

## 研究报告



## 嗜热蓝细菌碳酸酐酶基因的异源表达及酶学性质

侯娟 李俐珩 张海若 李玫锦 陈鹏宇 Maurycy Daroch\*

北京大学深圳研究生院环境与能源学院 广东 深圳 518055

**摘要:**【背景】碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CAH)因其高效催化  $\text{CO}_2$  转化为  $\text{HCO}_3^-$  的能力成为当今碳减排工艺中的研究热点,但因工厂烟道气的温度较高,因此寻求热稳定性高的嗜热碳酸酐酶是碳酸酐酶仿生学固碳的关键所在。【目的】克隆嗜热蓝细菌 *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542 和 *Synechococcus lividus* PCC6715 的碳酸酐酶基因 *Ecah*、*Pcah*, 实现其在大肠杆菌细胞中异源高效表达,并进行初步酶学性质研究。【方法】利用 PCR 技术获得碳酸酐酶基因 *cah*, 构建重组基因工程菌 BL21\_pETM11\_CAH, 利用 IPTG 诱导方法高效表达蛋白,表达产物(CAH)经 Ni-Agarose 亲和层析柱纯化后,进行酶学性质研究。【结果】从 E542、PCC6715 中克隆得到大小均为 534 bp 的碳酸酐酶基因,以  $\text{CO}_2$  为底物,酶催化  $\text{CO}_2$  水合的活性分别为 42.6 WAU/mg-protein、47.6 WAU/mg-protein。碳酸酐酶 ECAH 50 °C 处理 30 min 后,酶活提高了 8%,而 PCAH 却下降了 10%。 $\text{Zn}^{2+}$ 、磺胺对两种碳酸酐酶有显著抑制作用, $\text{Ca}^{2+}$ 对 ECAH 有轻微激活作用,对 PCAH 无显著抑制作用。【结论】E542 嗜热蓝细菌表达的碳酸酐酶比 PCC6715 的热稳定性强,符合处理工业高温点源烟道气的  $\text{CO}_2$  的基本要求,丰富了碳减排的嗜热碳酸酐酶基因库。

**关键词:** 嗜热蓝细菌, 嗜热碳酸酐酶, 异源表达

IPTG-induced, heterologous expression and characterization of carbonic anhydrase from *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542

HOU Juan LI Li-Heng ZHANG Hai-Ruo LI Mei-Jin CHEN Peng-Yu Maurycy Daroch\*

School of Environment and Energy, Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen, Guangdong 518055, China

**Abstract:** [Background] Carbonic anhydrase has become the hotspot in carbon reduction research due to its ability to efficiently convert  $\text{CO}_2$  to  $\text{HCO}_3^-$ . Because of the flue gas high temperature, searching for thermostable, the thermophilic carbonic anhydrase is the key to achieve the biomimetic capture of  $\text{CO}_2$  in industrial flue gas. [Objective] The carbonic anhydrase (CAH) gene of *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542 (*Ecah*) and *Synechococcus lividus* PCC6715 (*Pcah*) were cloned and expressed in *Escherichia coli*, and the enzymatic properties were characterized. [Methods] The two genes of the CAH

**Foundation items:** China Postdoctoral Science Foundation (2018M641094); Shenzhen Free Exploring Basic Research Project (JCYJ20180302153648993)

\*Corresponding author: Tel: 86-755-26032184; E-mail: m.daroch@pkusz.edu.cn

Received: 10-04-2019; Accepted: 25-06-2019; Published online: 10-07-2019

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目(2018M641094); 深圳市基础研究自由探索项目(JCYJ20180302153648993)

\*通信作者: Tel: 0755-26032184; E-mail: m.daroch@pkusz.edu.cn

收稿日期: 2019-04-10; 接受日期: 2019-06-25; 网络首发日期: 2019-07-10

were amplified by PCR. The recombinant plasmid pETM11-ECAH, pETM11-PCAH was overexpressed in BL21(DE3) pLysS by IPTG induced. The recombinant carbonic anhydrase was purified with Ni-Agarose His-tagged affinity chromatography and the enzymatic properties were further checked. **[Results]** Two length of 534 bp carbonic anhydrase were both obtained from E542 and PCC6715. The CO<sub>2</sub> hydration activity of the ECAH and the PCAH was 42.6 WAU/mg-protein, 47.6 WAU/mg-protein, respectively. After 50 °C incubation for 30 min, the ECAH activity was increased by 8%, but the PCAH was decreased by 10%. The ECAH activity was increased to about 108% after treated by Ca<sup>2+</sup> for 30 min, but no significant inhibition of PCAH activity was observed. Both the ECAH and PCAH activities were significantly inhibited by Zn<sup>2+</sup> and sulphanilamide. **[Conclusion]** The ECAH of the *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542 shows favorable thermostability than PCAH of the *Synechococcus lividus* PCC6715. ECAH meets the basic requirements for CO<sub>2</sub> treatment of industrial high-temperature point source flue gas, and enriches the thermophilic carbonic anhydrase gene pool.

**Keywords:** Thermophilic cyanobacteria, Thermocarbonic anhydrase, Heterologous expression

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CAH)是一种含锌金属酶,可以高效催化 CO<sub>2</sub> 与 H<sub>2</sub>O 生成 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和 H<sup>+</sup>的可逆反应,它广泛存在于动植物及微生物中,并承担不同的生理功能,如CO<sub>2</sub>的运输、光合作用、钙化作用和酸碱平衡等<sup>[1-2]</sup>,因其高效催化气态CO<sub>2</sub>转化的特性,在碳减排领域引起研究者的广泛关注。常见的 CO<sub>2</sub> 减排技术有物理/化学法吸收、吸附及深海固定等。添加不同溶剂对CO<sub>2</sub>进行物理溶解或化学吸收作用,需要消耗高额的理化试剂且CO<sub>2</sub>吸收容量也会有所限制,直接固定需要考虑CO<sub>2</sub>的浓度、压缩、运输成本及安全问题,若CO<sub>2</sub>可以得到资源化利用,那么碳减排的成本也会大大降低<sup>[3-4]</sup>。气态的 CO<sub>2</sub> 不稳定,直接加以利用技术难度及成本较高,所以将CO<sub>2</sub>气体转化为水溶液状态更有利于其资源化利用。与物理、化学法固定 CO<sub>2</sub> 相比,使用碳酸酐酶进行仿生学捕集CO<sub>2</sub>,酶催化反应条件温和,催化反应专一、高效、耗时短、污染少,是一种环境友好的绿色工艺,且其催化产物是碳酸盐,可作为其他工业生产的原料,也可通过矿化作用生成 CaCO<sub>3</sub>,实现CO<sub>2</sub>的地质学最终固定<sup>[5-6]</sup>。

Liu 等<sup>[7]</sup>研究出一套 CO<sub>2</sub> 洗涤系统,用牛碳酸酐酶(bovine carbonic anhydrase, BCA)催化 CO<sub>2</sub> 水合,最终固定成稳定的矿物碳酸盐,试验温度为 50 °C 左右;Zhang 等<sup>[8]</sup>模拟燃煤电厂烟道气中的 CO<sub>2</sub> 气体,采用 IVCAP (integrated vacuum

carbonate absorption process)技术,用 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液来吸附固定 CO<sub>2</sub>,加入碳酸酐酶来催化加速这个反应,但在 50 °C 实验条件下,酶的催化活性逐渐丧失。工厂烟道气出口温度较高,将碳酸酐酶直接用于固定高温烟道气必须考虑到酶的耐热性问题,所以开发嗜热型的碳酸酐酶对于CO<sub>2</sub>的捕集有着非常重大的意义。

本实验室前期从四川甘孜地区的温泉带获得一株嗜热蓝细菌 *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542,其生长温度为 67.3 °C<sup>[9]</sup>,将其碳酸酐酶基因 *Ecah* 在大肠杆菌中进行克隆和表达,研究其催化CO<sub>2</sub>水合的能力,以期将来应用到工业高温烟道气的碳减排提供理论支持及技术可行性,同时丰富应用到碳减排的嗜热碳酸酐酶基因库。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

实验所用的菌株 *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542 (简称 E542),采自甘孜州地区的温泉地带,嗜热蓝细菌 *Synechococcus lividus* PCC6715 (简称 PCC6715),购自于法国巴黎的蓝细菌巴斯德研究院,目前均保存于北京大学环境与能源学院微藻藻种资源库;大肠杆菌感受态 *E. coli* DH5α、表达型菌株 *E. coli* BL21(DE3)

pLysS、载体 pJET1.2 和 pETM11 购于 Thermo 公司。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Nco* I、*Hind* III, CloneJET PCR Cloning Kit、BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific 公司; Phusion 高保真 DNA 聚合酶, NEB 公司; 6×His-Tagged Protein Purification Kit, 北京康为世纪生物科技有限公司; ClonExpress II One Step Cloning Kit, 南京诺唯赞生物科技有限公司。触摸 PCR 控温系统, Bio-Rad 公司; 恒温振荡器, 上海一恒科学仪器有限公司等。

### 1.1.3 培养基

LB 培养基<sup>[10]</sup>(g/L): NaCl 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取粉 5.0, 用蒸馏水配制,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min, 固体培养基另加琼脂 15.0 g/L。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 碳酸酐酶基因 *cah* 克隆

分析嗜热蓝细菌 E542 和 PCC6715 的基因组序列, NCBI 登录号分别为 CP032152.1 和 CP018092.1, 通过转录组数据库中已标记为碳酸酐酶的序列进行 BLASTp 比对, 获得具有完整开放阅读框的基因片段, 具备转录、翻译、表达成熟碳酸酐酶的能力, 分析这两个开放阅读框, 设计两种碳酸酐酶基因的正、反向引物序列为: PCC6715\_ *cah*: F: 5'-TTTATTTTCAGGGCGCCATGGCTATCTCTGCACCCAG-3'; R: 5'-CTCG AGT GCGGCCGCATCAGGCATAAAACCAAGGTTG G-3'。E542\_ *cah*: F: 5'-TTTATTTTCAGGGCGCCATGGTCATCACTGCCCCTAGTGCC-3'; R: 5'-CTCGAGTGCGGCCGCACTAGGGATGGAATCCTA AATCGGTGC-3'。添加下划线的序列是扩增相应基因上的序列片段, 未添加下划线的是进行无缝克隆时扩增产物与线性化载体之间能够同源重组的完全一致的序列。

以 PCC6715 和 E542 基因组序列为模板, 通过 PCR 扩增碳酸酐酶基因 PCC6715\_ *cah*、E542\_ *cah* (以下分别简称 *Pcah*、*Ecah*) 全长序列。PCR 反应体

系(50  $\mu$ L): 基因组 DNA 1  $\mu$ L, 5×Phusion HF Buffer 10  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, 引物 F 和 R (10  $\mu$ mol/L) 各 2.5  $\mu$ L, Phusion DNA polymerase (2 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, Nuclease-free water 32.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 65 °C 30 s, 72 °C 35 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。将完整 *cah* 基因克隆至 pJET1.2 中, 即为 pJET-PCAH、pJET-ECAH 质粒。pJET-PCAH、pJET-ECAH 质粒测序由广州艾基生物技术有限公司完成。

### 1.2.2 表达载体构建

将 PCR 纯化产物克隆至用 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切的 pETM11 线性化载体中, 得到克隆产物 pETM11\_ECAH、pETM11\_PCAH 转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态中。涂布到含 30 mg/L 卡那霉素的 LB 抗性平板上进行筛选, 在平板上挑取单菌落, 转至上述抗性的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 下培养 4 h 后, 取 1  $\mu$ L 菌液做菌液 PCR 检测。再取适量菌液提取质粒, 重组质粒 pETM11\_ECAH、pETM11\_PCAH 的测序由广州艾基生物技术有限公司完成。

### 1.2.3 重组质粒 pETM11\_PCAH (ECAH) 的诱导表达

将重组质粒 pETM11\_ECAH、pETM11\_PCAH 转入大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 感受态细胞中, 挑取 LB 氯霉素和卡那霉素双抗平板上的单菌落, 经菌液 PCR 验证后, 以 2% 的接种量接种于含 30 mg/L 氯霉素与 30 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中。37 °C、200 r/min 培养至菌液的  $OD_{600}$  约为 0.6–0.8 时 (约为 4 h), BL21\_pETM11\_PCAH 培养液降温至 25 °C、BL21\_pETM11\_ECAH 培养液降温至 30 °C, 两者均加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 在各自温度下继续培养 9 h。培养结束后, 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min 收集诱导菌体。

### 1.2.4 碳酸酐酶蛋白纯化

用预冷的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)重悬收集的菌体, 冰浴下进行超声破碎处理(10 min, 运行

5 s, 暂停 9 s)。4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 后获得含有 His-tagged-PCAH、His-tagged-ECAH 融合蛋白的上清液。在室温条件下, 用 6×His-Tagged Protein Purification Kit 进行纯化, 最后用 Elution buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9、500 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl)洗脱下来。取超声破碎离心上清液及纯化酶液作 SDS-PAGE 验证, SDS-PAGE 配方如表 1 所示(配制 2 块胶的用量)。

### 1.2.5 考马斯亮蓝法测定酶蛋白浓度<sup>[11]</sup>

用 BCA Protein Assay Kit 进行检测, 以牛血清蛋白为标准蛋白, 测定不同浓度标准蛋白在 562 nm 处的吸光度值, 以  $OD_{562}$  为横坐标, 蛋白浓度为纵坐标, 绘制蛋白浓度标准曲线, 计算目的蛋白的浓度。

### 1.2.6 CO<sub>2</sub> 水合法测定碳酸酐酶催化活性

碳酸酐酶活性测定以 CO<sub>2</sub> 为底物, 反应体系总体积为 2.01 mL, 反应液包含 2 mL 底物反应液(溶液 A: 1 mL 冰浴的 25 mmol/L Tris-SO<sub>4</sub> 缓冲液, pH 8.3、含 0.2 g/L 的溴百里酚蓝; 溶液 B: 1 mL 冰浴的 CO<sub>2</sub> 饱和水溶液)和 10 μL 粗酶液。整个反应在冰上进行, 反应开始将 B 液加入到蓝色的 A 液中, 然后将酶液迅速加入到反应体系中, 此时开始计时。记录溶液颜色从蓝色(pH 8.3)变为黄色的时间  $T$ 。碳酸酐酶活性表示为  $WAU=(T_0-T)/T^{[12]}$ ,  $T_0$  表示没有酶参与情况下溶液变色所需要的时间。

表 1 SDS-PAGE 胶成分表

Table 1 The chemicals in the gel for SDS-PAGE

Chemicals	12%分离胶	浓缩胶
	12% Resolving gel	Stacking gel
Water (mL)	4.9	3.4
30% Acrylamide (mL)	6.00	0.83
1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) (mL)	3.8	—
1.0 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) (mL)	—	0.63
10% SDS (μL)	150	50
10% Ammonium (μL)	150	50
peroxydisulfate		
TEMED (μL)	6	10

注: —: 不添加该物质。

Note: —: This chemical is not included.

间。比酶活表示为 WAU/mg-protein, 即二氧化碳饱和水溶液在冰浴条件下将纯 CO<sub>2</sub> (纯度 99.9%)气体通入超纯水中至少 1 h 制得。

### 1.2.7 重组酶学性质研究

(1) 温度对重组碳酸酐酶活性的影响: 在 30、40、50、60、70、80 °C 下, 分别将酶液温浴 30 min 后立即置于冰上冷却, 用 CO<sub>2</sub> 水合法测定剩余酶液的活性。设定不做温度处理的原始酶液的相对活性为 100%, 以相对酶活绘制温度-酶活曲线。

(2) 金属离子及抑制剂对重组碳酸酐酶活性的影响: 在 1 mL 酶液中分别加入终浓度为 1 mmol/L 的不同金属离子(FeCl<sub>3</sub>、CaCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>)、磺胺、乙酰唑胺, 室温下孵育 30 min 后, 用 CO<sub>2</sub> 水合法测定剩余酶液的活性, 设定未加入添加剂的原始酶液的相对活性为 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 碳酸酐酶基因获取及氨基酸序列比对分析

以蓝细菌 E542 和 PCC6715 基因组序列为模板, PCR 扩增后获得 2 条大小均为 534 bp 的碳酸酐酶 *Ecah*、*Pcah* 基因片段, 这两个碳酸酐酶基因序列 *Pcah* (PCC6715\_CA)和 *Ecah* (E542\_CA)已提交至 GenBank, 登录号分别是 MK900631 和 MK900632。这两个碳酸酐酶基因均编码 177 个氨基酸, 分子量约为 20 kD。

通过 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)进行碳酸酐酶蛋白氨基酸序列同源性分析, 发现其与目前报道的  $\gamma$  型碳酸酐酶<sup>[13-14]</sup>的相似性较高。其中, 碳酸酐酶 ECAH 与  $\gamma$  型 PgiCA、CpsCA、MtCamH 和 MtCam 的序列相似性分别是 46%、40%、27%和 30%; 碳酸酐酶 PCAH 与相应  $\gamma$  型碳酸酐酶的序列相似性分别是 47%、40%、26%和 28%; ECAH 和 PCAH 的序列相似性达 84%。进一步用 ClustalX 软件对其氨基酸序列进行比对发现, ECAH 和 PCAH 的氨基酸序列中存在  $\gamma$  型碳酸酐酶与催化活性相关的连接催化中心 Zn<sup>2+</sup>的

3 个保守的组氨酸配体: His81、His117 和 His122 (以 MtCam 氨基酸序列命名), 详见图 1。用 ClustalX 和 MEGA 6.0 软件对这些氨基酸序列与其他  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  型碳酸酐酶进行系统发育学分析, 用 Neighbor-Joining 和 P-distance 建树法、设置 Bootstrap replications 值为 1 000, 构建如图 2 所示的系统发育树。从图 2 中可知  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  型碳酸酐酶

分别聚集, 形成 3 个分支。在  $\gamma$  型碳酸酐酶中, PCAH 和 ECAH 的亲缘关系最近, 且这两个碳酸酐酶与来源于细菌的碳酸酐酶(PgiCA、CpsCA、EcoCA 和 PhaCA)更相似, 而与来源于古菌 *M. thermophila* 的 MtCanH 和 MtCan 亲缘关系较远, 这种亲缘关系的远近程度可能与细菌和古菌分别属于原核微生物的两域有关。

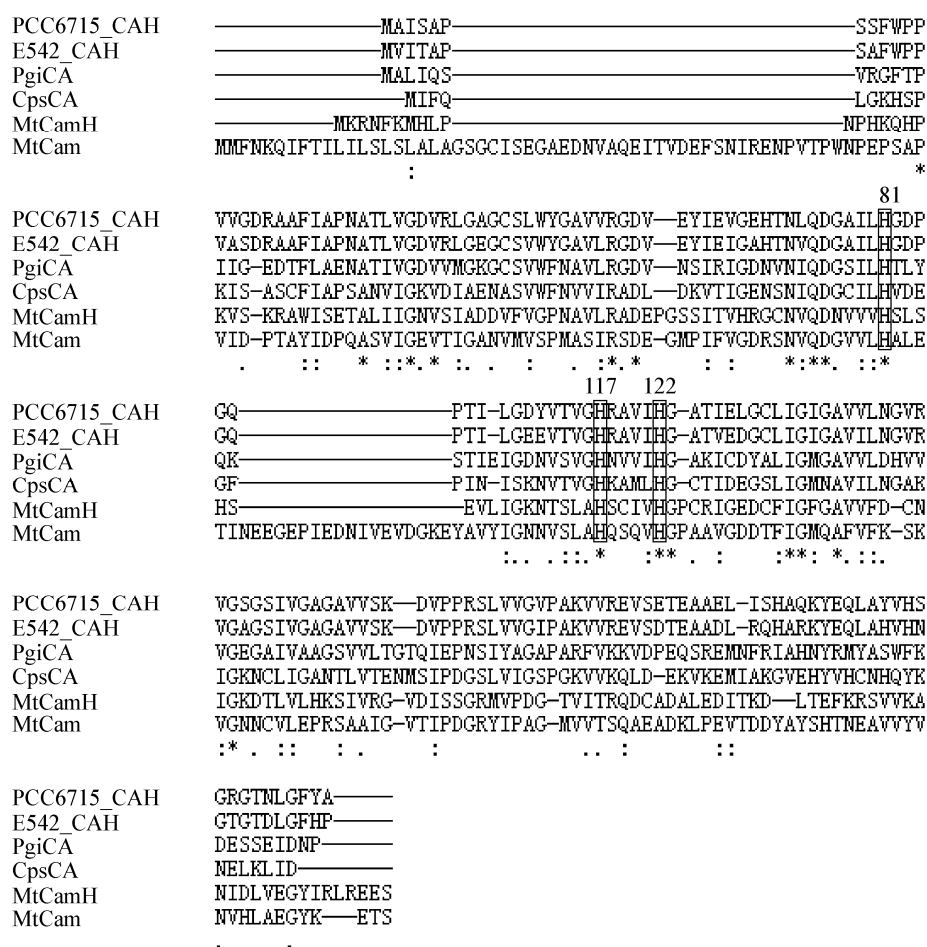


图 1 PCAH 和 ECAH 与其他  $\gamma$  碳酸酐酶氨基酸序列比对图

Figure 1 Amino acid sequences alignment of PCAH and ECAH with other  $\gamma$ -CA enzymes

注: PgiCA 来源于致病性厌氧菌 *Porphyromonas gingivalis* (NCBI 登录号为 WP\_012457873.1); CpsCA 来源于南极细菌 *Colwellia psychrerythraea* (NCBI 登录号为 WP\_011043043.1); MtCanH 和 MtCan 来源于古菌 *Methanosarcina thermophila* (NCBI 登录号分别为 P40881.1、ACQ57353.1); His81、His117 和 His122 已用框标出; \*表示该位点的氨基酸序列一致; : 表示该位点氨基酸保守性突变; . 表示该位点氨基酸半保守性突变。

Note: PgiCA, *Porphyromonas gingivalis* (accession No.: WP\_012457873.1); CpsCA, *Colwellia psychrerythraea* (accession No.: WP\_011043043.1); MtCanH, MtCan, *Methanosarcina thermophila* (accession No.: P40881.1, ACQ57353.1); His81, Hist117 and His122 are indicated in border; the asterisk (\*) indicates identity at all aligned positions; the symbol (: and .) means that semiconserved substitutions are observed.

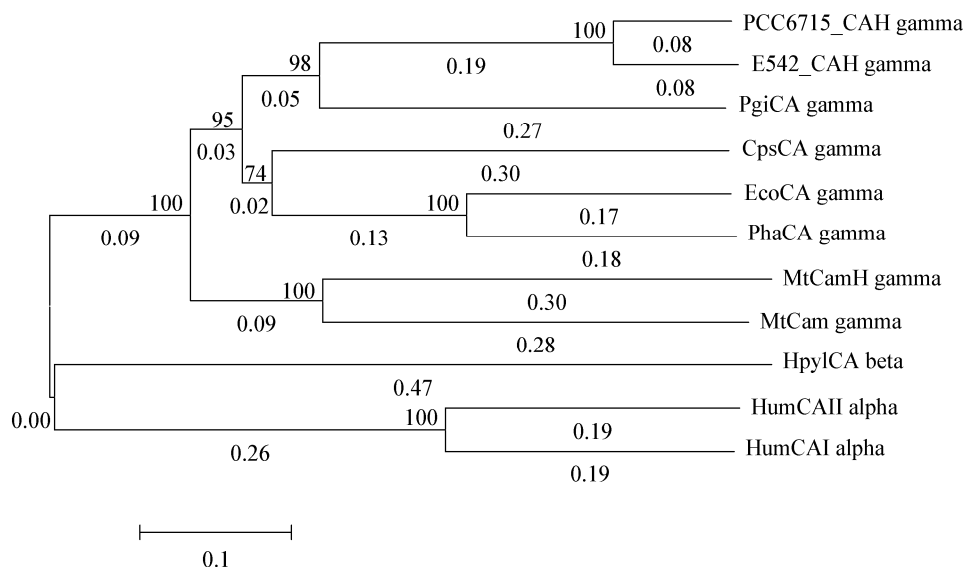


图2 PCAH和ECAH与其他 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 型碳酸酐酶氨基酸序列系统发育分析

Figure 2 Phylogenetic tree of the amino acid sequences of PCAH and ECAH and other  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CA enzymes

注: EcoCA 来源于大肠杆菌 *Escherichia coli* ISC56 (NCBI 登录号为 CDL59494); PhaCA 来源于南极细菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* (NCBI 登录号为 WP\_016710385.1); HpylCA 来源于幽门螺旋杆菌 *Helicobacter pylori* (NCBI 登录号为 BAF34127.1); HumCA I 和 HumCA II 来源于人 *Homo sapiens* (NCBI 登录号分别为 NP\_001729.1、AAH11949.1).

Note: EcoCA, *Escherichia coli* ISC56 (accession No.: CDL59494); PhaCA, *Pseudoalteromonas haloplanktis* (accession No.: WP\_016710385.1); HpylCA, *Helicobacter pylori* (accession No.: BAF34127.1); HumCA I, HumCA II, *Homo sapiens* (accession No.: NP\_001729.1, AAH11949.1).

## 2.2 重组碳酸酐酶的表达与纯化

经 IPTG 诱导, 重组 BL21(pETM11\_ECAH)、BL21(pETM11\_PCAH) 大量分泌碳酸酐酶蛋白 CAH。使用超声破碎菌液, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 上清液进行上样 SDS-PAGE 验证如图 3 所示, 得到分子量约为 20 kD 的重组酶, 经过 Ni 柱纯化后获得单一条带。这说明重组表达载体在宿主菌内经 IPTG 诱导成功地表达了碳酸酐酶基因。以 CO<sub>2</sub> 为底物, 4 °C 下用 CO<sub>2</sub> 水合法测定碳酸酐酶 ECAH、PCAH 的比酶活分别为 42.6、47.6 WAU/mg-protein, 高于文献[15]报道的耐热碳酸酐酶的比酶活 (3 WAU/mg-protein), 详见表 2。

## 2.3 重组碳酸酐酶酶学性质分析结果

### 2.3.1 温度对重组碳酸酐酶稳定性的影响

测定酶液在不同温度(30–80 °C)下温浴 30 min 后的剩余活性, 详见图 4。由图 4 可以看出, 重组碳酸酐酶 ECAH 的酶活在 50 °C 下温浴 30 min 后, 相对酶活达到最大值; 而 PCAH 酶活在 40 °C 温浴

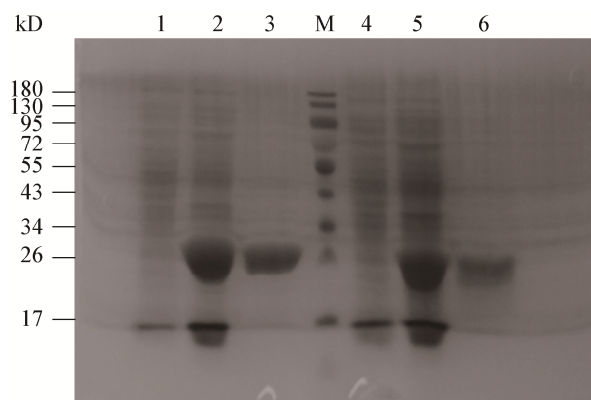


图3 重组碳酸酐酶 ECAH、PCAH 表达的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 Recombinant carbonic anhydrase expressed protein SDS-PAGE analysis

注: M: 标准蛋白; 1、4: 未添加 IPTG 诱导(空白对照): ECAH、PCAH; 2、5: IPTG 诱导表达: ECAH、PCAH; 3、6: Ni 柱纯化蛋白: ECAH、PCAH.

Note: M: Protein Marker; 1, 4: Uninduced (blank): ECAH, PCAH; 2, 5: Induced: ECAH, PCAH; 3, 6: Ni-agarose purified protein: ECAH, PCAH.

表 2 重组碳酸酐酶的活性  
Table 2 The CO<sub>2</sub> hydration activity of the CAH

样品	总酶活	蛋白含量	比酶活
Sample	Total enzyme activity (WAU)	Protein content (mg)	Specific enzyme activity (WAU/mg-protein)
PCAH	269.00±9.23	5.65±0.054	47.6±1.85
ECAH	212.80±16.06	5.00±0.086	42.6±3.71

时达到最大值, 50 °C 温浴后酶活降低至原先的 90%, 说明 ECAH 的热稳定性比 PCAH 强。高于 50 °C 温浴, 两种碳酸酐酶的酶活逐渐降低, 60 °C 条件下, ECAH 的酶活降低至原先的 63%, PCAH 的酶活降低至原先的 54%, 80 °C 温浴条件下, 两种碳酸酐酶几乎完全失活。

碳酸酐酶 ECAH 在 50 °C 温浴后蛋白活性达到最大值, 比未做温度处理的酶蛋白活性提高了 8%, 而碳酸酐酶 PCAH 在 50 °C 温浴后活性降至未作温度处理的 90%, 这可能与两种碳酸酐酶的来源菌株有关。采自四川甘孜温泉地带的嗜热蓝细菌 E542 的生长环境温度为 67.3 °C, 另一种蓝细菌 PCC6715 从美国国家黄石公园的温泉中分离得到, 其生长环境温度为 50–55 °C<sup>[16-17]</sup>, 低于 E542 长期生存的环境温度。张朝晖等<sup>[18]</sup>在探究温度对重组碳酸酐酶 *mtc* 酶活稳定性时发现, 酶活在 55 °C 温浴后大幅提高, 而酶基因的来源菌 *Methanocella conradii* HZ254 的最适生长温度为 55 °C 左右。

Vullo 等<sup>[19]</sup>在研究 *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* 碳酸酐酶(SpCA)的酶活热稳定性时

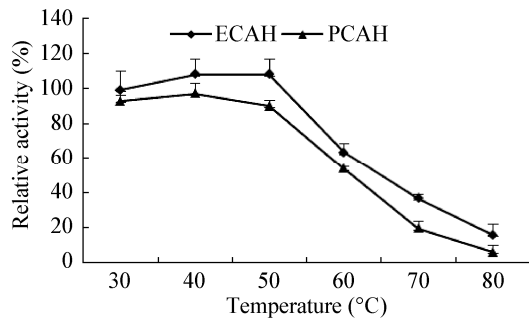


图 4 温度对重组碳酸酐酶热稳定性的影响  
Figure 4 Effect of temperatures on thermostability of the recombinant carbonic anhydrase

也出现了类似的情况, 在 80 °C 时 Ssp\_CA 催化 CO<sub>2</sub> 水合的速率最快, 而 *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* 也被发现于陆地温泉中, 生长温度可达 110 °C 左右。

2.3.2 金属离子及抑制剂对重组碳酸酐酶活性的影响

图 5 描述了 4 种金属离子(Fe<sup>3+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>)和两种抑制剂对碳酸酐酶活性的影响情况。在金属离子中, 可以发现 1 mmol/L Ca<sup>2+</sup>对碳酸酐酶 ECAH 有轻微激活作用, 酶活提高约 8%, 而对 PCAH 无明显作用; Fe<sup>3+</sup>对 ECAH 酶活抑制作用比 PCAH 酶为明显, 酶活降为原来的 85%, 而 Mn<sup>2+</sup>对 PCAH 酶活抑制作用比 ECAH 酶明显, 酶活降为原来的 85%; Zn<sup>2+</sup>对两种碳酸酐酶均有显著抑制作用。

磺胺也显著地抑制了两种碳酸酐酶的活性, 活性降为 44%; 乙酰唑胺是碳酸酐酶抑制剂, 可以显著性地抑制碳酸酐酶的活性, 所以其对碳酸酐酶抑制作用最为显著。张朝晖等<sup>[18]</sup>在研究金属离子对碳酸酐酶活性的实验中, 也发现 Ca<sup>2+</sup>对酶

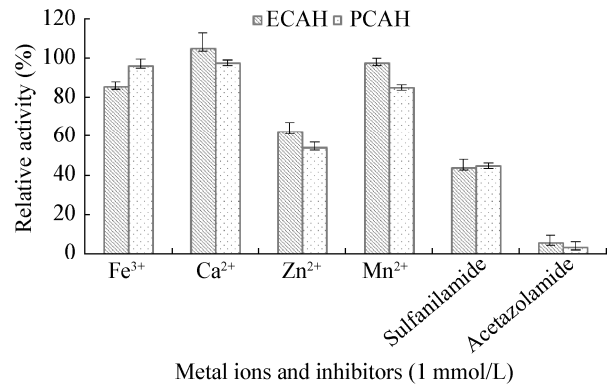


图 5 金属离子及抑制剂对重组碳酸酐酶活性的影响  
Figure 5 Effects of metal ions and inhibitors on activity of recombinant carbonic anhydrase

活有激活作用,而添加  $\text{Zn}^{2+}$  会对酶活有显著抑制作用。碳酸酐酶是一种含锌金属酶,活性中心是  $\text{Zn}^{2+}$ ,已有文献报道在含  $\text{Zn}^{2+}$  培养基中诱导出的碳酸酐酶活性比无  $\text{Zn}^{2+}$  培养基的活性要高 41%,且低浓度的  $\text{Zn}^{2+}$  会降低酶的  $\text{CO}_2$  水合活性<sup>[20-21]</sup>。 $\text{Zn}^{2+}$  对碳酸酐酶活性的影响还需进一步深入探究。

### 3 结论与展望

本文实现了嗜热蓝细菌 *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542 和 *Synechococcus lividus* PCC6715 的碳酸酐酶基因 *Ecah*、*Pcah* 在大肠杆菌中的成功克隆与表达。酶蛋白活性实验表明,两者表达的重组碳酸酐酶具有催化  $\text{CO}_2$  水合的能力,且碳酸酐酶蛋白 ECAH 的热稳定性比 PCAH 的热稳定性强,经 50 °C 处理 30 min 后 ECAH 的酶活提高 8%,而 PCAH 的酶活降低 10%,这大大增强了嗜热碳酸酐酶催化转化点源高温烟道气中  $\text{CO}_2$  的实用性。金属离子及抑制剂对酶活影响的实验结果表明,  $\text{Zn}^{2+}$  和磺胺对两种碳酸酐酶均有显著抑制作用,乙酰唑胺的抑制作用最为显著。但是将碳酸酐酶直接用于转化烟道气中的  $\text{CO}_2$ ,因酶制剂的成本比较高,还需考虑酶的回收利用等问题。基于本研究结果,优化嗜热碳酸酐酶 ECAH 的表达条件,提高其比酶活,探索一种方便酶重复使用的固定方法等可作为未来研究方向,从而为利用该嗜热碳酸酐酶固定点源高温烟道气中  $\text{CO}_2$  奠定基础。

### REFERENCES

- [1] Jun SY, Kim SH, Kanth BK, et al. Expression and characterization of a codon-optimized alkaline-stable carbonic anhydrase from *Aliivibrio salmonicida* for  $\text{CO}_2$  sequestration applications[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2017, 40(3): 413-421
- [2] Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, 7(2): 168-181
- [3] Li CX, Jiang XC, Qiu YJ, et al. Physiological function, diversity of carbonic anhydrase and its application[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2013, 11(1): 94-103 (in Chinese)  
李春秀, 姜笑辰, 邱勇隽, 等. 碳酸酐酶的生理功能、多样性及其在  $\text{CO}_2$  捕集中的应用[J]. *生物加工过程*, 2013, 11(1): 94-103
- [4] Li XC, Sun YB. Status quo and prospect of the carbon dioxide capture[J]. *Energy Technology and Economics*, 2010, 22(4): 21-26 (in Chinese)  
李新春, 孙永斌. 二氧化碳捕集现状和展望[J]. *能源技术经济*, 2010, 22(4): 21-26
- [5] Migliardini F, de Luca V, Carginale V, et al. Biomimetic  $\text{CO}_2$  capture using a highly thermostable bacterial  $\alpha$ -carbonic anhydrase immobilized on a polyurethane foam[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2014, 29(1): 146-150
- [6] Mirjafari P, Asghari K, Mahinpey N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for  $\text{CO}_2$  sequestration purposes[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2007, 46(3): 921-926
- [7] Liu N, Bond GM, Abel A, et al. Biomimetic sequestration of  $\text{CO}_2$  in carbonate form: role of produced waters and other brines[J]. *Fuel Processing Technology*, 2005, 86(14/15): 1615-1625
- [8] Zhang SH, Zhang ZH, Lu YQ, et al. Activity and stability of immobilized carbonic anhydrase for promoting  $\text{CO}_2$  absorption into a carbonate solution for post-combustion  $\text{CO}_2$  capture[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(22): 10194-10201
- [9] Tang J, Jiang D, Luo YF, et al. Potential new genera of cyanobacterial strains isolated from thermal springs of western Sichuan, China[J]. *Algal Research*, 2018, 31: 14-20
- [10] Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(23): 8746-8756
- [11] Yang JX. *Biochemistry and Molecular Biology Technology Tutorials*[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2009: 35-36 (in Chinese)  
杨建雄. *生物化学与分子生物学实验技术教程*[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2009: 35-36
- [12] Capasso C, de Luca V, Carginale V, et al. Biochemical properties of a novel and highly thermostable bacterial  $\alpha$ -carbonic anhydrase from *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* YO3AOP1[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2012, 27(6): 892-897
- [13] del Prete S, Vullo D, de Luca V, et al. A highly catalytically active  $\gamma$ -carbonic anhydrase from the pathogenic anaerobe *Porphyromonas gingivalis* and its inhibition profile with anions and small molecules[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23(14): 4067-4071
- [14] Vullo D, de Luca V, del Prete S, et al. Sulfonamide inhibition studies of the  $\gamma$ -carbonic anhydrase from the antarctic bacterium *Colwellia psychrerythraea*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26(4): 1253-1259
- [15] Smith KS, Ferry JG. A plant-type ( $\beta$ -class) carbonic



- anhydrase in the thermophilic methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(20): 6247-6253
- [16] Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*)[J]. Bacteriological Reviews, 1971, 35(2): 171-205
- [17] Dyer DL, Gafford RD. Some characteristics of a thermophilic blue-green alga[J]. Science, 1961, 134(3479): 616-617
- [18] Zhang ZH, Ma XZ. Cloning and expression of a thermophilic carbonic anhydrase and its enzymatic properties[J]. Industrial Microbiology, 2015, 45(4): 1-6 (in Chinese)
- 张朝晖, 马晓舟. 一种嗜热型碳酸酐酶基因的克隆表达及酶学性质[J]. 工业微生物, 2015, 45(4): 1-6
- [19] Vullo D, de Luca V, Scozzafava A, et al. The extremophilic  $\alpha$ -carbonic anhydrase from the thermophilic bacterium *Sulfolobus solfataricus* is highly inhibited by sulfonamides[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013, 21(15): 4521-4525
- [20] Yu S, Xia DX, Luo QX, 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
- [21] Sasaki H, Hirose T, Watanabe Y, et al. Carbonic anhydrase activity and CO<sub>2</sub>-transfer resistance in Zn-deficient rice leaves[J]. Plant Physiology, 1998, 118(3): 929-934

## 稿件书写规范

### 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。