

盐度和无机碳对蛋白核小球藻生长、胞外碳酸酐酶活性及其基因表达的影响

王玮蔚^{1,2}, 孙 雪^{1,2*}, 王冬梅^{1,2}, 沈 佳^{1,2}, 徐年军^{1,2}

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要:为探讨小球藻中碳酸酐酶对环境调控的响应规律,提高小球藻的生物量及对无机碳的利用,实验采用生化和荧光定量 PCR 方法研究了盐度和 2 种无机碳对蛋白核小球藻生长、胞外碳酸酐酶(CA)活性及 3 种亚型碳酸酐酶基因(*ca*)表达的影响。结果发现,培养至第 9 天时盐度 15 和 30 培养藻生长较快,盐度 45 藻细胞密度降为盐度 15 的 0.83 倍;CA 活性随着盐度增加而降低,盐度 45 长时间处理酶活性降低更为明显,3 种亚型 *ca* 基因表达量则随盐度升高而增加。2 倍空气 CO₂ 浓度培养藻密度可达空气 CO₂ 浓度的 1.23 倍,但 CA 活性较低,第 8 天为空气 CO₂ 浓度组的 0.41 倍, α -*ca* 和 γ -*ca* 基因表达量比空气 CO₂ 浓度组略有升高。在 0~10 mmol/L HCO₃⁻ 条件下,蛋白核小球藻随 HCO₃⁻ 含量升高生长加快,CA 活性在 5 mmol/L HCO₃⁻ 最高,而 3 种亚型 *ca* 基因表达量在 1 mmol/L HCO₃⁻ 处理组最高。研究表明,蛋白核小球藻生长比较适合中低盐度、2 倍空气 CO₂ 浓度和高 HCO₃⁻ 处理,其 CA 活性可被低盐、空气 CO₂ 浓度和 5 mmol/L HCO₃⁻ 所诱导,而 *ca* 基因表达在高盐、2 倍空气 CO₂ 浓度和低 HCO₃⁻ 条件下较高。

关键词:蛋白核小球藻;盐度;CO₂;碳酸酐酶;*ca* 基因

中图分类号:S 917.3

文献标志码:A

海洋微藻的光合固碳量约占全球总光合固碳量的 50%,是海洋碳循环系统中的重要组成部分^[1]。海水 pH 值大约为 8.1~8.4^[2],其中的无机碳存在形式以碳酸氢根(HCO₃⁻)为主,CO₂ 浓度较低,但很多藻类均能在低 CO₂ 环境中获得较高的光合作用速率,其主要原因是微藻细胞内存在 CO₂ 浓缩机制(carbon dioxide concentrating mechanism, CCM)。CCM 即通过活性无机碳(Ci)摄取系统,升高胞内 Ci 水平,利用各亚型碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)将其转化成 CO₂,为光合固碳酶 Rubisco 的羧化反应提供足够的 CO₂ 底物。

尽管真核藻类和原核蓝藻的 CCM 组成不同^[3-4],但碳酸酐酶都是两者的重要组成部分。CA 的基本功能是参与 CO₂ 的水化作用,催化 CO₂

与 HCO₃⁻ 之间的相互转换,其转换数高达 10⁶,是已知金属酶中催化效率最高的酶之一^[5]。藻类中存在多种类型 CA,根据其一级结构的不同,CA 可被分为 α -CA、 β -CA、 γ -CA、 δ -CA、 ϵ -CA 和 ζ -CA 等 6 种类型,有研究认为它们来自不同的进化途径^[6-7]。CA 活性受多种环境因素调控,其中 CO₂ 水平在调节 CA 活性中发挥着重要作用^[8-9]。HCO₃⁻ 是影响藻类 CA 活性的另一种无机碳^[10],而盐度变化对 CA 活性也有重要影响^[11-12]。此外,N/P、pH 以及 Zn²⁺ 等也是影响藻类 CA 活性的重要环境因素^[13-15]。

真核藻类中对碳酸酐酶研究最多的是模式绿藻——莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)。

收稿日期:2013-11-26 修回日期:2014-05-08

资助项目:浙江省自然科学基金(LY13D060007);浙江省科技创新团队(2010R50025-25)

通信作者:孙 雪,E-mail:sunxue@nbu.edu.cn

现已发现莱茵衣藻中存在 12 种 *ca* 编码基因,包括 3 条 α -*ca*、6 条 β -*ca* 和 3 条 γ -*ca* 基因^[16]。另外,关于莱茵衣藻 CA 活性的环境因素调控、胞外 CA 定位等也有报道^[17-18]。

小球藻属 (*Chlorella*) 是绿藻门 (Chlorophyta) 的一类重要经济微藻,易培养、生长快、光合效率高,是光合作用研究的好材料。关于小球藻 CCM 的研究也逐渐增多,如 CA 活性与环境因素的关系和 CA 酶鉴定等^[19-22]。本研究选取蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 为实验材料,研究盐度和 2 种无机碳——CO₂ 和 HCO₃⁻ 对其生长、胞外 CA 活性及其转录水平的影响,并探讨对小球藻中 CA 的环境调控,以期为提高小球藻无机碳的利用、固碳效率和生物量等提供资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

蛋白核小球藻 820 海水株,由宁波大学海洋生物工程重点实验室藻种室提供。培养温度为 25 °C,光照强度约为 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗周期为 12L:12D,使用 f/2 人工海水培养基^[23] 培养。

1.2 实验设计

盐度 (15、30 和 45) 设置用盐度计和添加 NaCl 来调节。HCO₃⁻ 浓度设置通过加入不同 NaHCO₃ 来实现,其终浓度依次为 1、2、5 和 10 mmol/L,以未加 NaHCO₃ 作为对照。CO₂ 浓度设置利用 CO₂ 光照培养箱来控制,未开启 CO₂ 通气阀时,箱内 CO₂ 浓度为空气 CO₂ 浓度,显示值为 0.043%;开启 CO₂ 通气阀来调节培养箱内的 CO₂ 浓度为 0.086%,即 2 倍空气 CO₂ 浓度。

1.3 生长测定

先从固体培养平板中将藻转接到相应盐度或无机碳浓度的培养基中培养 7 d,再按照 20% 的比例转接到盛有 300 mL 新鲜培养基的 500 mL 锥形瓶中培养。每天固定时间取样,连续 9 d 测定藻液在 440 nm 波长下的吸光度,再根据公式 $Y = 15.528\text{OD}_{440} - 0.9178$ ($R^2 = 0.9960$) 计算藻细胞密度。每种处理 3 个重复,结果取其平均值,绘制生长曲线。

1.4 胞外碳酸酐酶活性测定

根据 Wilbur-Anderson 方法^[24] 用 pH 电极法

测定碳酸酐酶活性,并稍有改进。4 °C 条件下,8 000 r/min 离心 10 min 收集 10 mL 藻液,弃去上清,使用 4 °C 预冷的 20 mmol/L 巴比妥缓冲液 (pH 8.4) 2 mL 洗涤藻细胞 1 次,8 000 r/min 离心 10 min 后再使用 2 mL 巴比妥缓冲液悬浮藻细胞。迅速向悬浮藻液中加入 1 mL 0 °C 饱和 CO₂ 的蒸馏水 (向 0 °C 蒸馏水中持续充入 CO₂ 气体约 1 h),用 pH 计监测反应体系 pH 值的变化,记录 pH 值下降 1 个单位所需的时间。根据 CA 活性 (U) 计算公式: $U = 10 \times (T_0/T - 1)$ 来计算胞外 CA 活性,其中 T_0 和 T 分别为反应体系中未加藻和加入藻细胞悬浮液时 pH 值下降 1 个单位所需的时间。从第 3 天到第 8 天,每天固定时间取样,每种处理 3 个重复,结果取其平均值。

1.5 荧光定量 PCR 检测碳酸酐酶基因表达

引物设计 根据该小球藻转录组测序得到的 *ca* 基因序列 (尚未发布),利用 Primer Premier 5.0 软件设计荧光定量 PCR 引物 (表 1),引物合成与 DNA 测序由上海英潍捷基贸易有限公司完成。以蛋白核小球藻 18S rDNA 作为内参基因^[25]。

基因定量表达 分别离心收集不同盐度或无机碳浓度处理 12 h 的藻细胞,用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 提取其总 RNA,利用 Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 大连) 反转录成 cDNA 后用作实时荧光定量 PCR 的模板。实时荧光定量 PCR (SYBR Premix Ex Taq II, TaKaRa, 大连) 扩增程序为 95 °C 预变性 2 min;接着 95 °C 15 s,58 °C 15 s,72 °C 20 s 进行 40 个循环;用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 *ca* 基因的相对表达量^[26]。

表 1 碳酸酐酶基因荧光定量 PCR 引物

Tab.1 The primers of carbonic anhydrase genes for real-time quantitative PCR

<i>ca</i> 基因 <i>ca</i> gene	CA 亚型 CA subtype	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')
unigene13488	α -CA	CCCCTCAAGCCGCTCCAGTT
		GACGCCAAACACCGCCAAGC
unigene11800	β -CA	GTCACCAATGGCAAGTCC
		TTCACCGAGATGAGCAAC
unigene8070	γ -CA	GGCGGTGCGGATTGAACAGT
		CGGCAACGTGCAGCTAGGGA

1.6 数据处理

数据均采用 Excel 软件作图,用 SPSS 19.0 软件进行数据差异显著性分析,其中 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 盐度对蛋白核小球藻生长、胞外碳酸酐酶活性及基因表达的影响

盐度 15 ~ 45,蛋白核小球藻 820 均可以生长。其中,盐度 15 和 30 培养藻生长较快,并且两者的生长曲线大致重合,而盐度 45 对藻细胞的生长具有一定的抑制作用。如在第 9 天,盐度 30 和 45 藻细胞密度分别是盐度 15 的 0.97 倍和 0.83 倍(图 1)。可见,盐度 15 和 30 更加适合蛋白核小球藻 820 的生长。

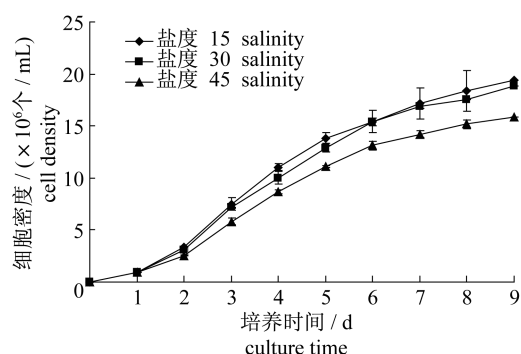


图 1 盐度对蛋白核小球藻 820 生长的影响

Fig. 1 The effect of salinity on the growth of *C. pyrenoidosa* 820

盐度是影响藻类 CA 活性的一个重要因素。从培养的第 3 天到第 8 天,CA 活性随培养时间的延长先升高后下降(图 2)。在第 5 天,盐度 30 和 45 培养藻 CA 活性最高,分别为 82.89 U/10⁹细胞和 22.13 U/10⁹细胞。而盐度 15 培养藻在第 6 天 CA 活性最高,为 94.86 U/10⁹细胞,并且随着盐度升高 CA 活性逐渐降低。在第 5 天,盐度 30 和 45 藻 CA 活性分别是 15 盐度的 0.93 倍和 0.24 倍;到第 8 天,盐度 30 和 45 藻 CA 活性分别是盐度 15 藻细胞 CA 活性的 0.64 倍和 0.04 倍。可见,随着培养时间的延长,盐度 45 对蛋白核小球藻 CA 活性的抑制作用越来越明显。统计学分析结果表明,除第 5 天的盐度 15 和 30 组之外,其余各组的 CA 活性均差异显著($P < 0.05$)。

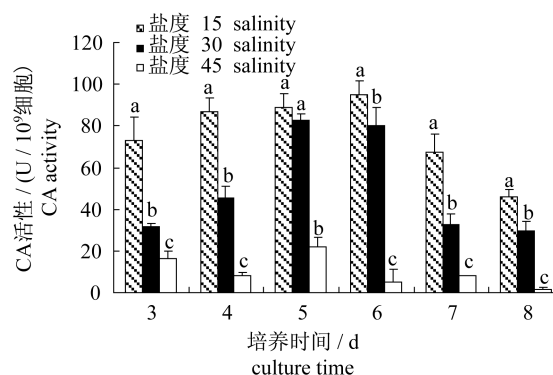


图 2 盐度对蛋白核小球藻 820 碳酸酐酶活性的影响
图中 a、b、c 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下图注释同此

Fig. 2 The effect of salinity on the CA activity of *C. pyrenoidosa* 820

Bars with different letters (a, b, c) indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as the following

3 种亚型 *ca* 基因的表达水平也受盐度影响,从盐度 15 ~ 45,随着盐度增加大多数 *ca* 表达量增加(图 3)。将盐度 15 组 α -*ca* 基因表达量作为 1,盐度 30 和 45 组的 α -*ca* 表达量分别是其 1.60 倍和 1.90 倍;盐度 30 和 45 组 β -*ca* 表达量分别是盐度 15 组 β -*ca* 表达量的 1.64 倍和 1.57 倍;而盐度 30 和 45 组 γ -*ca* 表达量分别是盐度 15 组 γ -*ca* 表达量的 2.07 倍和 2.16 倍。3 种亚型 *ca* 的转录表达均受盐度诱导,且盐度对 *ca* 转录水平的影响差异显著($P < 0.05$)。

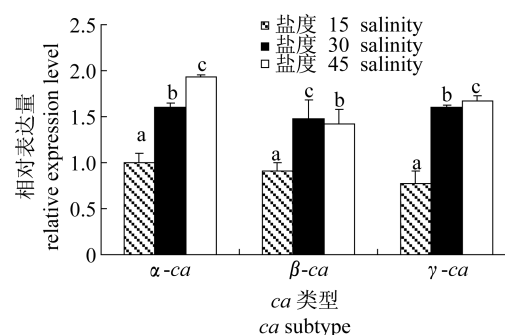


图 3 盐度对蛋白核小球藻 820 碳酸酐酶基因表达的影响

Fig. 3 The effect of salinity on the *ca* expression of *C. pyrenoidosa* 820

2.2 CO₂对蛋白核小球藻生长、胞外碳酸酐酶活性及基因表达的影响

空气中 CO₂ 浓度也是影响藻类生长的重要因素。蛋白核小球藻 820 在 2 倍空气 CO₂ 浓度条件下比在空气 CO₂ 浓度条件下生长得更快(图 4)。

到第 9 天,2 倍空气 CO_2 培养藻细胞密度是空气 CO_2 条件下培养的 1.23 倍,表明在一定范围内,高 CO_2 水平更有利于蛋白核小球藻的生长。

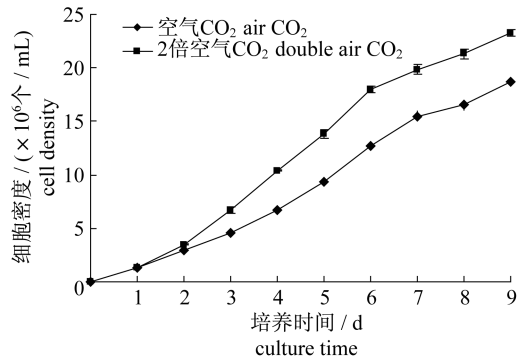


图 4 CO_2 对蛋白核小球藻 820 生长的影响

Fig. 4 The effect of CO_2 on the growth of *C. pyrenoidosa* 820

CO_2 浓度是影响藻类 CA 活性的重要因素,在空气 CO_2 培养的蛋白核小球藻胞外碳酸酐酶活性随培养时间的延长先升高再降低,在第 4 天藻细胞的 CA 活性最高(37.68 U/ 10^9 细胞);而 2 倍空气 CO_2 培养的 CA 活性随着培养时间增长变化不大(图 5)。但是,2 种不同 CO_2 浓度对蛋白核小球藻 CA 活性影响差异极显著($P < 0.01$)。从第 3 天到第 8 天,2 倍空气 CO_2 培养藻的 CA 活性为空气 CO_2 培养的 0.15 ~ 0.41 倍,说明胞外 CA 活性可被较高浓度 CO_2 所抑制。

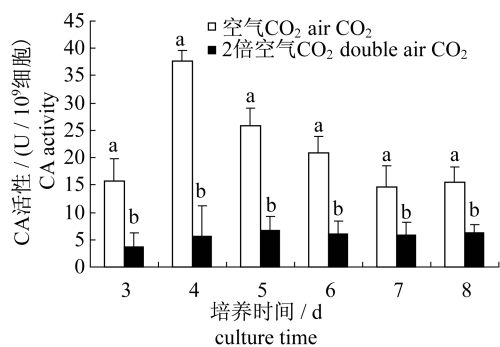


图 5 CO_2 对蛋白核小球藻 820 碳酸酐酶活性的影响

不同字母表示差异极显著($P < 0.01$),以下注释同此

Fig. 5 The effect of CO_2 on the CA activity of *C. pyrenoidosa* 820

Bars with different letters indicate very significant difference ($P < 0.01$), the same as the following

CO_2 浓度对碳酸酐酶基因表达水平也有影响。与 CA 活性变化规律不同,2 倍空气 CO_2 培养

藻的 3 种亚型 *ca* 基因的表达量都比空气 CO_2 高(图 6)。其中,前者的 α -、 β -、 γ -*ca* 表达量分别是后者的 1.22 倍、1.09 倍和 1.47 倍。除了 β -*ca* 之外,2 种 CO_2 浓度对 α -*ca* 和 γ -*ca* 表达量的影响差异显著($P < 0.05$)。可见,较高浓度 CO_2 有利于蛋白核小球藻 α -*ca* 和 γ -*ca* 转录水平的表达。

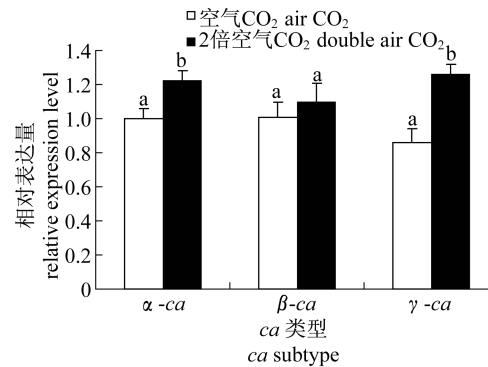


图 6 CO_2 对蛋白核小球藻 820 碳酸酐酶基因表达的影响

Fig. 6 The effect of different CO_2 on the *ca* expression of *C. pyrenoidosa* 820

2.3 HCO_3^- 对蛋白核小球藻生长、胞外碳酸酐酶活性及基因表达的影响

碳酸氢盐是影响藻类生长的重要无机盐,它的添加可以促进蛋白核小球藻的生长(图 7)。从第 2 天开始,不同 HCO_3^- 浓度对藻生长的影响差异越来越明显。随着 HCO_3^- 浓度的增加,小球藻生长逐渐加快。在第 9 天,1、2、5 和 10 mmol/L HCO_3^- 组的藻细胞密度分别是对照组的 1.24 倍、1.33 倍、1.38 倍和 1.55 倍。结果表明,在 0 ~ 10 mmol/L HCO_3^- 范围内, HCO_3^- 浓度与藻的生长呈正相关性。

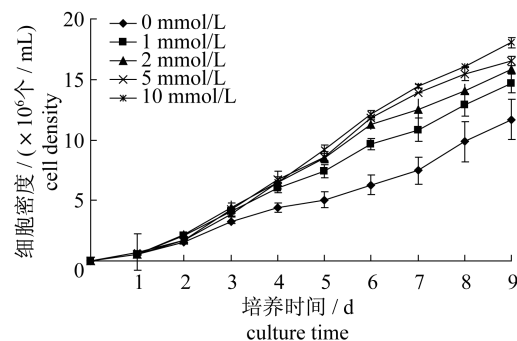


图 7 HCO_3^- 对蛋白核小球藻 820 生长的影响

Fig. 7 The effect of HCO_3^- on the growth of *C. pyrenoidosa* 820

碳酸氢盐也是影响藻类碳酸酐酶活性的一种无机碳因素。与盐度、 CO_2 对CA活性影响的时间变化类似,碳酸酐酶活性随着培养时间的增加也表现了先升再降的趋势(图8)。在第5天,各碳酸氢盐浓度组培养藻的CA活性最高,其中2和5 mmol/L HCO_3^- 组的酶活性分别为122.08和180.50 U/ 10^9 细胞。在1~5 mmol/L HCO_3^- 范围内,小球藻胞外碳酸酐酶活性基本随 HCO_3^- 浓度的升高而升高;当 HCO_3^- 浓度达到10 mmol/L时,碳酸酐酶活性开始下降。即5 mmol/L HCO_3^- 培养藻的CA活性最高,并且与其他 HCO_3^- 浓度组之间差异显著($P < 0.05$)。

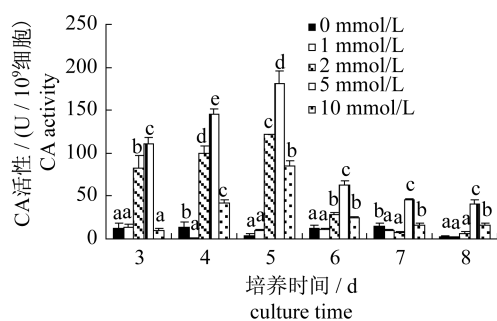


图8 HCO_3^- 对蛋白核小球藻820碳酸酐酶活性的影响

Fig. 8 The effect of HCO_3^- on the CA activity of *C. pyrenoidosa* 820

加入不同浓度 HCO_3^- 的3种亚型ca的转录表达量均高于对照,其中1 mmol/L HCO_3^- 组最高,其次为10 mmol/L HCO_3^- 组(图9)。相对于 β -ca和 γ -ca, α -ca表达变化最小,其最高表达量

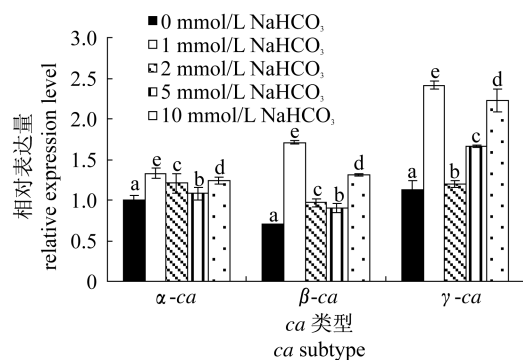


图9 HCO_3^- 对蛋白核小球藻820碳酸酐酶基因表达的影响

Fig. 9 The effect of HCO_3^- on the ca expression of *C. pyrenoidosa* 820

(1 mmol/L HCO_3^- 组)是对照组的1.33倍。 β -ca基因表达变化最高的2组(1和10 mmol/L HCO_3^- 组)的表达量分别是对照组的2.44倍和1.87倍。而 γ -ca基因表达变化最高的2组(1和10 mmol/L HCO_3^- 组)的表达量分别是对照组的2.13倍和1.97倍。统计学分析结果表明,5种 HCO_3^- 浓度组ca表达量均差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 盐度对微藻生长及碳酸酐酶的影响

盐度是影响微藻生长的重要因子,不同微藻都有其适宜生长的盐度范围,盐度过高或过低都不利于微藻的快速生长^[27]。即使是极端耐盐的杜氏藻(*Dunaliella salina*)仍然有其适宜的盐度范围^[28]。本研究结果表明,尽管高盐度对藻生长具有一定的抑制作用,但该蛋白核小球藻在盐度15~45范围内均可以快速生长,说明它的适盐范围比较广。

盐度对微藻碳酸酐酶活性及其转录表达水平也有影响。如小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)的胞外CA活性随盐度升高逐渐降低^[12]。但是不同藻种、不同盐度处理的结果并不一致,盐度还可能促进碳酸酐酶活性及其基因表达。如Fisher等^[11]发现盐生杜氏藻中碳酸酐酶的mRNA和蛋白表达水平均随NaCl浓度升高而增加。Liu等^[29]认为,将盐度30条件下生长的盐生杜氏藻转到盐度5~20时,其CA活性和基因表达均显著降低。本研究结果表明,蛋白核小球藻的CA活性随盐度升高而降低,与小新月菱形藻的结果一致。但本研究中3种亚型ca基因的表达却随着盐度升高而增加,该结果与盐生杜氏藻类似。出现胞外CA活性与ca基因表达变化不一致的原因可能是由于碳酸酐酶具有多个亚型,并且每一亚型又包含多种CA,如莱茵衣藻的胞外CA有两种 α -CA(CAH1和CAH2)编码^[16]。

3.2 CO_2 对微藻生长及碳酸酐酶的影响

大气 CO_2 浓度升高可以提高藻类的初级生产力。这与培养水体中无机碳浓度升高可以促进光合固碳作用,从而加速藻体生长有关^[30],并且, CO_2 浓度的升高可以刺激氮在藻体内的吸收^[31]。本研究结果也表明,较高 CO_2 浓度有利于蛋白核小球藻820海水株的生长。

CO_2 浓度是调节CCM的重要因素之一。高

浓度 CO_2 可以抑制无机碳的转运,而低浓度 CO_2 可以诱导 CCM 机制^[20],即在低无机碳条件下微藻可以通过增强胞外 CA 活性来提高胞内 CO_2 水平从而维持较高的光合固碳能力。如栅藻 (*Scenedesmus* sp.) 在 2% CO_2 培养下几乎无 CA 活性,而在 0.035% CO_2 浓度下可以检测到较高 CA 活性^[32]。本实验也表明,2 倍空气 CO_2 浓度培养藻的 CA 活性要显著低于空气 CO_2 浓度。

实验中 2 倍空气 CO_2 浓度可以增加 α -ca 和 γ -ca 基因的表达,而其他微藻中不同 CO_2 浓度对 ca 的 mRNA 水平影响结果不同,如假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*) 在 0.16% CO_2 处理下,3 条 α -ca、 δ -ca、 ζ -ca 的 mRNA 表达量均显著下降,而三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) 在空气 CO_2 和 5% CO_2 水平下 6 条 α -ca 和 γ -ca 基因的 mRNA 累积量没有变化^[33]。

3.3 HCO_3^- 浓度对微藻生长及碳酸酐酶的影响

碳酸氢盐是水体中无机碳的主要存在形式,在藻类的生命活动中发挥着重要作用,如光合作用、二氧化碳浓缩机制等。藻类具有从培养基中摄取 HCO_3^- 的能力,但不同实验中所用方法不同,因此,对 HCO_3^- 利用的定量分析结果也有不同^[34]。 HCO_3^- 的含量也会直接影响微藻生长环境的 pH,最终影响微藻的生长。本研究结果表明,在 0 ~ 10 mmol/L HCO_3^- 范围内,藻的生长与其浓度呈正相关性。

碳酸氢盐对碳酸酐酶活性的影响在微藻中也有报道,如铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 和雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 在 0 ~ 20 mmol/L HCO_3^- 范围内,CA 活性与 HCO_3^- 浓度成反比^[10,13]。本结果表明在 0 ~ 5 mmol/L HCO_3^- 浓度范围内,蛋白核小球藻胞外 CA 活性随 HCO_3^- 浓度升高而升高。该小球藻与铜锈微囊藻和雨生红球藻中 CA 活性变化不同,一是因为后两种藻测定的是胞内 CA 活性,而本研究测定的是胞外 CA 活性;还有一种可能是,小球藻中存在 HCO_3^- 直接转运途径^[20,35],该途径与胞外 CA 活性无关。当 HCO_3^- 浓度达到 10 mmol/L 时,碳酸酐酶活性下降,推测其原因可能是大量 HCO_3^- 被转运到细胞内,被胞内 CA 转化成 CO_2 为 Rubisco 羧化酶提供了足够的底物,不需要胞外 CA 来转运 CO_2 。

研究表明,高盐条件下蛋白核小球藻生长较

慢,胞外碳酸酐酶活性降低;并且高浓度 CO_2 可以促进小球藻生长,而降低胞外 CA 活性,说明该小球藻中存在胞外碳酸酐酶,并且其活性受高盐和高 CO_2 抑制。在 0 ~ 5 mmol/L HCO_3^- 条件下,藻生长加快,胞外 CA 活性增强,说明该小球藻具有直接利用 HCO_3^- 进行快速生长的能力。

参考文献:

- [1] Field C B, Behrenfeld M J, Randerson J T, et al. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components [J]. Science, 1998, 281 (5374): 237 - 240.
- [2] Beuf L, Kurano N, Miyachi S. Effect of external pH on inorganic carbon assimilation in unicellular marine green algae [J]. Phycological Research, 2000, 48 (1): 47 - 54.
- [3] Price G D, Badger M R, Woodger F J, et al. Advances in understanding the cyanobacterial CO_2 -concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59 (7): 1441 - 1461.
- [4] Yamano T, Miura K, Fukuzawa H. Expression analysis of genes associated with the induction of the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Physiology, 2008, 147 (1): 340 - 354.
- [5] Lindskog S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase [J]. Pharmacology and Therapeutics, 1997, 74 (1): 1 - 20.
- [6] So A K, Espie G S, Williams E B, et al. A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (ϵ class) is a component of the carboxysome shell [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186 (3): 623 - 630.
- [7] Lane T W, Saito M A, George G N, et al. Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom [J]. Nature, 2005, 435 (7038): 42.
- [8] Badger M. The roles of carbonic anhydrase in photosynthetic CO_2 concentrating mechanisms [J]. Photosynthesis Research, 2003, 77 (2 - 3): 83 - 94.
- [9] Satoh A, Kurano N, Miyachi S. Inhibition of photosynthesis by intracellular carbonic anhydrase in microalgae under excess concentrations of CO_2 . Photosynthesis Research, 2001, 68 (3): 215 - 224.
- [10] Wang S S, Liu Y D, Zou Y D, et al. Modulation and adaptation of carbonic anhydrase activity in

- Microcystis* spp. under different environmental factors [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26 (8): 2443 – 2448. [王山杉,刘永定,邹永东,等. 微囊藻碳酸酐酶活性在不同环境因素下的调节与适应. 生态学报, 2006, 26(8): 2443 – 2448.]
- [11] Fisher M, Gokhman I, Pick U, *et al.* A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (30): 17718 – 17723.
- [12] Yu J L, Xia J R, Zou Y D. Response of carbonic anhydrase activity and photosynthesis to high salinity stress in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35 (4): 515 – 523. [余锦兰,夏建荣,邹永东. 小新月菱形藻碳酸酐酶活性和光合作用对高盐度胁迫的响应. 水产学报, 2011, 35(4): 515 – 523.]
- [13] Wang M, Sang M, Li A F, *et al.* Effects of physical and chemical factors on carbonic anhydrase activity of *Haematococcus pluvialis* CG-11 [J]. *Plant Physiology Communications*, 2010, 46 (7): 701 – 706. [王铭,桑敏,李爱芬,等. 不同理化因子对雨生红球藻 CG-11 碳酸酐酶活性的影响. 植物生理学通讯, 2010, 46(7): 701 – 706.]
- [14] Chen X W, Gao K S. Response of photosynthesis of the bloom-forming marine diatom *Skeletonema costatum* to changes in pH and inorganic nitrogen concentrations in seawater [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28 (6): 635 – 639. [陈雄文,高坤山. 赤潮藻中肋骨条藻的光合作用对海水 pH 和 N 变化的响应. 水生生物学报, 2004, 28 (6): 635 – 639.]
- [15] Wang S S, Liu Y D, Jin C Y, *et al.* Effects of zinc ion on photosynthetic system of *Anabaena azotica* Ley [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2002, 14 (4): 350 – 356. [王山杉,刘永定,金传荫,等. Zn^{2+} 浓度对固氮鱼腥藻 (*Anabaena azotica* Ley) 光能转化特性的影响. 湖泊科学, 2002, 14(4): 350 – 356.]
- [16] Moroney J V, Ma Y, 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.
- [17] Kucho K, Yoshioka S, Taniguchi F, *et al.* Cis-acting elements and DNA-binding proteins involved in CO_2 -responsive transcriptional activation of *Cah1* encoding a periplasmic carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133 (2): 783 – 793.
- [18] He P M, Xu C H, Yu X J, *et al.* Molecular localization and activity inducement of periplasmic carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2002, 19 (3): 317 – 321. [何培民,徐春和,於新建,等. 莱茵藻胞外碳酸酐酶分子定位与活性诱导. 植物学通报, 2002, 19 (3): 317 – 321.]
- [19] Ochiai T, Colman B, Matsuda Y. Acclimation of wild-type cells and CO_2 -insensitive mutants of the green alga *Chlorella ellipsoidea* to elevated $[CO_2]$ [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2007, 30 (8): 944 – 951.
- [20] Bozzo G G, Colman B, Matsuda Y. Active transport of CO_2 and bicarbonate is induced in response to external CO_2 concentration in the green alga *Chlorella kessleri* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51 (349): 1341 – 1348.
- [21] Li L, Fu M L, Zhao Y H, *et al.* Characterization of carbonic anhydrase II from *Chlorella vulgaris* in bio- CO_2 capture [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2012, 19 (9): 4227 – 4232.
- [22] Wu Y D, Wu Y Y, Li Q, *et al.* Effect of pH and fluoride on extracellular carbonic anhydrase activity and photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30 (10): 1972 – 1977. [吴运东,吴沿友,李潜,等. pH 与氟对莱茵衣藻和蛋白核小球藻胞外碳酸酐酶活性及光合效率的影响. 农业环境科学学报, 2011, 30 (10): 1972 – 1977.]
- [23] Kester D R, Duedall I W, Connors D N, *et al.* Preparation of artificial seawater [J]. *Limnology and Oceanography*, 1967, 12 (1): 176 – 179.
- [24] Wilbur K M, Anderson N G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1948, 176 (1): 147 – 154.
- [25] Deng Y L, Sun X, Xu N J, *et al.* The cloning and expression analysis of Rubisco activase gene in the unicellular green alga *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43 (1): 41 – 46. [邓意龙,孙雪,徐年军,等. 蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) Rubisco 活化酶基因的克隆与表达分析. 海洋与湖沼, 2012, 43(1): 41 – 46.]
- [26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4):

- 402 - 408.
- [27] Huang J, Yang W D, Liu J S, *et al.* Effects of temperature, salinity, and light intensity on the growth and toxin production of *Chattonella marina* [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20 (5): 1190 - 1195. [黄娟, 杨维东, 刘洁生, 等. 温度、盐度、光照对海洋卡盾藻生长和产毒的影响. 应用生态学报, 2009, 20(5): 1190 - 1195.]
- [28] Bental M, Degani H, Avron M. ^{23}Na -NMR studies of the intracellular sodium ion concentration in the halotolerant alga *Dunaliella salina* [J]. Plant Physiology, 1988, 87(4): 813 - 817.
- [29] Liu W, Ming Y, Li P, *et al.* Inhibitory effects of hypo-osmotic stress on extracellular carbonic anhydrase and photosynthetic efficiency of green alga *Dunaliella salina* possibly through reactive oxygen species formation [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 54(1): 43 - 48.
- [30] Xu Z G, Zou D H, Zhang X, *et al.* Effects of increased atmospheric CO_2 and N supply on growth, biochemical compositions and uptake of nutrients in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28 (8): 3752 - 3759. [徐智广, 邹定辉, 张鑫, 等. CO_2 和硝氮加富对龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 生长、生化组分和营养盐吸收的影响. 生态学报, 2008, 28 (8): 3752 - 3759.]
- [31] Gordillo F J, Niell F X, Figueroa F L. Non-photosynthetic enhancement of growth by high CO_2 level in the nitrophilic seaweed *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta) [J]. Planta, 2001, 213 (1): 64 - 70.
- [32] Sun X J, Luo S J, Fan X L, *et al.* The study on extracellular carbonic anhydrase activity and photosynthesis activity of oil-producing alga *Scenedesmus* sp. [J]. Renewable Energy Resources, 2012, 30(11): 99 - 103. [孙新健, 罗生军, 范晓蕾, 等. 产油藻株 *Scenedesmus* sp. 胞外碳酸酐酶活性及光合作用活性的研究. 可再生能源, 2012, 30 (11): 99 - 103.]
- [33] 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.
- [34] Chen X, Qiu C E, Shao J Z. Evidence for K^+ -dependent HCO_3^- utilization in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* [J]. Plant Physiology, 2006, 141(2): 731 - 736.
- [35] Willams T G, Colman B. Quantification of the contribution of CO_2 , HCO_3^- , and external carbonic anhydrase to photosynthesis at low dissolved inorganic carbon in *Chlorella saccharophila* [J]. Plant Physiology, 1995, 107(1): 245 - 251.

**Effects of salinity and inorganic carbon on the growth,
extracellular carbonic anhydrase activity and *ca* gene
expression of *Chlorella pyrenoidosa***

WANG Weiwei^{1,2}, SUN Xue^{1,2*}, WANG Dongmei^{1,2}, SHEN Jia^{1,2}, XU Nianjun^{1,2}

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo 315211, China)

Abstract: The aquatic algae have developed a carbon dioxide concentrating mechanism (CCM) to acclimate to the CO₂-limiting environmental conditions, of which carbonic anhydrase is the major component. In order to explore the response pattern of carbonic anhydrase to environmental factors, and to improve the utilization of inorganic carbon and algal biomass of *Chlorella*, the effects of salinity, CO₂ and bicarbonate on the growth, extracellular carbonic anhydrase activity and 3 subtypes of *ca* gene expression level of *C. pyrenoidosa* were investigated by biochemical and real-time quantitative PCR methods in this study. Results showed that the alga grew faster cultured in 15 and 30 salinity, and the algal density in 45 salinity was 0.83-fold of that in 15 salinity on the 9th day. The extracellular carbonic anhydrase activities were inhibited with the increasing salinity, which was especially obvious after long-time treatment with 45 salinity. However, the expression level of three subtypes of *ca* genes increased from 15 to 45 salinity, which could vary from 1.52-fold to 2.16-fold of that cultured in 15 salinity. The algal density cultured in double air CO₂ (high CO₂ level) could reach 1.23-fold of that in air CO₂ (low CO₂ level). But the algal CA activity in high CO₂ level was lower, which was only 0.41-fold of that cultured in low CO₂ level on the 8th day. The α - and γ -*ca* mRNA accumulations in high CO₂ level were slightly higher, which were 1.22 times and 1.47 times that in low CO₂ level, respectively. The growth of *C. pyrenoidosa* was promoted when the bicarbonate concentration ranged from 0 to 10 mmol/L. And the algal CA activity showed maximum value in 5 mmol/L HCO₃⁻ group. The highest levels of α -, β - and γ -*ca* were observed in 1 mmol/L HCO₃⁻ group. It could be concluded that the growth of *C. pyrenoidosa* 820 was suitable under the conditions of low and moderate salinity, double air CO₂ and higher bicarbonate concentration, and the CA activity was induced by low salinity, air CO₂ and 5 mmol/L HCO₃⁻. However, the *ca* mRNA level was higher under high salinity, double air CO₂ level and 1 mmol/L HCO₃⁻ conditions.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; salinity; CO₂; carbonic anhydrase; *ca* gene

Corresponding author: SUN Xue. E-mail: sunxue@nbu.edu.cn