

## 不同植物的碳酸酐酶活力差异研究

吴沿友<sup>1,2</sup>, 李西腾<sup>1</sup>, 郝建朝<sup>3</sup>, 李萍萍<sup>1</sup>, 王宝利<sup>2</sup>

(1. 江苏大学 农业工程研究院, 江苏 镇江 212013; 2. 中国科学院 地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550002; 3. 贵州大学, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:** 碳酸酐酶是催化二氧化碳的可逆水合反应的一种含锌金属酶。测定不同植物、同一植物不同部位、同一植物同一部位不同时间的碳酸酐酶的活力, 研究诸葛菜和油菜碳酸酐酶及其胞外酶活力的差异, 初步探讨碳酸酐酶活力与植物抗干旱能力之间的关系。研究结果为诸葛菜的喀斯特适生性的研究提供依据。

**关键词:** 碳酸酐酶; 诸葛菜; 喀斯特适生性

**中图分类号:** Q945.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)04-0366-04

## Study on the difference of the activities of carbonic anhydrase in different plants

WU Yan-you<sup>1,2</sup>, LI Xi-teng<sup>1</sup>, HAO Jian-chao<sup>3</sup>,

LI Ping-ping<sup>1</sup>, WANG Bao-li<sup>2</sup>

(1. *Institute of Agricultural Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China*; 2. *The State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, the Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China*; 3. *Guizhou University, Guiyang 550025, China*)

**Abstract:** Carbonic anhydrase(CA; EC 4. 2. 1. 1) is a zinc-containing metalloenzyme that catalyzes the reversible conversion of CO<sub>2</sub> to bicarbonate. The paper dealt with the activities of carbonic anhydrase of leaves from different plants, different position of same plant, different times of the same position of same plant. The difference of the activities of carbonic anhydrase and extracellular carbonic anhydrase between *Orychophragmus violaceus* and oilseed rape was also studied, and the relationship between the activities of carbonic anhydrase of leaves and aridity-resistance was investigated. The results of this study offer the theoretical foundation for the study of *O. violaceus*'s adaptability to Karst.

**Key words:** carbonic anhydrase; *Orychophragmus violaceus*; adaptability to Karst

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA; carbonate hydrolyase, EC 4. 2. 1. 1)是一种含锌金属酶。它的主要生物学功能是催化二氧化碳的可逆水合反应:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ , 它的反应速率是非催化反应速率大约  $10^9$  倍, 转化数高达  $10^4 \sim 10^6$  (Bracey 等, 1994; Karrasch 等, 1989; Lindskog, 1997)。

碳酸酐酶的功能是多种多样的。CA 为酶反应

提供 CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 外还可以通过移去 CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 来推动反应产生能量。CA 通过将 CO<sub>2</sub> 转换成 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 移去脱羧反应产生的 CO<sub>2</sub>, 从而推动脱羧反应的进行。CA 在植物催化光合作用过程中可逆的 CO<sub>2</sub> 水合反应, 促进 CO<sub>2</sub> 向 Rubisco 扩散。CA 对呼吸作用、酸碱平衡和离子运输、钙化作用等也是必需的 (Smith 等, 2000; 张蓬等, 1997)。

收稿日期: 2004-12-04 修回日期: 2005-06-07

基金项目: 国家自然科学基金(40273038); 江苏大学高层次人才引进基金; 国土资源部岩溶动力学开放研究实验室开放基金(2001-6-3) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(40273038); Initial Foundation of Senior Talents of Jiangsu University; Karst Dynamic Laboratory, Ministry of Land and Resources of China(2001-6-3)]

作者简介: 吴沿友(1966-), 男, 安徽贵池人, 研究员, 博士生导师, 从事植物学研究。

CA 还可催化一些其他的反应,如乙醛的水化和各种卤素衍生物的水解,甲烷八叠球菌属的产甲烷,某些细菌将氰酸盐分解成氨以及某些植物对碳酰硫(COS)的吸收,羧酸酯类、酚类、磺酸酯、磷酸酯也可用作 CA 的底物(Smith 等,2000;Kesselmeier 等,2002;Blezniger 等,2000,Protoschill-Krebs 等,1996;毛宗万等,2002)。

高等植物的碳酸酐酶在光合作用、离子吸收中起重要作用。Gillon 等(2001)证明了陆地植被的碳酸酐酶对大气 CO<sub>2</sub> 源会起重要作用。除此之外,碳酸酐酶还可以与磷酸酯、羧酸酯、醛类、卤素离子、羧酸根、酚、醇、咪唑、羧酸酰胺、硫酰胺、SCN 等结合,这些分子或离子作为抑制剂抑制碳酸酐酶的催化活性,也势必影响植物体内的诸多的生理功能。与藻类碳酸酐酶一样,高等植物的碳酸酐酶也与温室气体碳酰硫(COS)的吸收有关(Protoschill-Krebs 等,1996)。本文通过研究不同植物、同一植物不同部位的叶片以及同一植物同一部位不同时间的碳酸酐酶的活力,为更好地研究碳酸酐酶对环境的调节作用打下基础。

表 1 不同植物碳酸酐酶活力的比较

Table 1 Comparison of activities of carbonic anhydrase among different plants

种名 Species	碳酸酐酶活力 CA activities (WAU/gFW)
诸葛菜 <i>Orychophragmus violaceus</i>	820.31
白菜 <i>Brassica chinensis</i>	200.00
碎米荠 <i>Cardamine hirsuta</i>	68.79
椿 <i>Toona sinensis</i>	976.47
水稻 <i>Oryza sativa</i>	440.14
中华墙藓 <i>Tortula sinensis</i>	33.45
尖叶扭口藓 <i>Barbula convoluta</i>	40.47
衣藻(胞外酶) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	158.19/10 <sup>8</sup>
小球藻(胞外酶) <i>Chlorella vulgaris</i>	8.29/10 <sup>8</sup>
蓝花子 <i>Raphanus sativa</i> var. <i>raphanistroides</i>	38.42
甘蓝性油菜 <i>Brassica napus</i>	279.43
白菜型油菜 <i>B. campestris</i>	170.42
芥菜型油菜 <i>B. juncea</i>	207.77
埃塞俄比亚芥 <i>B. carinata</i>	69.08
翠柏 <i>Calocedrus macrolepis</i>	28.87
藜草 <i>Phalaris arundinacea</i>	114.00
芦苇 <i>Phragmites communis</i>	51.00
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	55.68
蕨 <i>Pteridium aquilinum</i>	7.72
石山素馨 <i>Jasminum seguini</i>	4895.76
贵州榕 <i>Ficus tsiangii</i>	600.82
星果卫矛 <i>Euonymus</i> sp.	283.67
云南鼠刺 <i>Itea yunnanensis</i>	39.32
枇杷 <i>Eriobotrya japonica</i>	未测出
蒙桑 <i>Morus alba</i> var. <i>mongolia</i>	未测出

## 1 实验方法

取植物叶片 0.3~1 g,放到预冷的研钵中,迅速加入液氮,再加入 3 mL 巴比妥缓冲液(10 mmol/L,含巯基乙醇 50 mmol/L,pH8.3)进行研磨,取研磨液倒入 5 mL 离心管中,离心管置于冰浴中 20 min 后,在 13 000 r/min 下离心 5 min,取上清液,冷藏待测。

碳酸酐酶活力的测定采用 pH 计法(Wilbur 等,1948)。保持反应系统在 0~2℃,取待测上清液 50~1 000 μL,加入到含 15 mL 的巴比妥缓冲液(20 mmol/L,pH8.30)的反应容器中,然后迅速加入 10 mL 预冷的(0~2℃)饱和 CO<sub>2</sub> 的蒸馏水,用 pH 电极监测反应体系 pH 值变化,记下 pH 值下降一个单位(例如 pH 值从 8.2~7.2)所需的时间,记为 t,同时记录在酶失活条件下 pH 值下降一个单位所需的时间,记为 t<sub>0</sub>,酶的活力用 WA-unit 表示。WA = t/t<sub>0</sub>-1。

碳酸酐酶胞外酶的测定。由于乙酰唑胺(acetazolamide,AZ)能够抑制碳酸酐酶活力(Moroney 等,1985),本身又不能通过细胞膜,因此可以通过加乙酰唑胺测定碳酸酐酶活力来获得碳酸酐酶胞外酶活力。本实验采用的乙酰唑胺的浓度为 30 mmol/L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 碳酸酐酶活力的变异性

分别从实验地、实验室以及野外(贵阳情人谷和镇江江边)取诸葛菜、白菜、碎米荠、香椿、水稻、苔藓植物、藻类、蓝花子、甘蓝性油菜、白菜型油菜、芥菜型油菜、埃芥、芦苇、藜草、蕨、贵州榕、石山素馨等用以上方法进行碳酸酐酶活力的测定。

从表 1 中可以看出,不同的植物碳酸酐酶活力明显不同。藻类、苔藓、蕨类植物、裸子植物以及被子植物都有碳酸酐酶的活力,各种植物的碳酸酐酶活力相差很大。在高等植物中,活力最大的石山素馨,蕨的活力最小,只有 7.72 WAU/gFW,翠柏、中华墙藓、尖叶扭口藓的活力都较低,诸葛菜、椿、贵州榕的碳酸酐酶的活力都很高。诸葛菜的碳酸酐酶活力大于所有的被测十字花科植物,仅仅比石山素馨和椿的碳酸酐酶活力小。这种较高活力的碳酸酐酶可能与喀斯特适应性有一定的关系。

现在以苔藓植物为例来说明碳酸酐酶对喀斯特适生性的作用。许多苔藓植物由于适应水分逆境,

因此可以生活在石灰岩的岩石上(Stark, 1983)。它们能忍受水分逆境干旱一段时间后,不失时机地大量吸收水分并减少蒸腾(Zhang 等, 2002)。由于碳酸酐酶一方面有利于石灰岩的溶解(刘再华, 2000),更好地获得  $\text{HCO}_3^-$ , 另一方面, 它能快速地将  $\text{HCO}_3^-$  转化成  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{CO}_2$ , 这样可以弥补水分逆境后植物缺水和  $\text{CO}_2$ 。苔藓植物短暂干旱后, 光合作用并不立即下降(Mayaba 等, 2003)可能是短暂干旱后, 植物并不缺水和  $\text{CO}_2$ 。喀斯特适生植物可能具有同样的机制。

实际上, 表 1 中所测定的数据都是即时数据, 碳酸酐酶活力在不同的植物生长时期和不同部位叶片的活力都不一样, 即使是同一植物在一天的不同时间碳酸酐酶活力都不同。

表 2 诸葛菜和白菜型油菜不同叶片的碳酸酐酶活力的差异(WAU/gFW, 测定时间: 9:00 am, 08/26/2001)

Table 2 Difference of carbonic anhydrase activities from different leaves of *Orychophragmus violaceus* and *Brassica campestris* (WAU/gFW)

诸葛菜 叶片编号 No. (leaves of <i>Orychophragmus</i> <i>violaceus</i> )	酶活力 CA activities	白菜型油菜 叶片编号 No. (leaves of <i>Brassica</i> <i>campestris</i> )	酶活力 CA activities
1	643.9	1	92.15
2	784.4	2	107.88
3	465.8	3	28.27
4	774.5	4	59.91
5	590.79	5	96.11
6	441.67	6	66.56
7	914.66	7	200.23
8	698.41	8	160.55
9	200.82	9	113.67
10	357.10	10	172.86

从表 2 中可以看出诸葛菜和白菜型油菜不同叶片的碳酸酐酶活力差异很大, 因此, 测定植物的碳酸酐酶活力时, 应使样品充分混合。我们的做法是均匀的获取不同部位的叶片, 打孔获取很多小圆片, 充分混合小圆片, 取一定数量的小圆片进行实验。本文中我们所测定的碳酸酐酶活力, 除有特殊要求外, 都是这样取样的。

表 3 表示的是不同时期诸葛菜的碳酸酐酶活力差异。从表 3 中可以看出, 植物体内碳酸酐酶活力与它的生长发育状况有关。发育时期相近的碳酸酐酶活力差异较小(2001 年 8 月 19 日与 8 月 20 日; 2001 年 8 月 25 日与 8 月 27 日)。

从表 4 可以看出, 碳酸酐酶活力在不同植物表

现的日变化模式不一样, 同一植物不同时间的碳酸酐酶活力大小相差很大, 诸葛菜的碳酸酐酶活力高峰在 11:00~12:00, 而芥菜型油菜碳酸酐酶活力的低谷在 16:00, 这说明碳酸酐酶活力与体内的代谢活动分不开的。

表 3 几个不同时间测定的诸葛菜碳酸酐酶活力的差异(WAU/gFW)

Table 3 Difference of carbonic anhydrase activities in different time of measurements

测定时间 Date of determination	酶活力 CA activities
9:00am, 04/18/2002	1956.08
9:00am, 03/19/2002	2695.97
9:00am, 08/14/2001	328.12
9:00am, 08/19/2001	702.75
9:00am, 08/20/2001	658.42
9:00am, 08/25/2001	587.20
9:00am, 08/27/2001	522.58
9:00am, 08/30/2001	1089.30
9:00am, 09/04/2001	1075.98

表 4 诸葛菜和芥菜型油菜碳酸酐酶活力的日变化(WAU/gFW)(测定时间 09/3/2001)

Table 4 The diurnal changes of activities of carbonic anhydrase in *Orychophragmus violaceus* and *Brassica juncea*

取材时间 Measuring time	诸葛菜 酶活力 CA activities	取材时间 Measuring time	芥菜型油菜 酶活力 CA activities
8:00	476.28	8:00	217.80
9:00	667.79	9:00	167.45
11:00	854.29	11:00	98.23
12:00	916.87	12:00	45.67
14:00	118.86	14:00	25.35
15:00	264.72	15:00	38.21
16:00	254.30	16:00	NT
18:00	376.91	18:00	25.58

总之, 碳酸酐酶活力的变异性极大, 不同的植物, 碳酸酐酶活力不同; 同一植物不同生长发育时期的碳酸酐酶活力差异很大, 同一发育时期的不同植株酶的活力也不一致, 甚至同一植株的不同叶位的酶的活力也有较大差异。

## 2.2 碳酸酐酶胞外酶的变异性

碳酸酐酶胞外酶肩负着  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  细胞内外交换的重任。对生物的环境适应性更为重要。胞外酶对植物的喀斯特适应性具有重要意义。将诸葛菜与油菜(芥菜型油菜)的叶片沿中脉折叠, 打孔, 将对称的小圆片分成两份, 一份加入乙酰唑胺(AZ)进行预处理, 另一份进行对照, 通过比较碳酸酐酶活力来判断有无胞外碳酸酐酶。

表 5 诸葛菜和油菜不同时间内的碳酸酐酶胞外酶活力 (WAU/gFW)

Table 5 Activities of extracellular carbonic anhydrase of *Orychophragmus violaceus* and *Brassica juncea* in different time

种名 Species	测定时间 Measuring time	酶活力 (-AZ) Extracel- lular CA activities (-AZ)	酶活力 +AZ Extracel- lular CA activities (+AZ)	胞外酶活力 和比例 Extracellu- lar CA acti- vities and proportion
诸葛菜	8月20日8:30	726.5	539.1	187.4(26%)
<i>Orycho- phragmus</i>	8月20日16:30	254.2	171.8	82.40(32%)
<i>violaceus</i>	9月2日8:50	653.2	490.6	162.60(25%)
	9月2日8:50	697.7	446.3	251.40(36%)
	9月2日8:50	164.1	143.5	20.60(13%)
	9月2日8:50	206.3	144.3	62.00(30%)
	9月2日14:30	1042	992.8	49.20(5%)
	9月2日14:30	975.3	627.7	347.60(36%)
	9月2日14:30	1646	1554	92.00(6%)
油菜	8月20日8:30	884.6	228	656.60(74%)
<i>Brassica juncea</i>	8月20日14:00	227.1	207.1	20.0(9%)
	8月20日16:30	21.23	56.77	-35.54
	9月2日8:50	0	8.1	-8.10
	9月2日8:50	85.4	166.3	-80.90
	9月2日8:50	15.5	25.95	-10.45
	9月2日8:50	297.1	252.4	44.70(15%)
	9月2日8:50	86.7	12.71	73.99(85%)
	9月2日14:30	104.5	107.1	-2.60
	9月2日14:30	195.6	194.0	1.60(1%)
9月2日14:30	376.9	346.7	30.20(8%)	

比较表 5 结果可以看出, 诸葛菜和油菜都有碳酸酐酶胞外酶, 变异较大。不同植物活力差异很大。同一植物, 不同的时间差异较大, 甚至同一植株同一时间不同的叶片酶活力差异也很大, 这与碳酸酐酶本身的特性有关。因为碳酸酐酶是诱导酶, 在外界环境发生变化时, 酶被不同程度的诱导。表现出不同时间的植株的碳酸酐酶活力不同。另外, 碳酸酐酶又为很多因素所活化或抑制, 许多金属离子、阴离子、植物激素、代谢物、酸碱度等影响碳酸酐酶的活力, 因此, 碳酸酐酶活力变异性较大。

诸葛菜的总碳酸酐酶活力的平均值大于油菜, 碳酸酐酶的胞外酶的活力的平均值也远大于油菜。表 5 中出现负值有两种可能, 一方面由于测试方法的灵敏度在数值为 150 WAU/gFW 以下, 误差较大; 另一方面, 由于碳酸酐酶所催化的反应是可逆反应, 因此, 油菜的碳酸酐酶胞外酶活力较小, 应在 50 WAU/gFW 以下, 而诸葛菜的碳酸酐酶胞外酶平均活力为 191.2 WAU/gFW, 最高时可达 656.6 WAU/gFW。另外, 从表 5 中还可以看出, 碳酸酐

酶胞外酶与碳酸酐酶总酶有相关性。诸葛菜具有较高活力的碳酸酐酶胞外酶, 且较大变幅, 对诸葛菜适应喀斯特环境具有重要意义。

#### 参考文献:

- Blezinger S, Wilhelm C, Kesselmeier J. 2000. Enzymatic consumption of carbonyl sulfide(COS) by marine algae[J]. *Bio-geochemistry*, **48**:185-197.
- Bracey M H J, Christiansen P, Tovar S P, et al. 1994. Spinach carbonic anhydrase; investigation of the zinc-binding ligands by site directed mutagenesis, elemental analysis, and EXAFS [J]. *Biochemistry*, **33**:13 126-13 131.
- Gillon J, Yaki D. 2001. Influence of carbonic anhydrase activity in terrestrial vegetation on the  $^{18}\text{O}$  content of atmospheric  $\text{CO}_2$  [J]. *Science*, **291**:2 584-2 587
- Karrasch M, Bott M, Thauer R K. 1989. Carbonic anhydrase activity in acetate grown *Methanosarcina barkeri* [J]. *Arch. Microbiol.*, **151**:137-142.
- Kesselmeier J, Hubert A. 2002. Exchange of reduced volatile sulfur compounds between leaf litter and the atmosphere [J]. *Atmospheric Environment*, **36**:4 679-4 686.
- Lindskog S. 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase [J]. *Pharmacol Ther.*, **74**(1):1-20.
- Liu ZH(刘再华). 2000. The role of carbonic anhydrase as activator in carbonate rock dissolution and its significance in atmospheric  $\text{CO}_2$  precipitation (碳酸酐酶对碳酸盐岩溶解的催化作用及其在大气  $\text{CO}_2$  沉降中的意义) [J]. *Acta Geosci Sin* (地球学报), **22**(5):477-480.
- Mao ZW(毛宗万), Ji LN(计亮年). 2002. Recent progress in the carbonic anhydrase and its models(碳酸酐酶及其模型研究进展) [J]. *Progress in Chem* (化学进展), **14**(4):311-317.
- Mayaba N, Beckett R P. 2003. Increased activities of superoxide dismutase and catalase are not the mechanism of desiccation tolerance induced by hardening in the moss *Atrichum androgynum* [J]. *J Bryology*, **25**:281-286.
- Moroney J V, Husic H D, Tolbert L. 1985. Effect of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Physiol*, **79**:177-183.
- Protoschill-Krebs G, Wilhelm C, Kesselmeier J. 1996. Consumption of carbonyl sulphide (COS) by higher plant carbonic anhydrase (CA) [J]. *Atmospheric Environment*, **30**:3 151-3 156.
- Smith K S, Ferry J G. 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**:335-366.
- Stark L K. 1983. Bisexuality as an adaptation in desert mosses [J]. *American Midland Naturalist*, **110**(3):445-448.
- Wibur K M, Anderson N G. 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase [J]. *J Biol Chem*, **176**:147-154.
- Zang B(张 蓬), Li XJ(李学军). 1997. Recent progress in biology of the carbonic anhydrase(碳酸酐酶的生物学研究进展) [J]. *Progress in Physiol* (生理科学进展), **28**(4):359-361.
- Zhang Y M, Cao T Pan B R. 2002. A review on the studies of bryophyte ecology in arid and semi-arid areas [J]. *Acta Ecol Sin*, **22**(7):1 129-1 134.