digestion was 30.44 ku, and its *pI* was at 5.06. There was no difference in the sequences of CA gene either from female or from male gametophytes, and there is no intron to separate this gene. Southern-blotting analysis suggested that the CA gene had one single copy. Its homology with α -CA of *L. digitata* reached 87% in peptide sequence. Neighbor-Joining (NJ) phylogenetic tree inferred from 36 CA protein sequences showed that this cloned CA gene from *L. japonica* was clustered with other α -CAs, suggesting that it might be α -type and it couldn't be localized in mitochondria. Quantitative real time PCR (Q-RT-PCR) result demonstrated that the diurnal transcripts of this CA gene in the kelp gametophytes cultured under the addition of CO_2 were higher than those cultured only by agitation with filtered air at any sampling time, thus illustrating that this CA might not be extracellular. The CA might be localized on the outer envelope of chloroplasts, therefore, due to the only one signal peptide it possessed, and it could pump the chloroplasts with sufficient CO_2 for photosynthesis.

Key words: *Laminaria japonica*; gametophyte; CA gene; gene cloning; quantitative real-time RCR

Corresponding author: ZHOU Zhi-gang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn