

## 海带碳酸酐酶基因 *Sja-CA3* 的分离与鉴定

翁佳建<sup>1</sup>, 许 玲<sup>1</sup>, 王 雯<sup>1</sup>, 毕燕会<sup>1,2</sup>, 周志刚<sup>1,3</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:** 自海带配子体转录组数据库中筛选到一个属于 $\alpha$ 亚型碳酸酐酶(CA)的表达序列标签(EST)。该序列与已报道的海带的 $\alpha$ -CA家族成员 *Sja-CA1* 和 *Sja-CA2* 的相似度分别为 68.02% 和 77.32%, 表明其可能是该家族的一个新成员, 命名为 *Sja-CA3*。通过 RACE 技术, 获得了 *Sja-CA3* 的全长 cDNA 序列, 为 1 469 bp, 其中包含 840 bp 的完整开放阅读框(ORF)、332 bp 的 5'-非编码区(UTR)和 297 bp 的 3'-UTR。*Sja-CA3* 基因编码 1 个由 279 个氨基酸残基组成的蛋白质, 理论相对分子质量为 31.19 ku, 等电点为 4.85。多序列比对表明 *Sja-CA3* 的功能位点具有高度保守性。系统发育分析结果显示, *Sja-CA3* 与其他藻类的  $\alpha$ -CA 以高的置信度(99/81, NJ/ML)聚类在一起, 进一步证实了其属于  $\alpha$ -CA 家族。通过异源重组技术构建了 pET32a-*Sja-CA3* 原核表达载体, 将其转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞。在诱导表达和纯化后, 获得了分子量约为 45 ku 的重组蛋白(r*Sja-CA3*)。酶活性测定结果显示, r*Sja-CA3* 具有水合酶和酯酶活性, 其比活力分别为 0.82 U/mg 和 2.157 U/g。*Sja-CA3* 的成功分离与鉴定为进一步解析其在海带无机碳储存机制中的作用, 以及海带无机碳浓缩机制(CCM)的研究提供了重要的数据支持。

**关键词:** 海带; 配子体; 碳酸酐酶; 原核表达; 酶活性测定

中图分类号: S 917.3

文献标志码: A

碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA)是一种含 Zn 的金属酶, 催化  $\text{CO}_2$  的可逆水合反应, 促进  $\text{CO}_2$  和  $\text{HCO}_3^-$  的转换, 在藻类的无机碳浓缩机制( $\text{CO}_2$ -concentrating mechanism, CCM)中发挥关键作用。CA 广泛存在于自然界, 包括真核生物(动物<sup>[1]</sup>、植物<sup>[2]</sup>、藻类<sup>[3]</sup>)和原核生物(如古菌、细菌<sup>[4]</sup>)中。CA 家族分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ , 和  $\iota$ -8 个类型, 各类型间序列和结构相似度低, 表现为功能的趋同演化<sup>[5]</sup>。目前对模式微藻莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的 CCM 和 CA 研究较深入, 其基因组至少有 15 个 CA 基因, 分属  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 个家族。具体为 3 个  $\alpha$ -CAs, 9 个  $\beta$ -CAs(包括近期发现的 LCIB 蛋白家族的 3 个同源基因)和 3 个  $\gamma$ -CAs<sup>[6-7]</sup>。在莱茵衣藻的 CCM 中, 不同 CA 协同作用, 实现无机碳的吸收、转运和在 Rubisco 附近的  $\text{CO}_2$  浓缩, 从而提高光合作用效率<sup>[8]</sup>。但

大型海藻的 CCM 机制及 CA 在其中的作用尚未完全解析。

海带(*Saccharina japonica*)作为一种大型褐藻, 在中国、日本、韩国等均有大规模栽培, 是食品、饲料、甘露醇和碘的重要来源。其大规模养殖还可缓解海洋酸化, 增加蓝碳储量<sup>[9-10]</sup>, 具有重大的经济和生态价值。已知海带 CA 家族有 11 个成员(5 个  $\alpha$ -CA、3 个  $\beta$ -CA 和 3 个  $\gamma$ -CA)<sup>[11]</sup>, 其中 5 个 CA 已被鉴定, 包括 2 个  $\alpha$ -CA(*Sja-CA1* 和 *Sja-CA2*)、1 个  $\beta$ -CA(*Sj $\beta$ -CA1*)和 2 个  $\gamma$ -CA(*Sj $\gamma$ -CA1* 和 *Sj $\gamma$ -CA2*)<sup>[12-16]</sup>。本研究通过海带转录组数据库<sup>[11]</sup>筛选, 获得了  $\alpha$ -CA 的另一个成员(*Sja-CA3*)的 cDNA 序列, 并通过 RACE 技术克隆了其全长 cDNA。进一步通过异源表达获得 *Sja-CA3* 的重组蛋白, 并进行纯化、质谱分析和酶活性测定。研究结果为揭示 *Sja-CA3* 在海带无机碳储存中的功能

收稿日期: 2024-10-06

修回日期: 2024-12-11

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2018YFD0901500)

作者简介: 翁佳建(1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为藻类生物技术。E-mail: m1242948000@163.com

通信作者: 周志刚, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

及进一步解析海带 CCM 提供了数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 海带配子体培养

按已报道的方法,在 PES 培养基中培养海带配子体。营养生长培养条件:温度为 $(17\pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照强度为 $40\ \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光照周期为 16 h/8 h(光照/黑暗)。利用 Philips 直型荧光灯管提供白色冷光源。每两个星期更换 1 次培养基。

### 1.2 RNA 提取和 cDNA 的合成

利用 RNAiso 试剂(TaKaRa)提取总 RNA。然后利用 DNase I 在 $37^\circ\text{C}$ 对总 RNA 处理 30 min,以除去基因组 DNA,再加入 $1\ \mu\text{L}\ 25\ \text{mmol/L}$  EDTA, $65^\circ\text{C}$ 处理 10 min 以灭活 DNase I。采用十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltrimethyl-ammonium bromide, CTAB)法提取海带配子体基因组 DNA。最后置于 $-20$ 或 $-80^\circ\text{C}$ 保存 DNA 或 RNA 备用。

以海带配子体总 RNA 为模板,利用反转录试剂盒(TaKaRa)对 RNA 进行反转录合成 cDNA;利用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech)反转录获得 $5'$ -和 $3'$ -cDNA,反应体系和反应条件参照试剂盒说明书。反转录产物于 $-20^\circ\text{C}$ 保存。

### 1.3 海带 *Sja-CA3* 基因 cDNA 及 DNA 全长克隆

自海带转录组<sup>[11]</sup>中筛到的 1 条长度为 774 bp 的  $\alpha$ -CA 基因的 contig 序列,利用 NCBI 数据库进行 BlastX 搜索,发现其与海带 *Sja-CA1*(JF827608.1)及 *Sja-CA2*(MN661399.1)的序列相似度为 68.02% 和 77.32%,认为是  $\alpha$ -CA 家族的另外 1 个成员,命名为 *Sja-CA3*。基于此 contig 序列用 Primer 5.0 软件分别设计 $5'$ 端和 $3'$ 端的特异性引物  $\alpha 5\text{G}2/\alpha 5\text{NG}2$  和  $\alpha 3\text{G}2/\alpha 3\text{NG}2$ (表 1),利用 RACE 技术经过两轮 PCR 扩增获得 *Sja-CA3* 基因的 $5'$ 或 $3'$ 末端序列。第一轮的反应是以上述合成的 $5'$ 端或 $3'$ 端的 cDNA 为模板,以  $\alpha 5\text{G}2$  或  $\alpha 3\text{G}2$  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  $\alpha 5\text{NG}2$  或  $\alpha 3\text{NG}2$  为引物,反应程序基本同第一轮。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 *Sja-CA3* 的 cDNA 全长序列。

根据 *Sja-CA3* 的全长 cDNA 序列设计 3 对引物(表 1),以基因组 DNA 作为模板进行 PCR 反应扩增 *Sja-CA3* 基因,反应程序为 $94^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94^\circ\text{C}$ 变性 45 s,退火 45 s, $72^\circ\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环; $72^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。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 *Sja-CA3* 的 DNA 全长序列。

### 1.4 生物信息学分析

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://www.expasy.org/tools/protparam.html>)<sup>[17]</sup>预测蛋白质的分子量和等电点,利用 Deep TMHMM 2.0(<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)<sup>[18]</sup>预测跨膜区,利用 TargetP 2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/>)<sup>[19]</sup>预测转运肽。利用 NCBI 中 Blastp 工具搜索和下载 *Sja-CA3* 的同源序列,然后对不同物种的 CA 氨基酸序列利用 ClustalX 2.0 软件<sup>[20]</sup>进行多序列比对,最后利用 MEGA11 邻接法和最大似然法构建系统进化树。利用 SWISSMODE(<https://swissmodel.expasy.org/>)对海带 *Sja-CA3* 蛋白序列三级结构进行预测,生成 PDB 文件。使用 PyMOL 软件<sup>[21]</sup>利用 *Sja-CA3* 的 PDB 数据构建 *Sja-CA3* 的 3D 结构。

### 1.5 海带 *Sja-CA3* 原核表达载体的构建和鉴定

为了进一步研究海带 *Sja-CA3* 是否为功能蛋白,本研究拟对其成熟蛋白进行原核表达。经生物信息学分析可知,*Sja-CA3* 基因编码的蛋白在 N 端氨基酸的第 10 His~32 Val 位之间有跨膜区,还具有长度为 27 个氨基酸的信号肽和长度为 33 个氨基酸的叶绿体转运肽,可能会对蛋白的重组表达有影响,于是选取 34Ser~279 Val 的氨基酸所对应的编码序列来构建原核表达载体。根据 *Sja-CA3* 目的片段的 cDNA 序列以及克隆质粒 pMD19-T 和表达质粒 pET32a 的多克隆位点序列设计含有酶切位点的引物 EcoRI- $\alpha$ F/XhoI- $\alpha$ R(表 1),扩增其去除叶绿体转运肽的带有酶切位点的核苷酸序列。以 cDNA 第一链为模板,进行 PCR,PCR 产物经胶回收后连入 pMD19-T 克隆载体中,然后转染宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ (天根生化科技有限公司),蓝白斑筛选阳性克隆,进行菌落 PCR 检测,然后进行测序鉴定。

表1 本研究所采用的引物及其序列  
Tab. 1 Primers employed in the present research and their sequences

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/°C	用途 Application
$\alpha$ 5G2	GCACGCACCTCCGTTCTCGTGCTCGG	63.9	RACE
$\alpha$ 5NG2	GAGAAGTTGAGCTCCTCGCTCGAGCAC	61.5	
$\alpha$ 3G2	TCCGGGAGAGCACCAATGGATGGTGAAC	69.3	
$\alpha$ 3NG2	CCGAGCACGAGAACGGAGGTGCGTGC	66.4	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	58.7	
$\alpha$ 1F	TGGCTGCGGATGCACGACATACAA	66.0	DNA 克隆 DNA cloning
$\alpha$ 1R	ACGGTCCAGCTGGCGTCTCTC		
$\alpha$ 2F	GAGAGACGCCAGCTGGACCGT	64.3	
$\alpha$ 2R	CACCATGTGGATCTCGGCGTCGT		
$\alpha$ 3F	ACGACGCCGAGATCCACATGGTG	64.3	
$\alpha$ 3R	GCTCCACACACTCACACCAACTAACC		
<i>Eco</i> RI- $\alpha$ F	<i>GAATTC</i> TCGTTTTCGCAAAAAACATCACGA	60.0	异源表达 Heterologous expression
<i>Xho</i> I- $\alpha$ R	<i>CTCGAGT</i> TATACGACTGATACGTAGTGG		
18S-F	TCGGACGGTTTTGTGGTGA	56.0	qPCR
18S-R	CCTTCCTTGGATGTGGTAGCC		
Q-F	GGGCGTTAAGTGGATCGTCA	57.0	
Q-R	GTGTTGCCCAACGAGTCAAC		

注:斜体表示酶切位点。

Notes: Italics indicate restriction enzyme cleavage sites.

利用质粒提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取 pMD19T-*SjaCA3* 重组质粒。将原核表达质粒 pET-32a 和重组质粒 pMD19T-*SjaCA3* 分别用 *Eco* RI 和 *Xho* I (TaKaRa) 酶切,胶回收后通过 T4 连接酶 (TaKaRa) 16 °C 连接过夜,获得重组表达质粒 pET32a-*SjaCA3*,利用热激法转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆,菌落 PCR 检测后进行插入片段测序。将测序正确并经双酶切验证的 pET32a-*SjaCA3* 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态宿主细胞,得到转基因株 pET32a-*SjaCA3*/BL21,于 -80 °C 冰箱保存。以 pET-32a 空载作为阴性对照。

### 1.6 *Sja*-CA3 重组蛋白的诱导表达与鉴定

将携带重组表达质粒 pET32a-*SjaCA3* 和空载 pET-32a 的菌液分别接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中,活化后放大培养至菌液的 OD<sub>600</sub> 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),37 °C 下 180 r/min 诱导表达 4 h,收集菌体。取 1 mL 菌液分装于 1.5 mL 离心管中,离心 5 min,沉淀用 PBS (pH 7.4) 悬浮。采用冻融法破碎菌体后,4 °C 条件下 20 000 r/min 离心 10 min,分别收集上清和沉淀,沉淀用 PBS

重悬。取未诱导菌体裂解液、诱导菌体裂解液、上清液、沉淀重悬液各 20  $\mu$ L,按 1:1 比例加入 2 $\times$  聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上样缓冲液,水浴煮沸 10 min,进行 12% SDS-PAGE 电泳。聚丙烯酰胺胶采用考马斯亮蓝法进行染色。

经 SDS-PAGE 检测,目的蛋白主要在沉淀中,以包涵体的形式存在。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,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 *Sja*-CA3 (Recombinant *Sja*-CA3, r*Sja*-CA3)。在将纯化的 r*Sja*-CA3 样品进行 SDS-PAGE 后,恒压 100 V 湿转 1 h 至硝酸纤维素膜,封闭、洗脱按照标准方法进行,以抗 His 标签抗体 (上海友科生物科技有限公司,1:6 000) 为一抗,4 °C 孵育过夜,再以 HRP-山羊抗兔 IgG (上海友科生物科技有限公司,1:10 000) 为二抗,室温孵育 1 h,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。另外,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(LC-MS/MS)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 *Sja-CA3* 所编码蛋白进行序列比对,以鉴定 *rSja-CA3* 的氨基酸序列。

### 1.7 *Sja-CA3* 重组蛋白的复性与酶活性测定

将经鉴定并纯化的 *rSja-CA3*,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。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。

利用 Wilbur 和 Anderson 的电极法<sup>[22]</sup>测定纯化后 *rSja-CA3* 的 CO<sub>2</sub> 水合酶活性。在预冷的 5 mL 巴比妥缓冲液(巴比妥 0.184 g,巴比妥钠 1.030 g,加入蒸馏水溶解并定容至 100 mL,调节 pH 至 8.4,放在冰水混合物中备用)中,加入纯化后的蛋白 675 μL(0.502 mg),待 pH 计读数稳定后,立即加入 3 mL 饱和 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 以上获得)。记录 pH 下降 1 个单位所需的时间。整个反应过程温度控制在 0 °C 左右。本实验设立 2 组:不加酶液组(空白对照组)和加入酶液组,每组 3 个重复。酶活性计算公式:

$$U = (t_0 - t) / t \quad (1)$$

式中:  $U$  为 CA 酶活性;  $t_0$  为空白对照组 pH 下降 1 个单位所用的时间, min;  $t$  为酶液组 pH 下降 1 个单位所用的时间, min。

$\alpha$ -CA 还具有酯酶活性,能将乙酸对硝基苯酯(p-NPA)水解成对硝基苯酚(p-NP)<sup>[23]</sup>。将 0.2 mL 1×PBS 溶液、0.6 mL 的重组蛋白(0.533 mg/mL)与 0.1 mL 的 p-NPA 迅速混合以构建酯酶反应体系,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 1 次 OD<sub>405</sub>。以 Tris-HCl 缓冲液为对照,根据对照组和实验组的 OD<sub>405</sub> 数值变化来检测 *rSja-CA3* 的酯酶活性,每组 3 个重复。1 个酶活性单位(U)定义为在 0 °C 下、每分钟产生 1 mol 的 p-NP<sup>[24]</sup>, *rSja-CA3* 的酯酶活性可用公式计算:

$$U_{\text{酯酶}} = (C - C_0) / V / t \quad (2)$$

式中:  $U_{\text{酯酶}}$  为 CA 酯酶活性;  $C$  为加酶组产生的 p-NP 浓度, μmol/mL;  $C_0$  为对照组产生的 p-NP 浓度, μmol/mL;  $V$  为总反应体积, mL;  $t$  为反应时间, min。反应体系中所产生的 p-NP 可根据 p-NP 浓度与 OD<sub>405</sub> 之间的标准曲线求得。

## 2 结果

### 2.1 海带 *Sja-CA3* 基因的 cDNA 全长克隆

通过 RACE 技术扩增到 *Sja-CA3* 基因的 5'-RACE 和 3'-RACE 的 PCR 产物(图 1 泳道 1, 2),经克隆、测序后获知其长度分别为 616 bp 和 770 bp。拼接获得该基因的 cDNA 全长序列大小为 1 469 bp,包含 840 bp 的开读框架(ORF), 332 bp 的 5'-非翻译区(UTR)和 297 bp 的 3'-UTR。为获得 *Sja-CA3* 基因的 DNA 全长序列,利用表 1 中 3 对引物,以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,共获得 3 条产物带(图 1 泳道 3、4 和 5),经克隆、测序可知它们的长度分别为 1 603、1 486 和 2 389 bp。测序后通过拼接获得 *Sja-CA3* 基因的 DNA 全长,为 5 485 bp。包含 6 个内含子,按照 5' 端至 3' 端的顺序,内含子大小依次为 1 391、356、545、605、486 和 633 bp,从而将该基因的 ORF 分隔成 7 个外显子(图 1)。

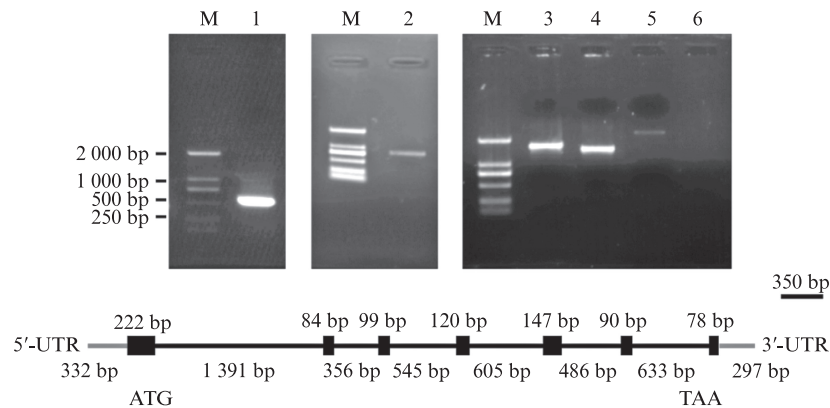
### 2.2 海带 *Sja-CA3* 蛋白序列特征及系统演化分析

*Sja-CA3* 基因编码 1 个含 279 个氨基酸残基的蛋白,相对分子质量为 31.19 ku,等电点为 4.85。利用 TMHMM 软件对 *Sja-CA3* 进行跨膜分析,结果显示该蛋白 N 端 10 His-32 Val 具有 1 段强疏水性的跨膜区。TargetP 2.0 的预测结果显示,其具有由 33 个氨基酸构成的叶绿体转运肽(图 2),切除该区域后得到 1 个由 246 个氨基酸组成的成熟蛋白,相对分子质量为 27.52 ku,等电点为 4.61。

将 *Sja-CA3* 所编码的蛋白与海带已报道的 2 个  $\alpha$ -CA 及长囊水云(*Ectocarpus siliculosus*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的  $\alpha$ -CA 进行多序列比对,发现 *Sja-CA3* 在 215 Gly-222 Cys 处(图 2)存在 1 个“GSLTTPPC”的保守区,这与哺乳动物和真菌的  $\alpha$ -CA 相似,其中第 8 个氨基酸(Cys,半胱氨酸)残基高度保守,参与二硫键的形成以稳定其

结构<sup>[25]</sup>。另外, *Sja*-CA3 的 His 127、His 129 和 His 146 为高度保守的  $Zn^{2+}$  结合位点(图 2), 推测与莱茵衣藻中 CAH1(登录号: BAA14232.2)的锌

结合位点(His 163、His 165、His 182)一致<sup>[26]</sup>, 和 1 个水分子/氢氧化物离子组成四面体配位构型的活性中心, 以行使其催化功能。

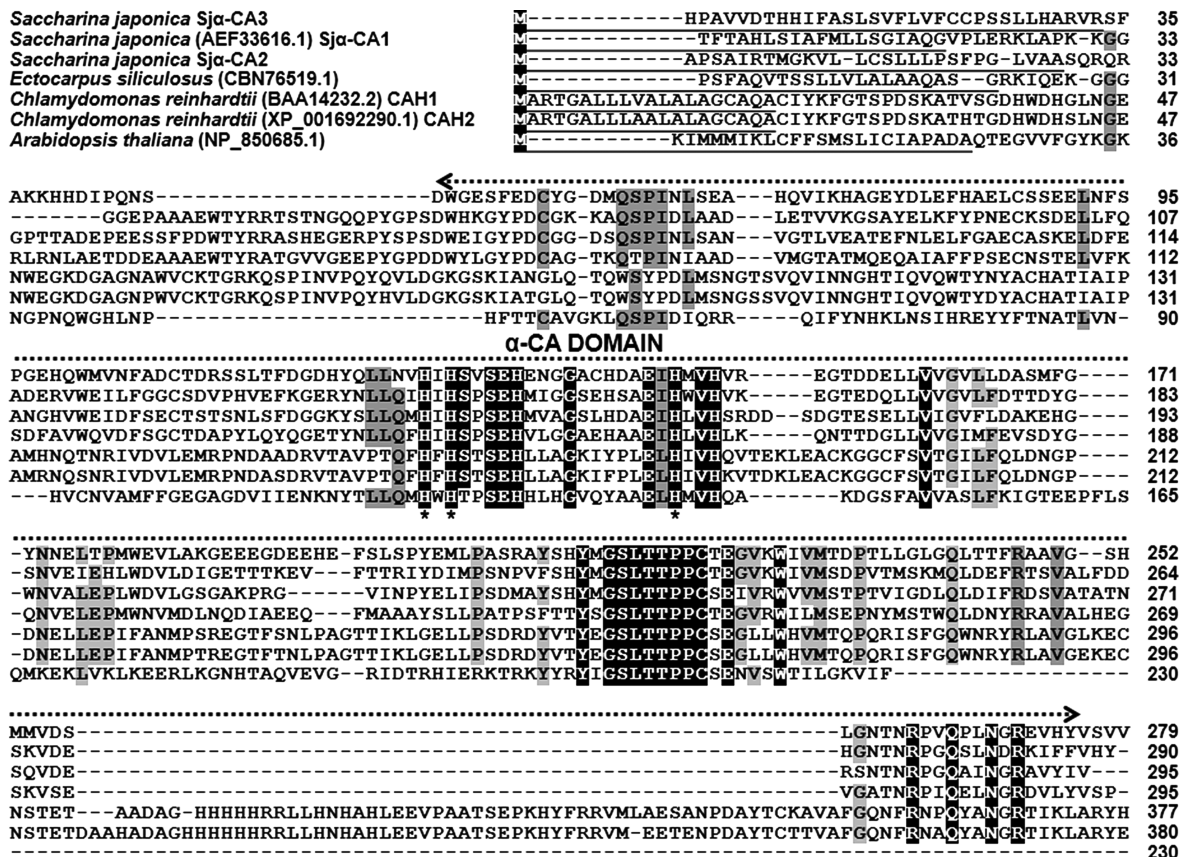


泳道 1. 5' RACE 产物; 泳道 2. 3' RACE 产物; 泳道 3~5. 分别利用  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$  引物获得的 *Sja*-CA3 基因的 DNA 扩增产物; 泳道 6. 空白对照; M: D2000 分子量标准; 黑框表示外显子, 黑线表示内含子, 灰线表示 UTR。

Lane 1. products of 5' RACE; Lane 2. products of 3' RACE; Lanes 3-5. products of segmental amplification with primers  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\alpha 3$  in turn; Lane 6. control only with  $H_2O$  as a template; M: D2000 Marker; Exons and introns are shown in black boxes and black lines, respectively; UTRs are indicated by grey lines (lower panel) of *Sja*-CA3.

图 1 *Sja*-CA3 的 cDNA 和 DNA 扩增产物(上)电泳图及基因组结构(下)示意图

Fig. 1 Electrophoresis of cDNA and DNA amplified products (upper panel) and gene structure (lower panel) of *Sja*-CA3



80%一致性的氨基酸用灰色阴影表示, 而保守氨基酸用黑色阴影表示。锌结合位点用“\*”指示, 预测的信号肽用下划线表示。

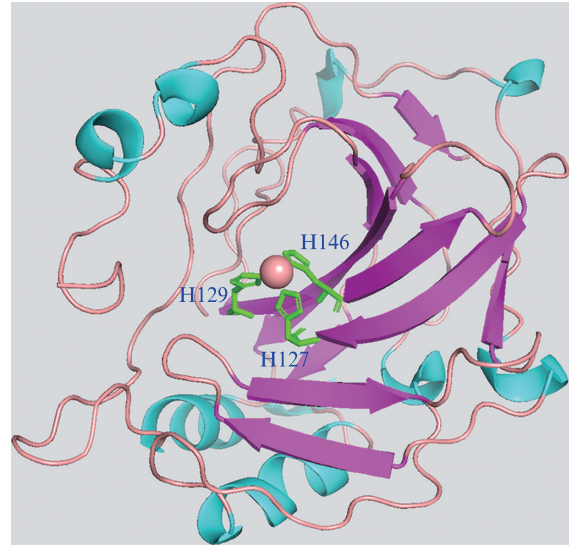
Amino acids with 80% identity are shaded in grey, and the conserved amino acids are shaded in black. Asterisks indicate the Zn-binding sites, and the underlines show the putative signal peptide.

图 2  $\alpha$ -CA 氨基酸序列的多序列比对

Fig. 2 Multi-alignment of deduced amino acid sequences of  $\alpha$ -CAs from the selected species

图3是利用SWISS-MODEL和PyMOL基于同源建模获得的海带 *Sja-CA3* 的三维结构图,其活性位点的注释是基于人CA7的3D结构<sup>[27]</sup>同源建模生成的。*Sja-CA3*是单体酶,包含10个 $\beta$ -折叠和环绕其周围的约7个 $\alpha$ -螺旋,催化活性位点位于中央凹槽处(图3)。CA是金属酶,其活性至少需要1种二价金属离子,这种金属离子通常是 $Zn^{2+}$ 。图3还展示了 *Sja-CA3* 的金属离子( $Zn^{2+}$ )与结合位点相结合的空间结构。

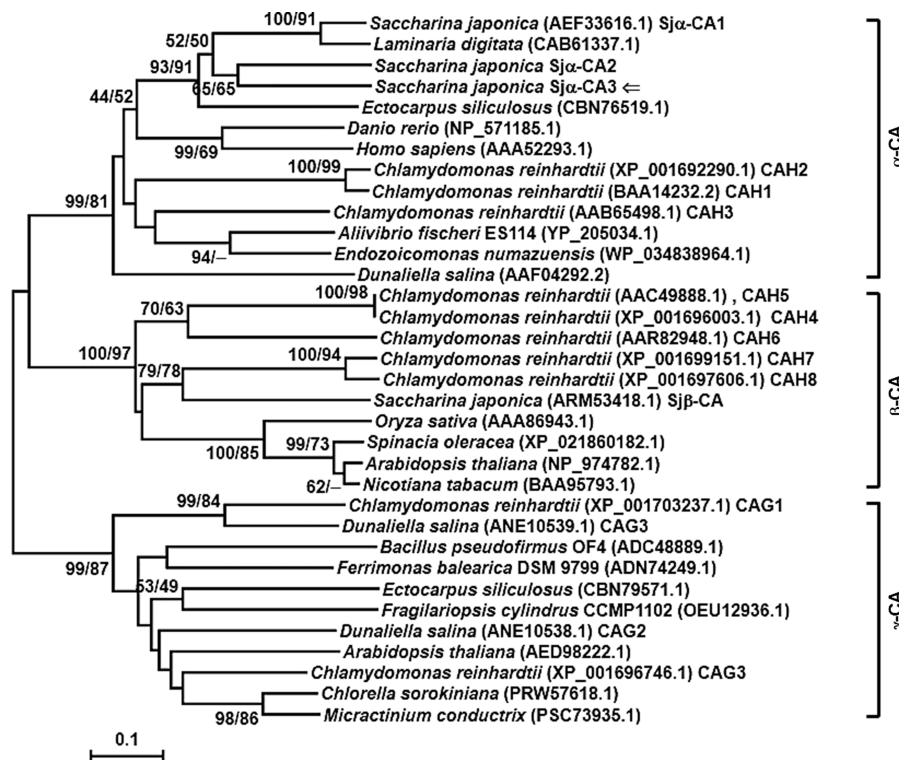
系统聚类分析结果(图4)显示,33条不同物种的CA明显按所属亚型聚为3支,分别为 $\alpha$ -型、 $\beta$ -型和 $\gamma$ -型CA。 $\alpha$ -CA分支中,褐藻的 $\alpha$ -CA聚在一起,其中 *Sja-CA3* 与 *Sja-CA2* 聚为一支,而 *Sja-CA1* 以高的置信度与掌状海带的 $\alpha$ -CA聚为一支,说明相较于 *Sja-CA1*,*Sja-CA3* 与 *Sja-CA2* 具有更近的亲缘关系。这不仅说明CA的不同家族间无亲缘关系,属于功能趋同进化,还说明 *Sja-CA3* 为海带中分离到的 $\alpha$ -CA家族的另一个成员,可能在海带无机碳吸收和转换中起着重要的作用。



青色.  $\alpha$ -螺旋;洋红.  $\beta$ -折叠;粉色. 无规线团;绿色.  $Zn^{2+}$ 结合位点(His 127, His 129 和 His 146);粉色球.  $Zn^{2+}$ .  
cyan.  $\alpha$ -helix; magenta.  $\beta$ -sheet; pink. random coil; green.  $Zn^{2+}$  binding sites (His 127, His 129, and His 146); pink sphere.  $Zn^{2+}$ .

图3 *Sja-CA3* 的三级结构

Fig. 3 Modeling of 3D structure of *Sja-CA3*



箭头所指示的是本研究的基因;每个物种拉丁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。

*Sja-CA3* is marked by an arrow. The accession numbers of CA proteins are showed 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 50% are shown), respectively.

图4 基于CA的氨基酸序列所构建的聚类图

Fig. 4 Phylogenetic tree inferred from the deduced amino acid sequences of CA genes from several species



### 2.3 *Sja*-CA3的诱导表达、纯化和免疫印迹检测

通过异源重组,成功构建了包含 *Sja*-CA3 成熟蛋白编码序列的重组表达质粒 pET32a-*Sja*CA3,然后将 pET32a-*Sja*CA3 转化大肠杆菌,获得转基因细胞系。经放大培养并添加 IPTG,分别诱导 0~6 h 后(图 5 泳道 1-7)收集菌体,反复冻融以破碎细胞,提取菌体总蛋白,经 SDS-PAGE 电泳,发现与空白对照(图 5 泳道 8)相比,泳道 2-7 在 45 ku 左右多出一个条带,与目的大小相符,包含 27.52 ku 由目的基因编码的 *Sja*-CA3 蛋白和 17.60 ku 由表达质粒 pET-32a 中 His 标签及多克隆位点碱基所编码的多肽。利用抗 His-tag 多克隆抗体,对 *Sja*-CA3 重组蛋白进行 Western 免疫印迹。结果(图 5,泳道 9)显示,在目的蛋白大小处出现单一条带,说明该处的重组蛋白中含有 His 标签;印迹所对应的分子量大小约为 45 ku,与目的蛋白的预测分子量大小相符。从而表明重组表达的就是目的基因 *Sja*-CA3 所编码的蛋白。

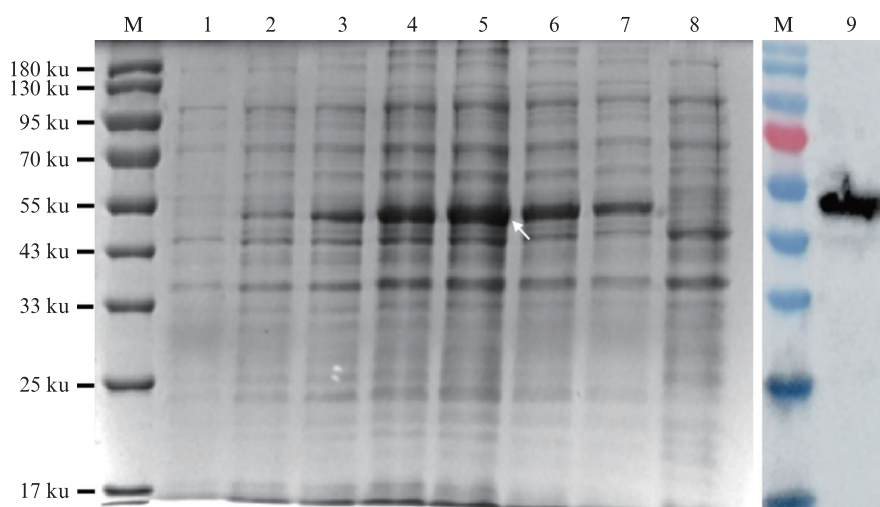
分别提取上清液和沉淀中的蛋白,经 SDS-PAGE 电泳,发现目的蛋白主要存在于沉淀中,它的大小为 45 ku 左右(图 6,泳道 3),而上清(图 6 泳道 2)中该大小的条带不明显。说明重组的目的蛋白主要以包涵体的形式表达。按照 AKTApure 层析系统和 His trap HP 1 mL 蛋白亲和层析纯化预装柱(Cytiva 公司)的说明书,用含不同浓度咪唑的缓冲液(5 mmol/L, 10 mmol/L)洗脱,以纯化 *Sja*-CA3 重组蛋白。经 SDS-PAGE 电泳和染色,结果

显示,用含 10 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱下来的蛋白,在目的蛋白大小处出现单一条带(图 6 泳道 5)。得到纯化的重组蛋白 r*Sja*-CA3。

同时,从 SDS-PAGE 上割胶、分离约 45 ku 的目的条带,经胰蛋白酶酶解后,上样至 Trap 柱,进行质谱分析,检测到 4 个肽段(图 7),共 75 个氨基酸,虽只占其总长度(246 aa)的 30.49%,但每个肽段均与 *Sja*-CA3 所编码蛋白的相应片段完全匹配(图 7)。质谱数据显示蛋白分子量大小为 27.52 ku,与目的基因所编码蛋白的理论分子量一致,说明纯化得到的重组蛋白即为目的基因 *Sja*-CA3 所编码的蛋白。

### 2.4 r*Sja*-CA3 酶活性检测

异源表达的 r*Sja*-CA3 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 r*Sja*-CA3 进行复性。经过对不同梯度浓度尿素的复性液透析后得到复性的 r*Sja*-CA3,浓缩后经紫外分光光度法测定,其蛋白的浓度为 0.743 mg/mL。在添加纯化复性的 r*Sja*-CA3 反应体系中,需要 1.5 min ( $n=3$ ),pH 就从 8.4 下降到 7.4;而在不加 r*Sja*-CA3 的体系中,则需要 2.1 min ( $n=3$ ),pH 才能下降到 7.4。结果表明,经复性后的 r*Sja*-CA3 具有酶活性,可以加速  $\text{CO}_2$  的水合反应能力。通过计算可知, r*Sja*-CA3 的水合反应比活力为  $(0.820 \pm 0.087)$  U/mg prot ( $n=3$ )。

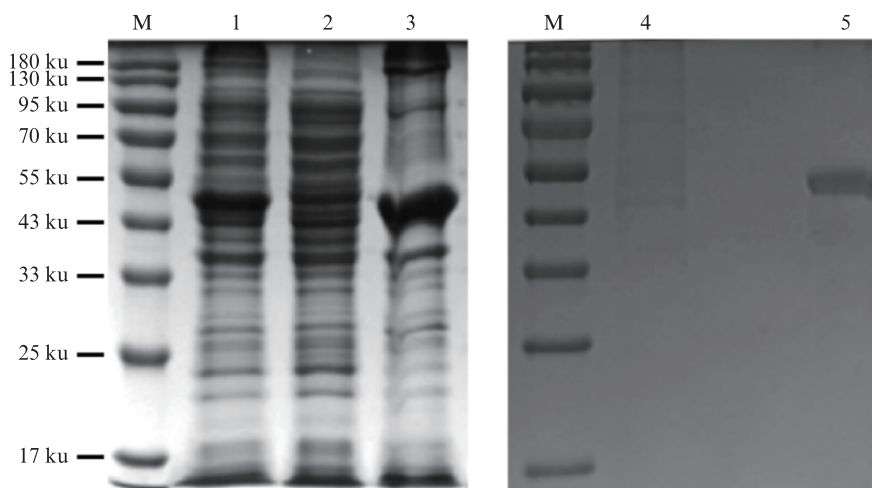


M. 预染蛋白质分子量标准;泳道 1~7 分别为 IPTG 诱导表达 0、1、2、3、4、5 和 6 h 的全菌蛋白;泳道 8 为空载对照;泳道 9 为全菌蛋白的免疫印迹图。

M. prestained protein ladder; Lanes 1 to 7. the whole bacterial proteins induced by IPTG at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h, respectively; Lane 8. empty load comparison; Lane 9. immunoblotting of the whole bacterial proteins.

图 5 r*Sja*-CA3 的诱导表达及免疫印迹检测

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of r*Sja*-CA3 induced at various time points and western blot analysis using anti-His tag antibody

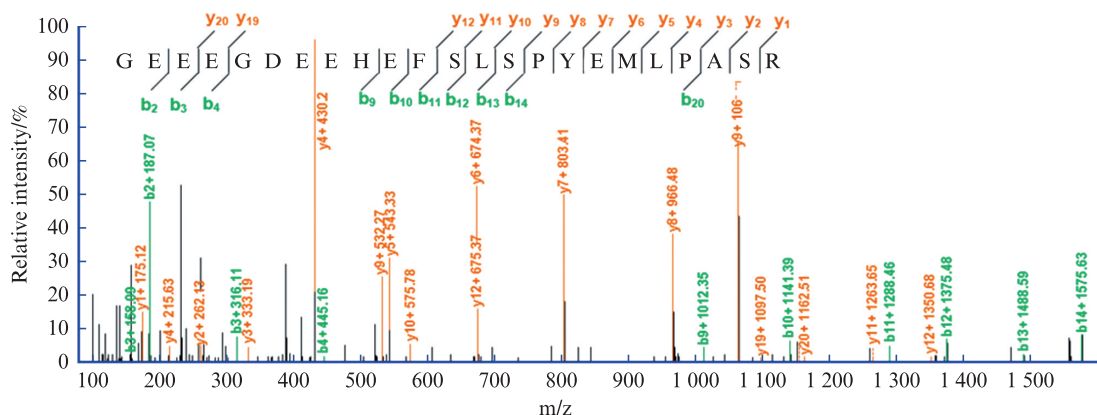


泳道 1. 全菌;泳道 2. 重组菌株的上清液;泳道 3. 沉淀;泳道 4. 5 mmol/L 咪唑洗脱;泳道 5. 10 mmol/L 咪唑洗脱; M. 预染蛋白质分子量标准。

Lane 1. whole bacteria; Lane 2. supernatant of recombinant strain; Lane 3. pellet; Lane 4. elution with 5 mmol/L imidazole; Lane 5. elution with 10 mmol/L imidazole; M. pre-stained protein ladder.

图 6 *Sja-CA3* 重组蛋白的可溶性检测(左)和纯化(右)

Fig. 6 SDS-PAGE pattern of whole bacterial protein, supernatant and precipitate in bacteria disruption product (left), and the purified protein of *Sja-CA3* eluted with different concentration of imidazole (right)



**MHPAVVDTHHIFASLSVFLVFCCPSSLLHARVRSFAKKHHDIPQNSDWGESFEDCYGDMQSPI**  
**NLSEAHQVIKHAGEYDLEFHAELCSSEELNFSPEGHQWMVNFADCTDRSSLTFDGDHYQLLN**  
**HIHSVSEHENGACHDAEIHMVHVREGTDELLVGVLLDASMFYNNELTPMWEVLAKGEEE**  
**GDEEHFSLSPYEMLPASRAYSHYMGSLTTPCTEGVKWIVMTDPTLLGLGLTTFRAAVGSH**  
**MMVDSLGNTRNPVQPLNGREVHYVSVV**

下划线表示质谱检测到的肽段序列,红色字母表示二级质谱图所对应的氨基酸序列。

Underline indicates the sequence of the peptide detected by mass spectrometry, and the red letter indicates the amino acid sequence corresponding to the secondary mass spectrum.

图 7 *Sja-CA3* 重组蛋白质谱图

Fig. 7 Mass spectrum of recombinant *Sja-CA3*

鉴于  $\alpha$ -CA 还具有酯酶活性,通过构建体外将 p-NPA 水解成 p-NP 的反应体系,检测了 rSja-CA3 的酯酶活性。根据不同浓度的对硝基苯酚(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  $OD_{405}$  与蛋白浓度的关系式为  $y=0.0162x+0.0189$ ,其中  $R^2=0.9987$ ,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,当  $t=60$  min 时,反应趋于稳定,吸光值增加不明显;且随着抑制剂乙酰唑胺浓度的不断升高 rSja-CA3 的酯酶活性被抑制。将 60 min 时的吸光值代入标准曲线中,计算得到加酶组和对照组的 p-NP 浓度,再利用酯酶活性公式计算,得到酶的比活力为  $(2.157 \pm 0.007)$  U/g ( $n=3$ )。因此,重组表达的



Sj $\alpha$ -CA3 与其他  $\alpha$ -CA 一样,不仅具有水合酶活性,还具有酯酶活性。

### 3 讨论

碳酸酐酶(CAs)根据序列同源性分为 8 种类型: $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\theta$  和最近发现的  $\iota$  型<sup>[28]</sup>。所有具有催化活性的 CAs 都是金属酶,其催化功能依赖于二价阳离子。大多数 CAs 的活性中心含有  $Zn^{2+}$ ,但在  $\zeta$  型和  $\gamma$  型 CAs 中也发现了  $Cd^{2+}$  和  $Fe^{2+}$ <sup>[3]</sup>。 $\alpha$  型碳酸酐酶( $\alpha$ -CA)是最早被识别的 CA 家族,最初在红细胞中被发现<sup>[29, 30]</sup>。 $\alpha$ -CA 的结构主要由 10 条  $\beta$  链组成,形成 1 个大型的中央  $\beta$  片层,周围环绕 7 条  $\alpha$  螺旋<sup>[31]</sup>。其活性位点的锌离子由 3 个组氨酸残基和 1 个水分子以四面体结构配位<sup>[31-33]</sup>,位于酶锥形凹槽中央的底部<sup>[31]</sup>。CA 的主要功能为催化二氧化碳和碳酸氢根之间的可逆水合反应。此外, $\alpha$  型 CAs 还具有酯酶活性,而这种活性通常在其他类型 CAs (如  $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  和  $\zeta$  类)中缺乏<sup>[34]</sup>。本研究中,鉴定出了海带的  $\alpha$  型碳酸酐酶的一个新成员 Sj $\alpha$ -CA3。该酶具有保守的  $\alpha$ -CA 结构域、锌结合位点(127His、129His、146His),并展现了典型的水合酶和酯酶活性。作为主要功能,rSj $\alpha$ -CA3 的二氧化碳水合反应比活力为 0.82 U/mg prot,这与已鉴定的海带的 rSj $\alpha$ -CA1 和 rSj $\alpha$ -CA2 相近,后者的比活力分别是 1.52 U/mg prot 和 0.54 U/mg prot<sup>[35]</sup>。同时,rSj $\alpha$ -CA3 的比活力高于生长在南极冰中的一种衣藻(*Chlamydomonas* sp. ICE-L)以及绿潮藻浒苔(*Ulva prolifera*)的重组  $\alpha$ -CA 的水合酶活性(比活力分别为 0.437 和 0.267 U/mg prot)<sup>[36-37]</sup>。

在单一藻类物种中发现多个  $\alpha$  型 CA 是 1 种普遍存在的现象。这些  $\alpha$ -CA 可能具有不同的定位、表达模式和功能,从而帮助藻类能够根据环境变化精确调节其生理过程。在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中,已鉴定出 3 个  $\alpha$ -CA:CAH1 和 CAH2 位于周质空间,而 CAH3 位于类囊体腔<sup>[3]</sup>。其中,CAH1 在低  $CO_2$  浓度条件下显著上调<sup>[38]</sup>,而 CAH2 在高或低  $CO_2$  浓度条件下均未被检测到<sup>[39]</sup>。相比之下,CAH3 表现为持续表达,对  $CO_2$  水平变化的响应不显著<sup>[40]</sup>。类似地,在三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)中,已鉴定出 5 个  $\alpha$ -CA,且都位于 4 层的叶绿体膜系统内<sup>[41-42]</sup>。而在 *Thalassiosira Pseudonana* 中,仅发现了 1 种位

于基质中的  $\alpha$ -CA,其可能作为  $CO_2$  回收系统发挥作用<sup>[43]</sup>。到目前为止,包括本研究中的 Sj $\alpha$ -CA3 在内,已在海带中鉴定出 3 个  $\alpha$ -CA。Sj $\alpha$ -CA1 位于叶绿体中<sup>[12]</sup>,Sj $\alpha$ -CA2 位于周质空间中<sup>[13]</sup>,而 Sj $\alpha$ -CA3 则可能位于叶绿体基质中。这一现象突显了这些生物体对复杂环境的适应能力。本研究中 Sj $\alpha$ -CA3 的分离和鉴定为进一步研究其在海带无机碳浓缩中的作用提供了分子基础。

作者声明本文无利益冲突。

### 参考文献:

- [1] THIRY A, SUPURAN C T, MASEREEL B, et al. Recent developments of carbonic anhydrase inhibitors as potential anticancer drugs [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 51: 3051-3056.
- [2] RUDENKO N N, IGNATOVA L K, NADEEVA-ZHURIKOVA E M, et al. Advances in understanding the physiological role and locations of carbonic anhydrases in C3 plant cells [J]. Protoplasma, 2021, 258 (2): 249-262.
- [3] 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.
- [4] SMITH K S, FERRY J G. Prokaryotic carbonic anhydrases [J]. Fems Microbiology Reviews, 2000, 24 (4): 335-366.
- [5] LANGELLA E, DI FIORE A, ALTERIO V, et al.  $\alpha$ -CAs from photosynthetic organisms [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23: 12045.
- [6] 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.
- [7] LIN J Y, EFFENDI S S W, NG I S. Enhanced carbon capture and utilization (CCU) using heterologous carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* for lutein and lipid production [J]. Bioresource Technology, 2022, 351: 127009.
- [8] MACKINDER L C M, CHEN C, LEIB R D, et al. A spatial interactome reveals the protein organization of the algal  $CO_2$ -concentrating mechanism [J]. Cell, 2017, 171 (1): 133-147.
- [9] ERLANIA BELLGROVE A, MACREADIE P I, YOUNG M A, et al. Patterns and drivers of macroalgal 'blue carbon' transport and deposition in near-shore coastal environments [J]. Science of the Total

- Environment, 2023, 890: 164430.
- [10] ORTEGA A, GERALDI N R, ALAM I, et al. Important contribution of macroalgae to oceanic carbon sequestration [J]. Nature Geoscience, 2019, 12: 748-754.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] BI Y H, QIAO Y M, WANG Z, et al. Identification and characterization of a periplasmic  $\alpha$ -carbonic anhydrase (CA) in the gametophytes of *Saccharina japonica* (Phaeophyceae) [J]. Journal of Phycology, 2021, 57(1): 295-310.
- [14] HAO H M, BI Y H, WEI N N, et al. Expression of a periplasmic  $\beta$ -carbonic anhydrase (CA) gene is positively correlated with  $\text{HCO}_3^-$  utilization by the gametophytes of *Saccharina japonica* (Phaeophyceae, Ochrophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2023, 35: 3021-3040.
- [15] BI Y H, DU A Y, LI J L, et al. Isolation and characterization of a  $\gamma$ -carbonic anhydrase localized in the mitochondria of *Saccharina japonica* [J]. Chemosphere, 2021, 266: 129162.
- [16] WANG W, XU L, JIANG G, et al. Characterization of a novel  $\gamma$ -type carbonic anhydrase, Sj $\gamma$ -CA2, in *Saccharina japonica*: Insights into carbon concentration mechanism in macroalgae [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 263: 130506.
- [17] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, 2005: 571-607.
- [18] HALLGREN J, TSIRIGOS K D, PEDERSEN M D, et al. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks [J]. bioRxiv, 2022, doi: 10.1101/2022.04.08.487609.
- [19] ALMAGRO ARMENTEROS J J, SALVATORE M, EMANUELSSON O, et al. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning [J]. Life Science Alliance, 2019, 2(5): e201900429.
- [20] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics, 2007, 23: 2947-2948.
- [21] SCHRODINGER L L C. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3. 2010 [EB/OL]. Available: <http://www.pymol.org>.
- [22] WILBUR K M, ANDERSON N G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1948, 176(1): 147-154.
- [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] CUESTA-SEIJO J A, BORCHERT M S, NAVARRO-POULSEN J C, et al. Structure of a dimeric fungal  $\alpha$ -type carbonic anhydrase [J]. Febs Letters, 2011, 585(7): 1042-1048.
- [26] 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, 1990, 87(24): 9779-9783.
- [27] SETHI K K, VULLO D, VERMA S M, et al. Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of the human carbonic anhydrase isoforms I, II, VII, IX and XII with benzene sulfonamides incorporating 4, 5, 6, 7-tetrabromophthalimide moiety [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013, 21(19): 5973-5982.
- [28] NOCENTINI A, SUPURAN C T, CAPASSO C. An overview on the recently discovered iota-carbonic anhydrases [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2021, 36: 1988-1995.
- [29] BRINKMAN R, MARGARIA R, MELDRUM N, et al. The  $\text{CO}_2$  catalyst present in blood [J]. Journal of Physiology London, 1932, 75: 3-4.
- [30] MELDRUM N, ROUGHTON F. Some properties of carbonic anhydrase, the  $\text{CO}_2$  enzyme present in blood [J]. Journal of Physiology London, 1932, 75: 15.
- [31] LILJAS A, KANNAN K K, BERGSTÉN P C, et al. Crystal structure of human carbonic anhydrase-C [J]. Nature New Biology, 1972, 235: 131-137.
- [32] ERIKSSON A E, JONES T A, LILJAS A. Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 Å resolution [J]. Proteins, 1988, 4(4): 274-282.
- [33] HÅKANSSON K, CARLSSON M, SVENSSON L A, et al. Structure of native and apo carbonic anhydrase II and structure of some of its anion-ligand complexes [J]. Journal of Molecular Biology, 1992, 227: 1192-1204.
- [34] KIKUTANI S, NAKAJIMA K, NAGASATO C, et al. Thylakoid luminal  $\theta$ -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Proceedings of the

- National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113: 9828-9833.
- [35] 王震, 毕燕会, 周志刚. 2 个重组海带  $\alpha$ -碳酸酐酶 (CA) 的酶活性比较研究[J]. 海洋科学, 2022, 46(7): 61-69.
- WANG Z, BI Y H, ZHOU Z G. Comparative Study on Enzymatic Activities of Two Recombinant  $\alpha$ -Carbonic Anhydrases (CAs) from *Saccharina japonica* [J]. Marine Sciences, 2022, 46(7): 61-69.
- [36] QU C, HE 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.
- [37] WANG Y, LIU F, WANG M, et al. Characterization and transcriptional analysis of one carbonic anhydrase gene in the green-tide-forming alga *Ulva prolifera* (Ulvophyceae, Chlorophyta) [J]. Phycological Research, 2020, 68(1): 90-97.
- [38] MIURA K, KOHINATA T, YOSHIOKA S, et al. Regulation of a carbon concentrating mechanism through CCM1 in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Functional Plant Biology, 2002, 29: 211-219.
- [39] TACHIKI A, FUKUZAWA H, MIYACHI S. Characterization of carbonic-anhydrase isozyme CA2, which is the CAH2 gene product, in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1992, 56: 794-798.
- [40] 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: 15-26.
- [41] TACHIBANA M, ALLEN A E, KIKUTANI S, et al. Localization of putative carbonic anhydrases in two marine diatoms, *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana* [J]. Photosynthesis Research, 2011, 109: 205-221.
- [42] 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.
- [43] TSUJI Y, MAHARDIKA A, MATSUDA Y. Evolutionarily distinct strategies for the acquisition of inorganic carbon from seawater in marine diatoms [J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68: 3949-3958.



## Isolation and identification of the carbonic anhydrase gene *Sja-CA3* in *Saccharina japonica*

WENG Jiajian<sup>1</sup>, XU Ling<sup>1</sup>, WANG Wen<sup>1</sup>, BI Yanhui<sup>1,2</sup>, ZHOU Zhigang<sup>1,3</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic 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, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In this study, an expressed sequence tag (EST) belonging to the  $\alpha$ -type carbonic anhydrase (CA) was identified from the transcriptome database of *Saccharina japonica* gametophytes. This sequence shares 68.02% and 77.32% similarity with previously reported  $\alpha$ -CA family members in *S. japonica*, namely *Sja-CA1* and *Sja-CA2*, suggesting that it might be a new member of the  $\alpha$ -CA family, designated as *Sja-CA3*. Using RACE technology, the full-length cDNA sequence of *Sja-CA3* was obtained, measuring 1 469 bp in total and comprising an 840 bp open reading frame (ORF), a 332 bp 5'-untranslated region (UTR), and a 297 bp 3'-UTR. The *Sja-CA3* gene encodes a protein of 279 amino acid residues with a theoretical molecular weight of 31.19 ku and an isoelectric point of 4.85. Multiple sequence alignments indicate that the functional sites of *Sja-CA3* are highly conserved. Phylogenetic analysis shows that *Sja-CA3* clusters with  $\alpha$ -CA proteins from other algae with high confidence (99/81, NJ/ML), further supporting its classification within the  $\alpha$ -CA family. A pET32a-Sj $\alpha$ CA3 prokaryotic expression vector was constructed through heterologous recombination technology and introduced into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells. Following induction and purification, a recombinant protein (rSj $\alpha$ -CA3) with an approximate molecular weight of 45 ku was obtained. Enzyme activity assays revealed that rSj $\alpha$ -CA3 exhibits both hydration and esterase activities, with specific activities of 0.82 U/mg protein and 2.157 U/g protein, respectively. The successful isolation and identification of *Sja-CA3* provide crucial data for further analysis of its role in the inorganic carbon storage mechanism in *S. japonica*, as well as for advancing studies on the carbon concentrating mechanism (CCM) in this kelp.

**Key words:** *Saccharina japonica*; gametophyte; carbonic anhydrase; prokaryotic expression; enzyme activity assay