

芸薹属中几个物种碳酸酐酶活性的比较

邓秋红, 甘露, 付春华, 栗茂腾*, 余龙江*

华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074

摘要: 检测芸薹属中几种植物的碳酸酐酶在根、茎、叶中的分布和活性以及叶片净光合速率和锌元素含量的结果表明: 碳酸酐酶在甘蓝型油菜的根、茎、叶中均有分布, 叶中的碳酸酐酶活性最大, 茎中的次之, 根中的最小。不同芸薹属植物中碳酸酐酶活性的大小依序为: 甘蓝型油菜>白菜型油菜>芜菁>埃塞俄比亚芥。以甘蓝型油菜为例, 碳酸酐酶活性的日变化呈双峰曲线, 在整个生育期的变化趋势是先上升后下降, 抽薹期间的碳酸酐酶活性最高。碳酸酐酶活性与净光合速率以及与锌元素含量之间均呈现显著的正相关。

关键词: 芸薹属; 甘蓝型油菜; 碳酸酐酶活性; 净光合速率; 锌含量

Comparison of Carbonic Anhydrase Activities of Several Species in *Brassica*

DENG Qiu-Hong, GAN Lu, FU Chun-Hua, LI Mao-Teng*, YU Long-Jiang*

College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

Abstract: The distribution and activities of carbonic anhydrases (CA) in root, stem, and leaf of several species in *Brassica* were studied in order to determine the correlations between CA activity with net photosynthetic rate or zinc content. It was showed that CAs were distributed extensively in root, stem, and leaf of *Brassica*. CA activity was much higher in leaves than that in roots or stems, while enzyme activity in roots was the lowest. Considering different species in *Brassica*, CA activities in leaves were descending with the range as *B. napus* L., *B. campestris* L., *B. rapa* L., and *B. carinata* L. The diurnal variation of CA activity in *B. napus* leaves showed the double-peak curve during whole growth period, which reached its maximum at the bolting stage. It could be concluded that CA activity had positive correlation with net photosynthetic rate and zinc content, respectively.

Key words: *Brassica*; *Brassica napus*; carbonic anhydrase activity; net photosynthetic rate; zinc content

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, EC4.2.1.1)是一种含锌金属酶, 其活性中心有一个催化所必需的锌原子, 催化CO₂的可逆水合反应, 转化常数高达10⁶ (Tripp 等 2001; Smith 和 Ferry 2000)。碳酸酐酶参与多种生物过程, 包括: pH 调节、离子交换、CO₂ 转运、呼吸作用、生物合成和光合 CO₂ 固定。到目前为止, 除了真菌以外, 其他生物体中都已经发现了碳酸酐酶的存在(Smith 等 1999; Thoms 2002; Lindskog 1997)。碳酸酐酶的广泛分布以及其催化的反应具有特别的生物学地位, 这预示碳酸酐酶可能具有人们无法想象的作用和功能。

碳酸酐酶在所有利用 CO₂ 进行光合作用的绿色植物当中都存在, 从藻类, 蕨类到高等被子植物都含有碳酸酐酶, 而且含量还相当可观, 有些植物中碳酸酐酶约占可溶性蛋白的 2% (Okabe 等 1984)。植物的碳酸酐酶主要存在于绿色组织中, 豌豆幼苗叶片的碳酸酐酶活性是茎的10倍, 虽然根瘤含有一定量的碳酸酐酶, 但根中几乎无碳酸酐酶活性, 黄化叶片中碳酸酐酶的活性也较低。高等植

物种间的碳酸酐酶活性差别很大。C₃ 和 C₄ 植物中均含有碳酸酐酶, 其中 C₃ 植物中的碳酸酐酶活性比 C₄ 植物中的要高很多(Everson 和 Slack 1968)。C₃ 植物中碳酸酐酶主要分布在叶绿体内, 95%以可溶性的游离蛋白酶形式存在(Poincelot 1972), 内囊体膜含有少部分碳酸酐酶活性(Stemler 1986), 叶绿体膜上无碳酸酐酶活性, 细胞质中碳酸酐酶含量很少。而 C₄ 植物细胞质中却含有较高的碳酸酐酶活性。碳酸酐酶是有些植物固定 CO₂ 所必需的, 但对植物碳酸酐酶的研究仅限于少数几种植物, 主要是豆类(Johansson 和 Forsman 1993; Moskvin 2000)、玉米(Lu 和 Stemler 2002)、菠菜(Rowlett 等 1994)、胡萝卜(Demir 等 1997)等农作物, 对其碳酸酐酶的一些酶学特性包括动力学等都有较多的研究。本

收稿 2009-03-30 修定 2009-05-20

资助 国家“863”计划(2009AA101105)和华中科技大学研究基金(2006Q056B)。

* 通讯作者(E-mail: yulongjiang@mail.hust.edu.cn, limao teng426@163.com; Tel: 027-87792264)。

文研究芸薹属不同植物、同一植物不同部位(如甘蓝型油菜的根茎叶)以及同一植物同一部位不同时间(如甘蓝型油菜叶中的日变化和不同生育期的变化)的碳酸酐酶活性,以期为深入研究碳酸酐酶活性在油菜品种间的差异和筛选高产优质的油菜品种奠定基础。另外还研究了碳酸酐酶活性与锌元素、净光合速率之间的关系,为探讨碳酸酐酶在植物光合作用中的功能提供参考。

材料与方法

材料为芸薹属的甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)、白菜型油菜(*Brassica campestris* L.)、埃塞俄比亚芥(*Brassica carinata* L.)和芜菁(*Brassica rapa* L.),种植在试验田中,采光通风良好。取甘蓝型油菜苗期的新鲜根、茎、叶测定碳酸酐酶活性。并在2007年10月至2008年5月测定4个不同生育时期的碳酸酐酶活性、光合作用和锌含量。

上午9:00在田间采集新鲜叶片,均取自第一片完全展开叶下数第2、3片功能叶。取2片叶子测定光合速率、碳酸酐酶活性和金属元素含量。

叶中碳酸酐酶的提取参照 Hatch 和 Burnell (1990)文中的方法略作修改。取田间的新鲜叶片0.5 g,立即于液氮中研磨,加5 mL提取缓冲液(50 mmol·L⁻¹ Hepes-KOH 含 10 mmol·L⁻¹ DTT, pH=8.2)。以12 000×g离心10 min,取上清液并储存在4 °C中待测。

碳酸酐酶活性的测定参照Brownell等(1991)文中方法略作改进,于4 °C的冷冻反应室中,加入5

mL缓冲液(20 mmol·L⁻¹ 巴比妥-KOH, pH=8.3)和0.5 mL经过煮沸或未煮沸的样品液,打开磁力搅拌器持续搅拌混合均匀,再用注射器注入4.5 mL冰冷的CO₂饱和水(蒸馏水在0 °C冰水混合物中充CO₂气体1 h获得)时反应开始,测定H₂O+CO₂→HCO₃⁻+H⁺过程中导致的pH下降,用梅特勒pHs-320S酸度计监测pH从8.3下降到7.3所需的时间。碳酸酐酶的活性单位(U)计算公式为: $U=10 \times (T_0/T-1)$, 其中T₀和T分别为煮沸杀死的样品液和未煮沸的样品液测得的pH变化所需的时间。碳酸酐酶活性以每克新鲜叶片(或根、茎)含有的酶活单位数表示[U·g⁻¹(FW)]。所有数据均为3次测量的平均值。

用消解法-原子吸收光谱法测定金属元素含量。具体方法为:用双蒸水洗净植物叶片,吸干水分,放至烘箱60 °C烘烤48 h,用玛瑙研钵研成粉末,过200目塑料尼龙筛,用ETHOS-T高压微波消解/萃取仪进行消解,消解液稀释后定容至10 mL。元素分析时稀释消解液至适当浓度,用WFX-110原子吸收分光光度计测定其含量。

用英国PPSystem公司生产的TPS-1便携式光合作用测定仪测定净光合速率。

数据用Origin 6.1作图,并用SPSS 15.0软件进行统计分析。

结果与讨论

1 碳酸酐酶活性在油菜中的分布

图1和2结果表明:(1)11种甘蓝型油菜根茎叶中的碳酸酐酶活性各不相同,且每一种油菜的根

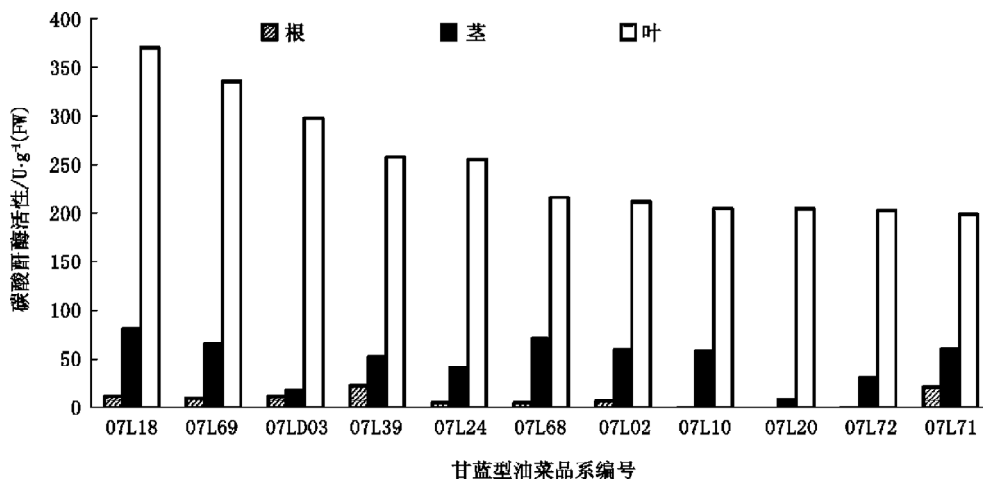


图1 碳酸酐酶在不同甘蓝型油菜的根茎叶中的分布

Fig.1 The distribution of carbonic anhydrases in root, stem and leaf of different *Brassica napus* lines

茎叶中的碳酸酐酶活性是叶片中的最大, 茎中的居中, 根中的最小(图1); (2)碳酸酐酶活性的大小顺

序为: 甘蓝型油菜>白菜型油菜>芜菁>埃塞俄比亚芥(图2)。这与吴沿友等(2006a)的结果相似。

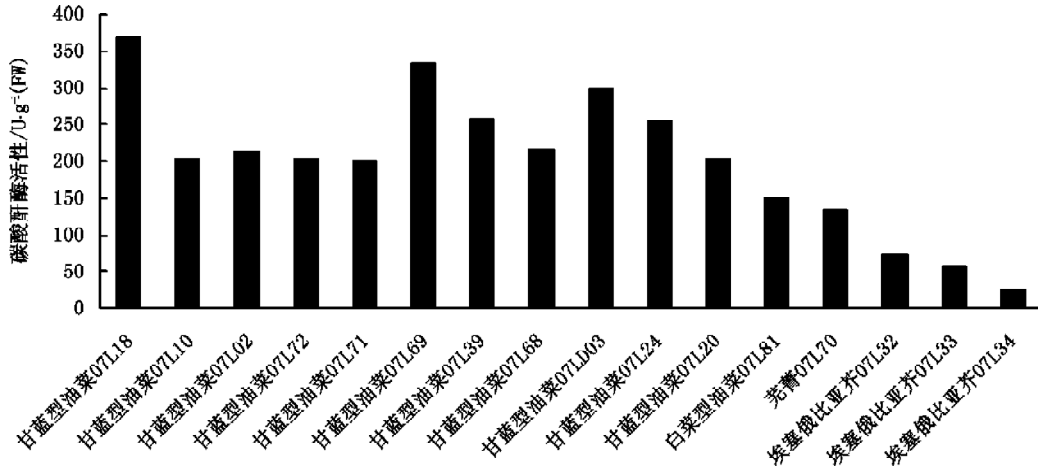


图2 不同类型油菜叶中的碳酸酐酶活性比较

Fig.2 Comparison of carbonic anhydrase activities in leaves of different species of *Brassica*

2 油菜叶中碳酸酐酶活性的日变化

从图3可以看出, 甘蓝型油菜07L20叶中碳酸酐酶活性在1d之内呈双峰曲线变化, 在11:00左右出现最高峰, 14:00左右有一低谷, 16:00左右又有回升, 而后一直下降。这与净光合速率日变化相似。

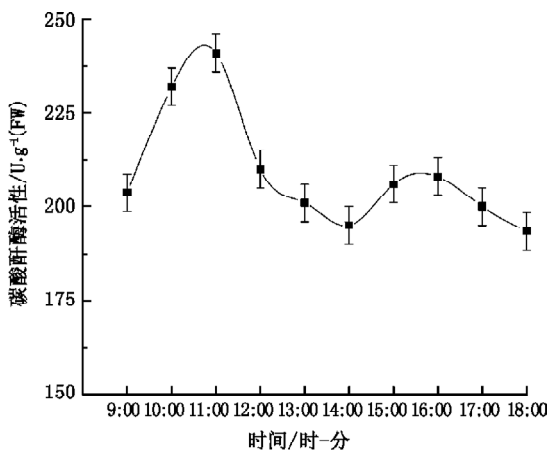


图3 甘蓝型油菜叶中碳酸酐酶活性的日变化

Fig.3 The diurnal change of carbonic anhydrase activity in *B. napus* leaves

此外, 于苗期、抽薹期、开花期和角果成熟期分别取样测定碳酸酐酶活性的结果表明, 总的趋势是先升高后下降。苗期油菜叶中活性较高, 抽薹

期活性达到最高, 而后下降, 角果成熟期活性降至最低。就同一时期而言, 07L04 (甘蓝型油菜)和07L32 (埃塞俄比亚芥)的碳酸酐酶活性始终很低, 而07L24 (甘蓝型油菜)的碳酸酐酶活性则很高(图4)。

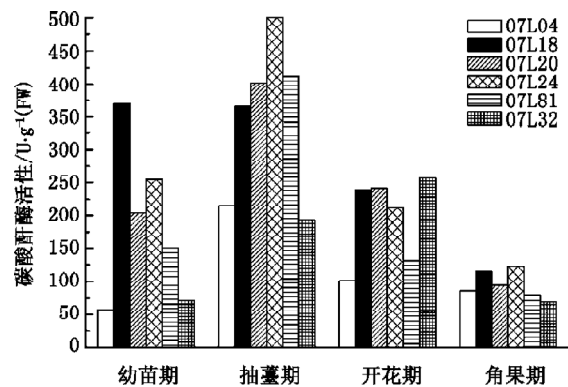


图4 整个生育期过程中不同类型油菜叶中碳酸酐酶的活性变化

Fig.4 Changes of carbonic anhydrase activity in leaves of different *Brassica* species during whole growth period

3 油菜的碳酸酐酶活性与锌元素含量及净光合速率之间的关系

碳酸酐酶活性与净光合速率的变化之间呈明显的正相关(图5), 相关系数 r 为0.999 ($P < 0.01$), 达到极显著水平。这与吴沿友等(2006b)的结果基本上一致。碳酸酐酶活性与锌元素含量的变化之间

也呈明显的正相关(图6), 相关系数 r 为 0.953 ($P < 0.05$), 达到显著水平。

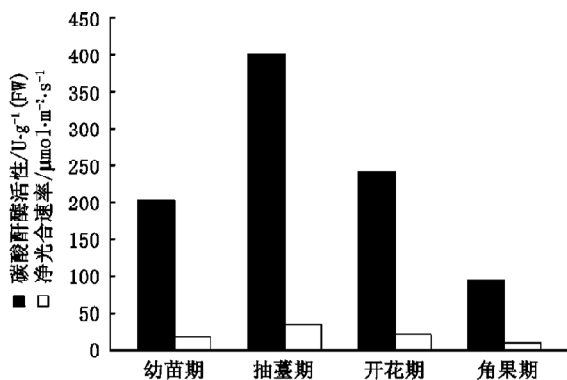


图5 全生育期间甘蓝型油菜叶中碳酸酐酶活性和净光合速率的变化

Fig.5 Changes of carbonic anhydrase activity and net photosynthetic rate of *B. napus* leaves during whole growth period

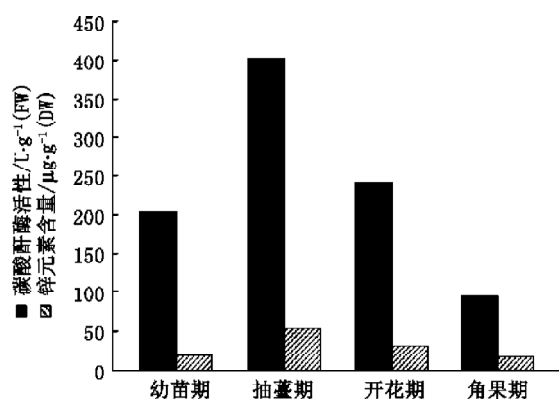


图6 全生育期间甘蓝型油菜叶中碳酸酐酶活性和锌元素含量的变化

Fig.6 Changes of carbonic anhydrase activity and zinc content of *B. napus* leaves during whole growth period

参考文献

吴沿友, 李西腾, 郝建朝, 李萍萍, 王宝利(2006a). 不同植物的碳酸酐酶活力差异研究. 广西植物, 26 (4): 366~369

吴沿友, 张红萍, 吴德勇, 刘建, 李国祥(2006b). 植物叶片和角果

的碳酸酐酶与光合速率的关系研究. 西北植物学报, 26 (10): 2094~2098

Brownell PF, Bielig LM, Grof CPL (1991). Increased carbonic anhydrase activity in leaves of sodium-deficient C_4 plants. Aust J Plant Physiol, 18: 589~592

Demir N, Demir Y, Yildirim A (1997). Carbonic anhydrases from leaves and roots of *Daucus carota*. Phytochemistry, 44 (7): 1247~1250

Everson RG, Slack CR (1968). Distribution of carbonic anhydrase in relation to the C_4 pathway of photosynthesis. Phytochemistry, 7: 581~584

Hatch MD, Burnell JN (1990). Carbonic anhydrase activity in leaves and its role in the first step of C_4 photosynthesis. Plant Physiol, 93 (2): 825~828

Johansson IM, Forsman C (1993). Kinetic studies of pea carbonic anhydrase. Euro J Biochem, 218 (2): 439~446

Lindskog S (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. Pharmacol Therapeut, 74 (1): 1~20

Lu YK, Stemler AJ (2002). Extrinsic photosystem II carbonic anhydrase in maize mesophyll chloroplasts. Plant Physiol, 128 (2): 643~649

Moskvin OV, Ivanov BN, Ignatova LK, Kollmeier MA (2000). Light-induced stimulation of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids. FEBS Lett, 470 (3): 375~377

Okabe K, Yang SY, Tsuzuki M, Miyachi S (1984). Carbonic anhydrase: Its content in spinach leaves and its taxonomic diversity studied with anti-spinach leaf carbonic anhydrase antibody. Plant Sci Lett, 33 (2): 145~153

Poincelot RP (1972). Intracellular distribution of carbonic anhydrase in spinach leaves. Biochim Biophys Acta, 258 (2): 637~642

Rowlett RS, Chance MR, Wirt MD, Sidelinger DE, Royal JR, Woodroffe M, Wang YFA, Saha RP, Lam MG (1994). Kinetic and structural characterization of spinach carbonic anhydrase. Biochemistry, 33 (47): 13967~13976

Smith KS, Ferry JG (2000). Prokaryotic carbonic anhydrases. Fems Microbiol Rev, 24 (4): 335~366

Smith KS, Jakubzick C, Whittam TS, Ferry JG (1999). Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. Proc Natl Acad Sci USA, 96 (26): 15184~15189

Stemler A (1986). Carbonic anhydrase associated with thylakoids and photosystem II particles from maize. Biochim Biophys Acta, 850 (1): 97~107

Thoms S (2002). Hydrogen bonds and the catalytic mechanism of human carbonic anhydrase II. J Theor Biol, 215 (4): 399~404

Tripp BC, Smith K, Ferry JG (2001). Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. J Biol Chem, 276 (52): 48615~48618