

## 综述 Reviews

## 微藻碳酸酐酶的特性及其环境调控

黄瑾<sup>1</sup>, 夏建荣<sup>1,\*</sup>, 邹定辉<sup>2</sup><sup>1</sup>广州大学环境科学与工程学院, 广州 510006; <sup>2</sup>华南理工大学环境科学与工程学院, 广州 510006

**摘要:** 本文概述微藻碳酸酐酶的性质、种类、分布、分离纯化和环境调控的研究进展, 并对未来有关微藻碳酸酐酶研究中需要探讨的问题作了展望。

**关键词:** 微藻; 碳酸酐酶; 环境调控

## Characteristics and Environmental Regulation of Carbonic Anhydrase in Microalgae

HUANG Jin<sup>1</sup>, XIA Jian-Rong<sup>1,\*</sup>, ZOU Ding-Hui<sup>2</sup><sup>1</sup>School of Environmental Science and Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; <sup>2</sup>College of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

**Abstract:** The advances in the characteristics, type, distribution, purification and environmental regulation of carbonic anhydrase in microalgae are outlined, and further researches for better understanding carbonic anhydrase in microalgae are prospected.

**Key words:** microalgae; carbonic anhydrase; environmental regulation

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)是一种含  $Zn^{2+}$  的金属酶, 在  $CO_2$  和  $HCO_3^-$  相互转化的可逆反应中起催化作用; 在水合作用时,  $CO_2$  在酶活性中心与  $Zn-OH$  反应, 而在脱水作用时,  $HCO_3^-$  与  $Zn-H_2O$  反应。此酶最初是在哺乳动物的红细胞中发现的, 并随后在鱼类、无脊椎动物、植物和微生物中相继发现。尽管催化同一化学反应, 但其在不同有机体中所起的生理作用存在较大差异, 它可以涉及离子交换、呼吸作用、pH 稳定性、二氧化碳浓缩机制以及光合作用的各个方面(Dieter 1998)。微藻是水体(包括湖泊、水库和海洋)环境中主要的初级生产者, 其光合固碳量约占全球总光合固碳量的 50%, 长期以来, 微藻光合固碳作用的研究一直是水生生物学和藻类学工作者非常关注的一个问题。与陆生高等植物一样, 核酮糖-1,5-二磷酸羧化氧化酶(Rubisco)也是藻类固定  $CO_2$  的关键酶, 藻类中 95% 以上的有机碳均是 Rubisco 所固定的。水体中微藻的光合固碳受两大天然因素的制约, 一方面, 微藻的 Rubisco 对  $CO_2$  的亲合力远比陆生高等植物的要小; 另一方面, 因为  $CO_2$  在水

中的扩散速率比空气中要慢一万倍, 水体中  $CO_2$  的供应少。但是水体中微藻的光合效率很高, 甚至比陆生高等  $C_4$  植物还要高, 其主要原因是其细胞内存在二氧化碳浓缩机制( $CO_2$  concentrating mechanism, CCM) (Badger 和 Price 1992; Raven 等 2008; Martin 和 Tortell 2008)。藻细胞既可以间接地通过质膜主动转运  $HCO_3^-$  进入胞液, 在胞液内通过碳酸酐酶的作用将  $HCO_3^-$  转变为  $CO_2$ ; 也可以直接通过胞外 CA 催化细胞表面的  $HCO_3^-$  转变为  $CO_2$ ,  $CO_2$  再以扩散作用进入细胞内, 经胞内和胞外 CA 的作用保持细胞内有稳定浓度的  $CO_2$  供给 Rubisco, 使藻细胞在  $CO_2$  浓度限制的环境中维持较高的光合作用效率。由此可见, CA 在藻类植物碳运输和碳代谢中起着非常重要的作用。本文简要介绍微藻碳酸酐酶的种类、定位、性质及其受到环境因子调控的

收稿 2009-09-14 修定 2010-05-14

资助 国家自然科学基金(40676079、40976078)和广州市植物抗逆基因功能研究重点实验室开放基金。

\* 通讯作者(E-mail: jrxia@gzhu.edu.cn; Tel: 020-39366937)。

研究进展。

### 1 微藻 CAs 的种类

单细胞微藻中有许多形式的CAs (Badger 2003; Moroney 等 2001)。至今已发现 5 种独立的类型, 包括  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\zeta$ - 和  $\delta$ -CA。尽管它们主要序列没有明显的相似性, 但其活性位点大多结合 1 个对其酶活性很重要的锌原子 (Moroney 等 2001; Soto 等 2006) 或者镉原子 (Lane 和 Morel 2000; Lane 等 2005; Soto 等 2006), 而且催化机制也都比较相似 (Badger 2003)。大多数  $\alpha$ -CAs 都是分子量为 30 kDa 左右的单体, 其酶活性部位的锌原子都有 3 个保守的组氨酸残基和 1 个水分子与之配位, 一般对磺胺类抑制剂很敏感 (Karlsson 等 1995)。所有的有活性的  $\beta$ -CAs 既有单体, 也可以是含有 1 个保守的组氨酸残基及 2 个半胱氨酸残基的杂合体, 杂合体中各残基分别与锌原子结合。 $\gamma$ -CAs 的结构与  $\alpha$ -CAs 和  $\beta$ -CAs 明显不同, 它是由相同亚单位组成的同型三聚体, 含有 3 个锌原子。与  $\alpha$ -CAs 相似,  $\gamma$ -CAs 活性部位的锌原子也有 3 个组氨酸残基和 1 个水分子与之配位, 但是其组氨酸残基含有 2 个单独的亚基。 $\gamma$ -CAs 也对磺胺类物质高度敏感 (Badger 2003)。近几年来在微藻中又陆续发现了新的 CA 种类, 包括  $\zeta$ - 和  $\delta$ -型 CAs。 $\zeta$ -CAs 存在于海链藻 (*Thalassiosira weissflogii* 和 *Thalassiosira pseudonana*) 中, 与  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -CAs 不同, 它是一种含镉的 CA, 具有镉结合位点且镉原子与 2 个或更多个硫醇盐结合, 与高等植物中的含锌 CA 的金属结合位点有 2 个半胱氨酸残基和 1 个组氨酸残基相类似 (Lane 等 2005; McGinn 和 Morel 2008)。 $\delta$ -CAs 是从海洋颗石藻 (*Emiliania huxleyi*) 中鉴定出来的。

### 2 微藻 CAs 的分离与纯化

探索合适的 CA 分离纯化方法对进一步研究其性质非常重要。芳香磺胺类物质是有效的 CA 特异性抑制剂, 早在 20 世纪 60 年代, 磺胺米隆 (sulfamylon, 对位氨基磺胺药物) 就已经作为亲和层析的非水溶性填料 (sulfamylon sepharose, 即 *p*-aminomethylbenzene sulfonamide-agarose, *p*-AMBS) 用于 CA 纯化。在温和的条件下, 用含有 CA 抑制剂的洗脱液能将 CA 洗脱下来, 以此达到分离纯化 CA 的目的 (Whitney 1974)。Yang 等 (1985) 方法的大致流程是: 高速离心收集微藻细胞  $\rightarrow$  30%~65% 硫酸铵分级沉

淀  $\rightarrow$  透析除盐  $\rightarrow$  *p*-AMBS 亲和层析  $\rightarrow$  透析除盐得到纯化的 CA。此后很多研究者对这一方法进行了一定程度的改良, 如 Satoh 等 (1998) 分离纯化耐热性小球藻 (*Chlorella sorokiniana*) CA 的方法过程大致是: DEAE-纤维素 A-500 离子交换层析  $\rightarrow$  与 HPLC 系统连接的 Econo-PacQ 离子交换层析  $\rightarrow$  *p*-AMBS 亲和层析; Satoh 等 (2001) 按照 Yang 等 (1985) 的方法研究三角褐指藻胞内 CA 的生理和分子特性时, 在硫酸铵分级沉淀后, 将样品依次通过 DEAE-sephacel 离子交换层析和 *p*-AMBS 亲和层析, 最后脱盐浓缩获得纯化的 CA 蛋白。总的来说, CA 的分离纯化最终少不了 *p*-AMBS 亲和层析这一步。

### 3 微藻 CAs 的性质

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 的 CA 是真核藻类中研究得最广泛的。已经发现莱茵衣藻中存在 6 种编码 CA 的基因, 包括 3 种  $\alpha$ -CAs 和 3 种  $\beta$ -CAs (Kucho 等 2003; Mitra 等 2004; Ynalvez 等 2008), 其中 2 种  $\alpha$  型胞外 CAs (Cah1 和 Cah2) 的核编码基因已得到鉴定, 它们的氨基酸序列有 91.8% 的相似性, 与动物 CA 有 20% 的相似性。每个基因都编码 2 个分子量大小不同的多肽, 即先翻译成分子量为 41.6 kDa 的前体, 随后加工成 1 个糖基化的分子量为 35~37 kDa 的大亚基和 1 个分子量为 4.1 kDa 的小亚基 (Mitra 等 2004)。Cah1 的转录受 2 个调节区域控制: 1 个在高浓度 CO<sub>2</sub> 条件或黑暗条件下抑制转录的沉默子区域和 1 个在低浓度 CO<sub>2</sub> 和光照条件下激活转录的增强子区域, 增强子区域中的 2 个增强子都有一段在激活中起主要作用的短而保守的 DNA 序列, 并且有与增强子相合的 DNA 结合蛋白 (Kucho 等 2003)。定位于叶绿体中类囊体膜内侧的  $\alpha$ -CA (Cah3), 其分子量为 29.5 kDa, 这种蛋白在细胞匀浆中主要以不溶性片段出现, 只有用高浓度氯化钾冲洗膜后才可溶解, 纯化的 Cah3 对磺胺类抑制剂很敏感 (Hanson 等 2003)。另外, 莱茵衣藻 2 种线粒体  $\beta$ -CAs ( $\beta$ -ca1 和  $\beta$ -ca2) 的氨基酸序列之间有 97% 的相似性, 各由 1 个反向重复序列构成 (Giordano 等 2003)。叶绿体  $\beta$ -CA Cah6 与其他 2 种线粒体  $\beta$ -CAs 不同, 核苷酸序列数据表明 Cah6 的 cDNA 包含一段 264 bp 的开放阅读框架, 它所编码的多肽的导肽序列能够将蛋白靶定到叶绿体基质上 (Mitra 等 2004)。

CAs在海洋微藻如三角褐指藻(*Phaeodactylum tricoratum*)、威氏海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)以及海洋颗石藻(*Emiliania huxleyi*)中均有报道。三角褐指藻的PtCA1属于 $\beta$ 型CA,分子量约为26 kDa,有1个完全保守的锌结合区域,由核基因编码。编码PtCA1的cDNA序列(*ptca1*)含有282个氨基酸,拥有一段138 bp的前体序列(pre138),pre138编码一段46个氨基酸的N端序列(Pre46AA),推测Pre46AA可作为PtCA1的引导信号,引导PtCA1在细胞中的定位。成熟的PtCA1蛋白由236个氨基酸组成,但不含有Pre46AA(Tanaka等2005; Sakaue等2008)。三角褐指藻的另一种 $\beta$ 型CA为PtCA2,其cDNA有一个819 bp的开放阅读框架(它编码一个273个氨基酸的多肽),其编码基因*PtCA2*与*PtCA1*有83%的相似性;PtCA2的氨基酸序列拥有完全保守的Zn结合残基。PtCA2 N末端的19个氨基酸序列是一种内质网靶定信号,蛋白可能定位在一种细胞器或周质空间中(Harada和Matsuda 2005; Kitao等2008)。威氏海链藻中有一种含锌的CA(TwCA1),通过克隆其相应的cDNA(*twca1*)后,发现其序列与其他藻类CA不同,编码分子量约为34 kDa的蛋白,TwCA1氨基末端的氨基酸序列由起始蛋氨酸和其下游的72个氨基酸残基组成。这些差异可能由于存在一个短期的信号序列,可以引导酶进行正确的细胞定位(Roberts等1997)。威氏海链藻中还存在着一种含镉的 $\zeta$ -CA(CdCA1),其蛋白分子量约为69 kDa(Lane等2005)。从中肋骨条藻已分离鉴定出位于细胞膜外侧的CA,其分子量约为30 kDa(Nimer等1999)。颗石藻中含有2种独特的CA,分别属于 $\gamma$ 和 $\delta$ 类的CA(分别为 $\gamma$ -EhCA2和 $\delta$ -EhCA1)(Soto等2006), $\delta$ -EhCA1的cDNA编码一种含有702个氨基酸的蛋白,分子量为77.3 kDa,含有373个氨基酸的跨膜N端区域和329个氨基酸的C端开放阅读框架。 $\gamma$ -EhCA2蛋白有235个氨基酸,分子量为24.9 kDa。在评价颗石藻CA的生物学作用问题上,以前的研究都认为这些酶在多种非光合或与钙化不相关的功能中起作用,而忽视了这些CA在碳代谢、离子转运、pH动态平衡和钙化的中间过程中所表现出来的作用。至于这些CA的进化、结构和机制差异尚待进一步研究(Soto等2006)。

#### 4 微藻 CAs 的定位

根据CA在细胞内外的分布差异,可分为胞外CA(extracellular CA)和胞内CA(intracellular CA)。胞外CA常分布于细胞的周质空间(periplasmic space),胞内CA的分布常因细胞种类的不同而不同,现已发现的有:叶绿体CA(chloroplast CA, cCA)、线粒体CA(mitochondria CA, mCA)和细胞质CA(cytoplasm CA, cpCA)(Nimer等1998)。

**4.1 周质空间CA(periplasmic CA, pCA)** 一般天然海水的pH为7.8~8.3,其中的无机碳以碳酸氢根形式为主,而游离的CO<sub>2</sub>浓度很低,不足以维持微藻的光合作用,pCA能使海洋中大量的HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>转化为CO<sub>2</sub>,因而使得微藻细胞可充分利用胞外无机碳(Dieter 1998)。

**4.2 叶绿体CA(chloroplast CA, cCA)** 用传统方法很难测出cCA活性,一般用<sup>18</sup>O交换质谱以及77K荧光光谱和免疫学技术联合才可检测出cCA的存在(van Hunnik等2001; Park等1999; Villarejo等2001)。莱茵衣藻的一种 $\alpha$ -CA(Cah3)定位于类囊体膜内侧,与光系统II(PS II)相耦联,其CCM的启动和维持依赖于PS II介导的电子传递所引起的跨类囊体膜的pH梯度,因此可以推测类囊体膜介导的CCM是由PS II驱动的,并由与PS II相耦联的CA催化(Park等1999; Villarejo等2001)。Cah3的主要功能是催化类囊体内腔的HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>水解,可为定位于叶绿体蛋白核中的Rubisco提供充足的CO<sub>2</sub>。大部分绿藻的Rubisco存在于蛋白核中,cCA可能与蛋白核结构相关联,就象蓝藻有些胞内CAs特异定位在接近Rubisco的羧体中一样。普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)有一种与蛋白核有关的胞内CA,可能在其CCM机制和适应低浓度CO<sub>2</sub>的过程中起作用(Villarejo等1998)。

**4.3 线粒体CA(mitochondria CA, mCA)** 有实验表明,线粒体CA可能参与为磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化反应提供HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>,也为氮同化提供碳骨架(Giordano等2003)。莱茵衣藻的 $\beta$ -CAs( $\beta$ -ca1和 $\beta$ -ca2)可能在呼吸作用和光呼吸的CO<sub>2</sub>循环中起作用,将线粒体中的CO<sub>2</sub>转化为HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>,HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>流回到细胞质,再转运到叶绿体基质中。

**4.4 细胞质CA(cytoplasm CA, cpCA)** cpCA的种类相对较少,至今只发现在少数种类的植物中存在,

如在单细胞绿藻 *Coccomyxa* 中发现定位于细胞质中的  $\beta$ -CA, 此酶的天然形式是一种分子量大小为 100 kDa 的同型四聚体(Dieter 1998), 但其生理作用尚不清楚。

## 5 环境调控对微藻 CAs 的影响

CA 在微藻光合固碳中具有比较重要的作用, 其活性与光合效率直接相关, 微藻中 CA 活性的调控一直是 CA 研究中的一个重点问题。CA 活性受多种环境因素的调控, 如  $\text{CO}_2$  浓度、光照、pH 值、温度以及金属元素等。

**5.1  $\text{CO}_2$  浓度** 单细胞微藻有多种形式的 CA, 其表达受环境中  $\text{CO}_2$  水平的影响(Badger 2003)。小球藻(*Chlorella saccharophila*) 在低  $\text{CO}_2$  浓度条件下, CA 受诱导, 胞外活性明显升高, 而在较高  $\text{CO}_2$  条件下活性受抑制(Beuf 等 2000; Williams 和 Colman 1993)。莱茵衣藻 Cah1 在高浓度  $\text{CO}_2$  (5%) 培养下表达受抑制, 转入低浓度  $\text{CO}_2$  (0.04%) 后, 1 h 内此酶的表达被激活(Karlsson 等 1995; Kucho 等 2003); 而 Cah2 在低浓度  $\text{CO}_2$  条件下表达很少, 在高浓度  $\text{CO}_2$  条件下有轻微的增加(Karlsson 等 1995)。小球藻(*Chlorella vulgaris*) 从高浓度  $\text{CO}_2$  (5%) 转移到低浓度  $\text{CO}_2$  (0.03%) 后, 胞内 CA 活性 6 h 内增加了 6~7 倍(Villarejo 等 1998)。莱茵衣藻  $\beta$ -cCA (Cah6) 在低浓度  $\text{CO}_2$  (空气) 条件下的表达仅有轻微提高(Mitra 等 2004), 而它的 2 种  $\beta$  型 mCA ( $\beta$ -ca1 和  $\beta$ -ca2) 的表达明显受生长过程中  $\text{CO}_2$  浓度的影响, 即在低浓度  $\text{CO}_2$  下被大量诱导, 而在高浓度  $\text{CO}_2$  下则受抑制(Giordano 等 2003)。三角褐指藻中一种定位于叶绿体基质中的  $\beta$ -CA (PtCA1) 在大气  $\text{CO}_2$  浓度水平下培养是引发 *ptca1* 的转录所必需的(Harada 等 2005)。通过改变周围的  $\text{CO}_2$  浓度, 在转录水平上调控其编码基因的表达, 即通过滤空气培养的细胞中 CA 基因转录水平比 5%  $\text{CO}_2$  培养的细胞高 5~10 倍(Satoh 等 2001)。中肋骨条藻的 pCA 只有当  $\text{CO}_2$  浓度低于  $5 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-3}$  时才能检测到(Nimer 等 1998)。

**5.2 光照** 莱茵衣藻 CA 活性的诱导与光合作用中的能量流动速率有关, 有人推测光在 CA 转录水平上的调节中是必需的, 同时还发现 CA 转录调节过程中存在一种蓝光的促进机制(Dionisio-Sese 等 1990)。高光强对于铜绿微囊藻(*Microcystis aeru-*

*ginosa*) 的生长并不是最有利的, 但是 CA 活性仍然受高光强所诱导(王山杉等 2006)。Harada 和 Matsuda (2005) 将三角褐指藻从 5%  $\text{CO}_2$  条件下转入通空气 (0.035%  $\text{CO}_2$ ) 培养后, 不论在光照还是在黑暗条件下, 都会引发其  $\beta$ -CA (PtCA1) 基因 *ptca1* 的转录, 但黑暗条件下的 mRNA 含量比光照条件下减少 50%, 表明  $\text{CO}_2$  浓度是引发 *ptca1* 转录的必需条件, 而光照影响则能调控其转录强度。

**5.3 pH** 一些淡水微藻, 如莱茵衣藻、小球藻(*Chlorella saccharophila*、*Chlorella regularis* 和 *Chlorella ellipsoidea*), 它们的 pCA 诱导和活性在酸性条件(pH 4.5) 下均受到抑制(Fett 和 Coleman 1994; Gehl 等 1990; Shiraiwa 等 1991; Williams 和 Colman 1993)。Beuf 等(2000) 比较了酸性和碱性条件下绿球藻(*Chlorococcum littorale*) 的 pCA 活性, 发现 pH 可能只影响其 CA 活性水平, 而不能阻止 CA 酶的诱导。Janette 和 John (1994) 认为酸性 pH 下的胞外 CA 活性之所以明显低于碱性 pH 下的则是由于 pH 值影响无机碳的存在形式。在酸性 pH 条件下, 培养液中无机碳主要以  $\text{CO}_2$  形式存在, 有足够的  $\text{CO}_2$  进入细胞内, 因此胞外 CA 活性低; 在碱性 pH 条件下无机碳主要以  $\text{HCO}_3^-$  形式存在, 必需依靠胞外 CA 催化  $\text{HCO}_3^-$  方可转化成  $\text{CO}_2$ , 以满足细胞的需要。测定莱茵衣藻在不同 pH 值下 pCA 的活性变化表明, 在 pH 7.2 时的 pCA 活性最高, 而 pH 5.5 时 pCA 活性明显低于 pH 7.2 时和 pH 9.0 时的活性(陈雄文等 2000); 高 pH 下培养的铜绿微囊藻有较高的 CA 活性, 当 pH 为 9.0 时, CA 活性约是 pH 8.0 时的 2 倍(王山杉等 2006)。pH 值对 CA 活性的调节作用, 可能是通过 pH 控制水中  $\text{CO}_2$  的供应来实现的。当然也有可能是 pH 的直接作用, 对此问题尚待进一步研究。

**5.4 温度** 水温不仅会影响微藻的生长和呼吸速率, 而且还会影响水中氧的溶解度, 同时也会影响 CA 的活性。例如, 在逐渐降低  $\text{CO}_2$  浓度从 3% 到 0.04% 的条件下, 随着温度的升高, 小球藻(*Chlorella vulgaris*) 的 CA 活性明显上升, 在 32~37  $^{\circ}\text{C}$  下达到最大值(Shiraiwa 和 Miyachi 1985)。高温(30  $^{\circ}\text{C}$ ) 下培养的铜绿微囊藻具有较高的胞外 CA 活性(王山杉等 2006)。

**5.5 金属元素** 锌是 CA 的组成元素, 因此微藻的

CA活性对锌很敏感。锌浓度会影响固氮鱼腥藻(*Anabaena azotica*)的CA活性(王山杉等2002);当 $Zn^{2+}$ 浓度从0增加到 $12\text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,中肋骨条藻的pCA和胞内CA活性也随之增加(Hu等2003)。Lane和Morel(2000)报道,海洋硅藻的CA受低浓度 $CO_2$ 的诱导,诱导水平依赖于 $Zn^{2+}$ 的浓度。在海洋硅藻中,金属元素钙、镉、锌在功能上可以互相替代,以维持藻的最佳生长和CA在CCM中的作用(Lane和Morel 2000; Lane等2005; Xu等2008)。

## 6 结语

以淡水绿藻莱茵衣藻和海洋硅藻三角褐指藻为模式藻类研究CA在藻类光合固碳和无机碳浓缩机制中作用已取得了一定的进展,但还有许多问题仍值得进一步探讨:(1)一些具有重要生态学意义的藻类,特别是水华蓝藻和海洋赤潮藻类爆发的时候,水体中 $CO_2$ 浓度变得很低,其光合固碳可能更需要依赖CA的存在和作用,爆发过程中藻类的后期生存也可能与CA有密切关系,因此研究水华蓝藻和海洋赤潮藻类CA的功能及其表达调控的分子机制对揭示其生存策略具有重要的生态学意义;(2)研究微藻CA酶蛋白分子结构与酶活性的关系,特别是以其他金属离子取代锌离子后可能造成CA结构和活性的变化,从而影响微藻在环境中的生存;(3)现有CA的环境调控研究一般都是从单个环境因子获得的结果,而环境因子的综合效应研究较少,因此多种环境因子对微藻CA的协同调控作用研究也值得重视。

## 参考文献

- 陈雄文, 戴新宾, 张荣铤(2000). pH值和氮素对莱氏衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)胞外碳酸酐酶活性的影响. 南京农业大学学报, 23(1): 27~29
- 王山杉, 刘永定, 金传荫, 李敦海(2002).  $Zn^{2+}$ 浓度对固氮鱼腥藻(*Anabaena azotica* Ley)光能转化特性的影响. 湖泊科学, 14(4): 350~356
- 王山杉, 刘永定, 邹永东, 李敦海(2006). 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, 26(8): 2443~2448
- Badger M (2003). The roles of carbonic anhydrases in photosynthetic  $CO_2$  concentrating mechanisms. *Photosyn Res*, 77: 83~94
- Badger MR, Price GD (1992). The  $CO_2$  concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. *Physiol Plant*, 84: 606~615
- Beuf L, Kurano N, Miyachi S (2000). Effect of external pH on inorganic carbon assimilation in unicellular marine green algae. *Phycol Res*, 48: 47~54
- Dieter S (1998). Carbonic anhydrase in eukaryotic algae: characterization, regulation, and possible function during photosynthesis. *Can J Bot*, 76: 962~972
- Dionisio-Sese ML, Fukuzawa H, Miyachi S (1990). Light-induced carbonic anhydrase expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 94: 1103~1110
- Fett JP, Coleman JR (1994). Regulation of periplasmic carbonic anhydrase expression in *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate and pH. *Plant Physiol*, 106: 103~108
- Gehl KA, Colman B, Sposato LM (1990). Mechanism of inorganic carbon uptake in *Chlorella saccharophila*: the lack of involvement of carbonic anhydrase. *J Exp Bot*, 41: 1385~1391
- Giordano M, Norici A, Forssen M, Eriksson M, Raven JA (2003). An anaplerotic role for mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 132: 2126~2134
- Hanson DT, Franklin LA, Samuelsson G, Badger MR (2003). *Chlamydomonas reinhardtii cia3* mutant lacking a thylakoid lumen-localized carbonic anhydrase is limited by  $CO_2$  supply to rubisco and not photosystem II function *in vivo*. *Plant Physiol*, 132: 2267~2275
- Harada H, Matsuda Y (2005). Identification and characterization of a new carbonic anhydrase in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Can J Bot*, 83: 909~916
- Harada H, Nakatsuma D, Ishida M, Matsuda Y (2005). Regulation of the expression of intracellular  $\beta$ -carbonic anhydrase in response to  $CO_2$  and light in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol*, 139: 1041~1050
- Hu H, Shi Y, Cong W, Cai Z (2003). Growth and photosynthesis limitation of marine red tide alga *Skeletonema costatum* by low concentrations of  $Zn^{2+}$ . *Biotech Lett*, 25: 1881~1885
- Janette PF, John RC (1994). Regulation of periplasmic carbonic anhydrase expression in *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate and pH. *Plant Physiol*, 106: 103~108
- Karlsson J, Hilttonen T, Husic HD, Ramazanov Z, Samuelsson G (1995). Intracellular carbonic anhydrase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 109: 533~539
- Kitao Y, Harada H, Matsuda Y (2008). Localization and targeting mechanisms of two chloroplastic-carbonic anhydrases in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Physiol Plant*, 133: 68~77
- Kucho K, Yoshioka S, Taniguchi F, Ohyama K, Fukuzawa H (2003). *Cis*-acting elements and DNA-binding proteins involved in  $CO_2$ -responsive transcriptional activation of *Cahl* encoding a periplasmic carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 133: 783~793
- Lane TW, Morel FMM (2000). Regulation of carbonic anhydrase expression by zinc, cobalt, and carbon dioxide in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Plant Physiol*, 123: 345~352
- Lane TW, Saito MA, George GN, Pickering IJ, Prince RC, Morel FMM (2005). A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, 435: 42~45
- Martin CL, Tortell PD (2008). Bicarbonate transport and extracellular carbonic anhydrase in marine diatoms. *Physiol Plant*,

- 133: 106~116
- McGinn PJ, Morel FMM (2008). Expression and regulation of carbonic anhydrases in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* and in natural phytoplankton assemblages from Great Bay, New Jersey. *Physiol Plant*, 133: 78~91
- Mitra M, Lato SM, Ynalvez RA, Ying X, Moroney JV (2004). Identification of a new chloroplast carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 135: 173~182
- Moroney JV, Bartlett SG, Samuelsson G (2001). Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell Environ*, 24: 141~153
- Nimer NA, Miao XL, Brownlee C, Merrett MJ (1999). Inorganic carbon limitation, exofacial carbonic anhydrase activity, and plasma membrane redox activity in marine phytoplankton species. *J Phycol*, 35: 1200~1205
- Nimer NA, Warrenz M, Merrett MJ (1998). The regulation of photosynthetic rate and activation of extracellular carbonic anhydrase under CO<sub>2</sub>-limiting conditions in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Plant Cell Environ*, 21: 805~812
- Park Y, Karlsson J, Rojdestvenski I, Pronina N, Klimov V, Öquist G, Samuelsson G (1999). Role of novel photosystem II-associated carbonic anhydrase in photosynthetic carbon assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett*, 444: 102~105
- Raven JA, Giordano M, Beardall J (2008). Insights into the evolution of CCMs from comparisons with other resource acquisition and assimilation processes. *Physiol Plant*, 133: 4~14
- Roberts SB, Lane TW, Morel FMM (1997). Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J Phycol*, 33: 845~850
- Sakaue K, Harada H, Matsuda Y (2008). Development of gene expression system in a marine diatom using viral promoters of a wide variety of origin. *Physiol Plant*, 133: 59~67
- Satoh A, Iwasaki T, Odani S, Shiraiwa Y (1998). Purification, characterization and cDNA cloning of soluble carbonic anhydrase from *Chlorella sorokiniana* grown under ordinary air. *Planta*, 206: 657~665
- Satoh D, Hiraoka Y, Colman B, Matsuda Y (2001). Physiological and molecular biological characterization of intracellular carbonic anhydrase from the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. *Plant Physiol*, 126: 1459~1470
- Shiraiwa Y, Miyachi S (1985). Effects of temperature and CO<sub>2</sub> concentration on induction of carbonic anhydrase and changes in efficiency of photosynthesis in *Chlorella vulgaris* 11h. *Plant Cell Physiol*, 26: 543~549
- Shiraiwa Y, Yokoyama S, Satoh A (1991). pH-dependent regulation of carbonic anhydrase induction and change in photosynthesis during adaptation of *Chlorella* cells to low CO<sub>2</sub>. *Jpn J Phycol*, 39: 355~362
- Soto AR, Zheng H, Shoemaker D, Rodriguez J, Read BA, Wahlund TM (2006). Identification and preliminary characterization of two cDNAs encoding unique carbonic anhydrase from the marine alga *Emiliania huxleyi*. *Appl Environ Microb*, 72 (8): 5500~5511
- Tanaka Y, Nakatsuma D, Harada H, Ishida M, Matsuda Y (2005). Localization of soluble β-carbonic anhydrase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. Sorting to the chloroplast and cluster formation on the girdle lamellae. *Plant Physiol*, 138: 207~217
- van Hunnik E, Livne A, Pogenberg V, Spijkerman E, vanden Ende H, Garcia Mendoza E, Sültemeyer D, de Leeuw JW (2001). Identification and localization of a thylakoid-bound carbonic anhydrase from the green algae *Tetraedron minimum* (Chlorophyta) and *Chlamydomonas noctigama* (chlorophyta). *Planta*, 212: 454~459
- Villarejo A, Isabel Orús MI, Ramazanov Z, Martínez F (1998). A 38-kilodalton low-CO<sub>2</sub>-inducible polypeptide is associated with the pyrenoid in *Chlorella vulgaris*. *Planta*, 206: 416~425
- Villarejo A, Rolland N, Martinez F, Sültemeyer DF (2001). A new chloroplast envelope carbonic anhydrase activity is induced during acclimation to low inorganic carbon concentrations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 213: 286~295
- Whitney PL (1974). Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Anal Biochem*, 57: 467~476
- Williams TG, Colman B (1993). Identification of distinct internal and external isozymes of carbonic anhydrase in *Chlorella saccharophila*. *Plant Physiol*, 103: 943~948
- Xu Y, Feng L, Jeffrey PD, Shi Y, Morel FMM (2008). Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*, 452: 56~62
- Yang SY, Tsuzuki M, Miyachi S (1985). Carbonic anhydrase of *Chlamydomonas*: purification and studies on its induction using antiserum against *Chlamydomonas* carbonic anhydrase. *Plant Cell Physiol*, 26(1): 25~34
- Ynalvez RA, Xiao Y, Ward AS, Cunnusamy K, Moroney JV (2008). Identification and characterization of two closely related carbonic anhydrases from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol Plant*, 133: 15~26