

应用免疫和质谱法对亚心形扁藻氢酶蛋白进行亚细胞定位和分类

Subcellular Localization and Identification of Hydrogenase Isolated from the Marine Green Alga *Platymonas subcordiformis* Using Immunoprecipitation and MALDI-TOF MS

郭 祯^{1,2}, 陈兆安¹, 虞星炬¹, 金美芳¹, 李 伟³, 张 卫^{1*}

GUO Zhen^{1,2}, CHEN Zhao-An¹, YU Xing-Ju¹, JIN Mei-Fang¹, LI Wei³ and ZHANG Wei^{1*}

1 中国科学院大连化学物理研究所海洋生物产品工程组 大连 116023

2 中国科学院研究生院 北京 100039

3 大连水产学院食品工程系 大连 116023

1 Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

3 Department of Food Engineering, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China

摘 要 亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)是新发现的一株产氢海洋单细胞绿藻,经过胁迫调控可实现一定时间的持续产氢。氢酶是亚心形扁藻在胁迫条件下进行光合产氢的一个关键酶。但到目前为止,亚心形扁藻氢酶相关信息仍不清楚。利用蛋白合成抑制剂氯霉素和放线菌酮对亚心形扁藻氢酶活性进行考察,同时利用免疫印迹技术和免疫胶体金电镜对亚心形扁藻氢酶蛋白进行亚细胞定位分析。结果表明,亚心形扁藻氢酶蛋白可能由胞浆内合成,在叶绿体行使功能。采用免疫共沉淀技术富集亚心形扁藻细胞氢酶蛋白,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对免疫共沉淀复合物进行分离,从胶中切取目的蛋白条带,胶内酶解后进行基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析,得到相应的肽指纹图谱,通过搜索数据库检索初步断定亚心形扁藻氢酶蛋白为铁氢酶。

关键词 亚心形扁藻,氢酶,免疫共沉淀,光生物制氢,基质辅助解吸飞行时间质谱

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0297-06

Abstract A marine unicellular green alga, *Platymonas subcordiformis*, was demonstrated to photobiologically produce hydrogen gas from seawater. The objective of this study was to localize and identify the hydrogenase isolated from *P. subcordiformis*. Adaptation in the presence of inhibitors of protein biosynthesis indicated that the hydrogenase was much more inhibited by cycloheximide than that by chloramphenicol. The result suggested that the hydrogenase isolated from *P. subcordiformis* is probably synthesized in cytoplasmic ribosomes. Both Western blot analysis and immunogold electron microscopy demonstrate that the *P. subcordiformis* hydrogenase is mainly located in the chloroplast stroma. The proteins that reacted specifically with the antibodies against the iron hydrogenase isolated from *Chlamydomonas reinhardtii* were concentrated by immunoprecipitation. The separated protein bands were cut out of the SDS-PAGE gel, in-gel digested by trypsin, and analyzed by Matrix-Assisted Laser

Received: September 14, 2006; Accepted: November 15, 2006.

This work was supported by a grant from the Special Funds for National Key Basic Research Development Project "973" (No. 2003CB214506).

* Corresponding author. Tel: +86-411-84379527; Fax: +86-411-84379069; E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

国家重点基础研究发展规划"973"基金资助(No. 2003CB214506)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Mascot was employed for analysis of the MALDI data using the public databases NCBI nr. The hydrogenase isolated from *P. subcordiformis* was identified to be the Fe-hydrogenase.

Key words *Platymonas subcordiformis*, hydrogenase, immunoprecipitation, photobiohydrogen production, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

早在 19 世纪 30 年代,人们发现细菌来源的氢酶能催化最简单的化学反应——还原质子生成氢气^[1]。许多原核生物包括光合紫细菌和蓝藻及一些真核生物都具备氢代谢能力/途径^[2]。Gaffron 等发现单细胞绿藻-斜栅藻(*Scenedesmus obliquus*)光合作用过程中包含氢代谢^[3]。厌氧条件下,二氧化碳固定的同时(光还原)或者氢作为电子供体被氧化,或者在光照下产生氢气。

绿藻在光合作用过程中利用太阳能将水裂解成氧气、质子和电子,电子经光系统 II (PSII)传到质体醌(PQ),再传到光系统 I (PSI)最终通过铁氧化还原蛋白(Fd)传给氢酶,氢酶将质子还原为氢气。氢酶在绿藻产氢过程中起极其重要的作用,是维系绿藻生存的电子闸门。但绿藻氢酶对氧极其敏感,在极少量氧气的存在下,氢酶就立即失活^[4]。

近年来,国际上包括美国、德国、法国、荷兰和日本等国家已开展淡水绿藻中氢酶的生化 and 分子遗传及定向进化的研究并取得了明显进展。已从淡水绿藻——莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)^[5]、小球藻(*Chlorella fusca*)^[6]、斜栅藻(*Scenedesmus obliquus*)^[7,8]和海洋绿球藻(*Chlorococcum littorale*)^[9]中分离纯化得到几种铁氢酶蛋白,对这些铁氢酶蛋白的分子定位及活性诱导机制的研究发现,铁氢酶主要定位于叶绿体^[10],活性诱导主要与厌氧暗诱导时间、无硫培养等条件相关^[11,12]。Happe 等通过 Western-blot 技术,发现抗莱茵衣藻铁氢酶抗体能分别与分离纯化的及在 *E. coli* 中异源表达的小球藻及斜栅藻铁氢酶蛋白均能发生免疫反应^[6,7],这提示我们有可能利用抗莱茵衣藻铁氢酶抗体分离鉴定其它绿藻的铁氢酶蛋白。

亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)是本题组筛选发现的产氢海洋单细胞绿藻,经过调控可实现一定时间持续产氢,产氢能力与国际上目前研究最深入的淡水莱茵衣藻的水平相当^[13-15],但针对亚心形扁藻氢酶的相关研究尚未见报道。本文利用蛋白合成抑制剂及 Western-blot 技术和免疫胶体金电镜等技术对氢酶蛋白进行亚细胞定位,利用抗莱茵衣藻铁氢酶抗体与亚心形扁藻氢酶蛋白发生免疫共沉淀反应,并利用基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)对亚心形扁藻氢酶蛋白进行分

类鉴定。通过对亚心形扁藻氢酶的亚细胞定位及分类的研究,期望揭示扁藻氢酶参与氢代谢的重要信息,为氢酶催化机理、提高产氢效率及氢酶蛋白结构等方面的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种 亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)由辽宁省水产研究所提供,并经本实验室分离纯化。

1.1.2 试剂 抗莱茵衣藻铁氢酶抗体由德国 Happe 教授馈赠,蛋白 A-葡聚糖凝胶 CL-4B,TPCK 处理的胰蛋白酶(TPCK-trypsin),PVDF 膜,羊抗兔胶体金制剂均为 Sigma 公司产品,其余试剂均为进口分装。

1.1.3 仪器设备 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪(ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞生长和厌氧诱导 亚心形扁藻光自养连续光照生长(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,4000 Lx,光暗比为 14 h:10 h,采用灭菌后的天然海水加入康维方营养盐配制的培养基,每升海水培养基中的各种盐含量为 1.3mg FeCl_3 ,0.36mg MnCl_2 ,33.6mg H_3BO_3 ,45.0mg EDTA,20.0mg NaH_2PO_4 ,100mg NaNO_3 ,0.021mg ZnCl_2 ,0.020mg CoCl_2 ,0.009mg $(\text{NH}_4)_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$,0.020mg CuSO_4 。收集对数生长期藻细胞(细胞密度为 2×10^6 cells/mL),离心(1min,1500r/min)。洗涤后将沉淀重悬于灭菌的加康维方营养盐的天然海水培养基中。在暗处向溶液中通氮气(50mL/min)进行厌氧诱导。

1.2.2 不同的蛋白合成抑制剂对体外氢酶活性影响的测定 藻细胞分别在厌氧暗诱导 0h,0.5h,1h,2h,3h 和 4h 测定体外氢酶活性。体外氢酶活性测定方法为密闭样品共 2mL,100mmol/L 磷酸钾盐缓冲液(pH6.8)1mL,10% Triton X-100 200 μL ,1mol/L 甲基紫精 20 μL ,dd H_2O 80 μL ,1mol/L 连二亚硫酸钠 200 μL 和 500 μL 藻液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇动孵育 20min,氢气用 GC-960 气相色谱仪定量^[16],叶绿素含量用 80% 丙酮法测定^[17]。抑制剂 500 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素和 15 $\mu\text{g/mL}$ 放线菌酮分别在厌氧诱导开始前 1h 加入^[10]。

1.2.3 Percoll 梯度分离叶绿体进行 SDS-PAGE 及

Western-blot :向厌氧暗诱导 4h 后的细胞加入 5mL 细胞裂解液 (2mmol/L EDTA-Na , 1mmol/L MgCl₂ , 1mmol/L MnCl₂ , 50mmol/L Hepes-KOH , 0.33mol/L 山梨醇 , 0.5g/L BSA , 5mmol/L 抗坏血酸钠盐) 超声 (功率 400W , 间隔时间 5s , 超声时间 5s , 连续超声 5 次) , 4000r/min 离心 5min , 上清即为胞浆部分 ; 将沉淀加到 50% PBF-Percoll 梯度上 (0.33mol/L 山梨醇 , 50mmol/L Hepes-KOH , pH 8.0 , 2mmol/L EDTA-Na , 1mmol/L MgCl₂ , 1mmol/L MnCl₂ , 50% Percoll , 3% PEG600 , 1% BSA , 1% Ficoll) , 8000r/min 离心 10min , 下层即为完整的叶绿体部分^[18]。

SDS-PAGE 和 Western-Blot 方法参见文献 [19] , 采用 5% 浓缩胶 , 15% 分离胶 , 电压 150V , 电泳 1.5h , 考马斯亮蓝 R-250 染色。采用半干式转移电泳 , 按 1mA/cm² 电流转移 1.5h。将蛋白质转移至 PVDF 膜上 , 经封闭后分别与抗莱茵衣藻铁氢酶抗体 (1 : 600 稀释) 及羊抗兔胶体金制剂 (1 : 50 稀释 , 金颗粒直径为 10nm) 反应 , 对免疫胶体金信号进行显色。

1.2.4 免疫胶体金电镜对氢酶进行亚细胞定位 : 免疫金电镜切片制作方法参见文献 [20] , 离心收集细胞 , 用 2% 戊二醛固定 , 环氧树脂包埋。一抗为抗莱茵衣藻铁氢酶抗体 (1 : 300 稀释) , 二抗为羊抗兔胶体金制剂 (1 : 20 稀释) 。对照组不加一抗 , 直接加二抗孵育。

1.2.5 裂解细胞及超滤蛋白 : 将暗诱导 4h 后的藻细胞离心 (1min , 1500r/min) , 沉淀用细胞裂解液 (pH7.4 , 50mmol/L PBS 缓冲液 , 300mmol/L NaCl , 0.5% 脱氧胆酸钠 , 0.1% SDS , 1mmol/L EDTA , 1% Triton X-100 , 100mmol/L PMSF) 重新悬浮 , 在 4℃ 静置 3h 后进行超声 (工作时间 5s , 间隙 5s , 工作次数 5 次 , 功率 400W) , 12 000r/min 离心细胞裂解液 10min。

将上清转移到 Amicon Ultra-4 100kD 离心超滤管 , 4000r/min 离心 20min。再将下层液体转移到 Amicon Ultra-4 10kD 离心超滤管 , 4000r/min 离心 20min。将截留在上层的蛋白质用细胞裂解液重新悬浮 , 转移到新的 Eppendorf 管中 , 冷冻干燥过夜。

1.2.6 免疫共沉淀 : 将冷冻干燥后的样品重悬于细胞裂解液中 , 取 200μL (~ 200μg) 裂解液 , 加入 100μL 已处理过的蛋白 A-葡聚糖凝胶 CL-4B 悬液 (~ 50μL 凝胶) , 4℃ 搅拌 2h。样品于 15 000r/min 离心 5min 后 , 将上清转到新的 Eppendorf 管内 , 加入 100μL 抗莱茵衣藻铁氢酶抗体 , 混匀并在 4℃ 下温和搅拌过夜。向搅拌体系加入 100μL 蛋白 A-葡聚糖凝胶悬液 , 4℃ 温和搅拌 2h , 15 000r/min 离心 5min 以回收体

系内免疫复合体。100℃ 处理凝胶颗粒 5min , 冷却后离心收集上清。加 20μL 样品 (~ 40μg 蛋白) 进行 15% SDS-PAGE 电泳。

1.2.7 胶内酶解及 MALDI-TOF-质谱分析和数据库检索 : 从胶中切取目的蛋白条带 , 进行脱色、还原、烷基化、酶解、萃取和脱盐处理^[21]。对制备好的样品在基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF-MS) 上进行分析。通过 Mascot 查询 NCBI 数据库对蛋白质进行鉴定。

2 结果与讨论

2.1 不同的蛋白合成抑制剂对亚心形扁藻体外氢酶活性表达的影响

氯霉素是叶绿体蛋白合成的抑制剂 , 对蛋白的合成有阻断作用 ; 而放线菌酮是胞浆蛋白合成的抑制剂 , 抑制真核细胞核蛋白体大亚基转肽酶的活性和翻译过程^[22]。为了考察亚心形扁藻氢酶的定位 , 我们首先采用蛋白合成抑制剂氯霉素及放线菌酮对亚心形扁藻氢酶活性表达进行研究 (结果见图 1)。从图 1 可见 , 对照组未经诱导时细胞无氢酶活性 , 随着厌氧暗诱导时间的延长 , 氢酶活性逐渐增加 , 4h 达到最大活性。经氯霉素处理后的细胞与对照组细胞相比 , 不同厌氧暗诱导时间的氢酶活性均有所下降 , 但影响不大 ; 而经放线菌酮处理后的细胞与对照组细胞相比 , 不同厌氧暗诱导时间氢酶活性显著下降 , 降低到对照组氢酶活性的 1/3 以下。实验结果表明 : 氯霉素及放线菌酮均能抑制亚心形扁藻氢酶活性 , 放线菌酮影响比氯霉素更显著。说明亚心形扁藻氢酶可能是由胞浆核糖体合成的。

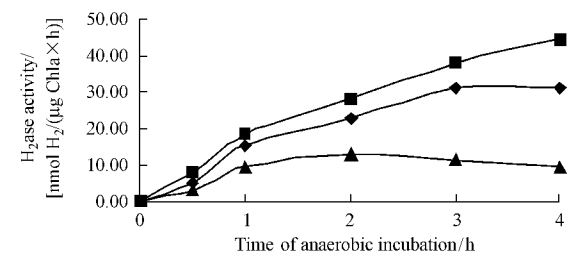


图 1 不同的蛋白合成抑制剂对亚心形扁藻体外氢酶活性表达的影响

Fig.1 *In vitro* hydrogenase activity in the presence of inhibitors of protein synthesis during anaerobic adaptation of *Platymonas subcordiformis*

Control (■); 500 μg/mL chloramphenicol (◆); 15 μg/mL cycloheximide (▲).

2.2 胞浆和叶绿体 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

为了考察亚心形扁藻氢酶在细胞水平的定位 ,

我们分别对经 Percoll 分离后得到的胞浆组分和叶绿体组分进行 SDS-PAGE 电泳,并利用抗莱茵衣藻铁氢酶抗体进行 Western-blot 分析。图 2A 和 2B 分别是经 Percoll 梯度分离得到的亚心形扁藻胞浆组分和叶绿体组分 SDS-PAGE 和 Western-blot 图谱。由图 2B 可见,叶绿体组分显色明显,而胞浆组分无显色反应。说明亚心形扁藻氢酶主要定位于叶绿体中。

2.3 免疫胶体金电镜对氢酶分子进行亚细胞定位

为进一步考察亚心形扁藻氢酶在亚细胞水平的分子定位,我们利用免疫胶体金电镜对其进行研究(图 3)。从图 3 中可以看到,对照组不加抗莱茵衣藻铁氢酶抗体,直接加入羊抗兔胶体金制剂,未见胶体金颗粒(图 3A)。而加入抗莱茵衣藻铁氢酶抗体后,胶体金颗粒主要分布于叶绿体基质中(图 3B),以上实验结果说明亚心形扁藻的氢酶定位于叶绿体基质。目前文献报道的淡水藻——莱茵衣藻氢酶蛋

白定位于叶绿体基质中^[10],斜栅藻的氢酶蛋白定位于叶绿体^[7],而小球藻和海洋绿球藻的氢酶蛋白的定位则未见报道^[6,9]。

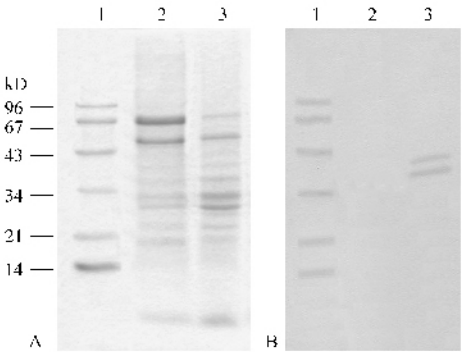


图 2 亚心形扁藻胞浆组分和叶绿体组分 SDS-PAGE(A)和 Western-blot(B)

Fig.2 The SDS-PAGE(A) and Western-blot analysis(B) of cytoplasm fraction and chloroplast fraction in *P. subcordiformis* 1:low molecular weight protein marker; 2: induced cytoplasm; 3: induced intact chloroplast.

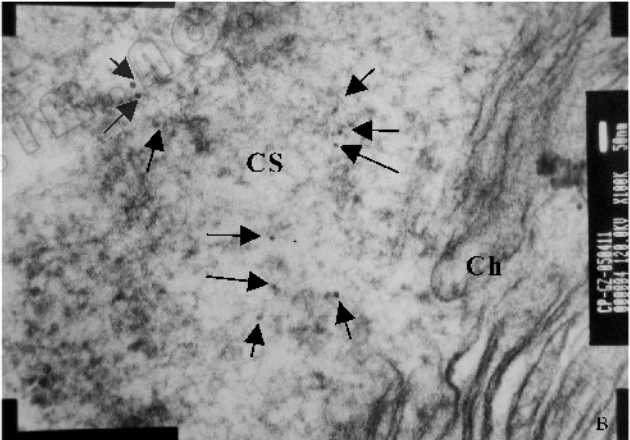
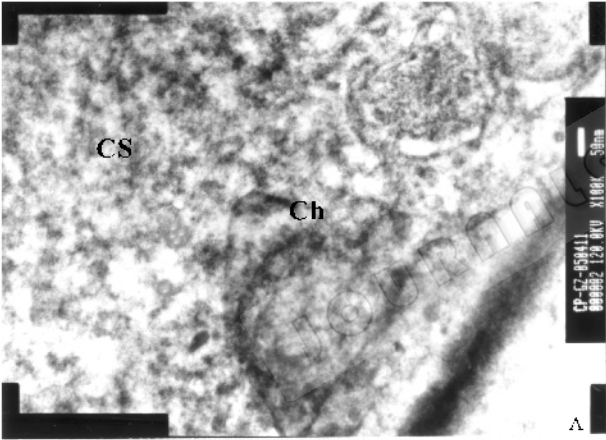


图 3 免疫胶体金电镜对亚心形扁藻氢酶定位

Fig.3 Hydrogenase subcellular localization in *P. subcordiformis* cells using immunogold electron microscopy

The colloidal gold particles were found predominantly in the chloroplast stroma. Immunogold labellings are shown by small black arrows. Bar represents 50nm. The magnification was 100 000 times. A: control group, B: addition anti-hydrogenase *Chlamydomonas reinhardtii* antibody group. Ch and CS denote chloroplast and chloroplast stroma, respectively.

2.4 免疫共沉淀

利用免疫共沉淀可检测出混合物中的目标蛋白。本文利用抗莱茵衣藻铁氢酶抗体与亚心形扁藻蛋白进行免疫共沉淀反应,从而将亚心形扁藻氢酶蛋白从混合蛋白中分离出来。图 4 为亚心形扁藻免疫共沉淀后蛋白 SDS-PAGE 图谱。从图 4 可以看出,亚心形扁藻氢酶蛋白与抗莱茵衣藻铁氢酶抗体发生免疫共沉淀反应。Happe 等分别利用抗莱茵衣藻铁氢酶抗体与纯化的蛋白及 *E. coli* 异源表达的重组蛋白做 Western-blot,发现小球藻与斜栅藻的铁氢酶蛋白均能与抗莱茵衣藻铁氢酶抗体发生免疫交

叉反应^[6,7]。说明亚心形扁藻铁氢酶蛋白与其它绿藻铁氢酶蛋白之间存在一定的抗原同源性,可以利用抗莱茵衣藻铁氢酶抗体分离鉴定其它绿藻的铁氢酶蛋白。

2.5 蛋白条带肽指纹图谱数据库检索

从胶中切取免疫共沉淀的蛋白条带,进行脱色、还原、烷基化、酶解、萃取和脱盐处理,用胰蛋白酶胶内酶解后,进行 MALDI-TOF-质谱分析,得到相应的肽段酶解图谱。图 5 为目的蛋白胶内酶解后 MALDI 质谱图。通过 MALDI-TOF-MS 来检测胰蛋白酶酶切后产生的肽段,进行数据库检索(Mascot)来实现对

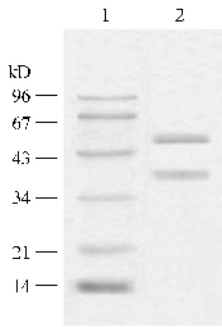


图 4 亚心形扁藻免疫共沉淀后蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 The result from immunoprecipitation by SDS-PAGE analysis of *P. subcordiformis*

1 : low molecular weight protein marker ; 2 : immunoprecipitated proteins.

亚心形扁藻氢酶蛋白的鉴定。利用 Mascot 软件在 NCBI 数据库搜寻 27 个肽段 ,此蛋白与莱茵衣藻铁氢酶蛋白肽段匹配达 13 个(其 m/z 分别为 2162 , 2134 ,1234 ,3212 ,3055 ,2716 ,1829 ,1404 ,2866 ,3463 , 1864 ,1622 ,1636) 结果发现该蛋白与莱茵衣藻的铁氢酶蛋白相匹配 ,得分为 57($P < 0.05$) ,因此初步断定亚心形扁藻氢酶蛋白为铁氢酶蛋白。

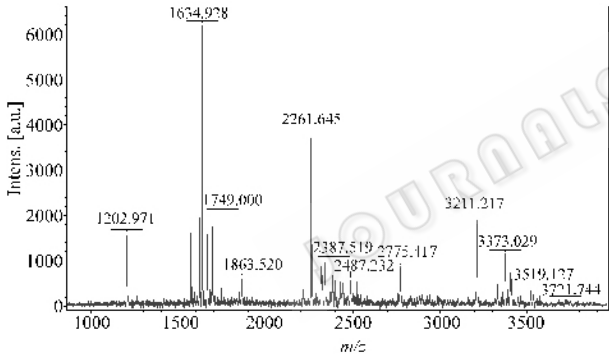


图 5 亚心形扁藻氢酶蛋白胰蛋白酶酶解 MALDI 质谱图

Fig.5 MALDI mass spectrum of the tryptic digestion of hydrogenase from *P. subcordiformis*

由于亚心形扁藻是新发现的产氢海洋绿藻 , NCBI 报道的基因及蛋白等信息很少 ,目前只能借鉴莱茵衣藻及其它绿藻的相关信息进行分析。有关亚心形扁藻氢酶基因及蛋白后续研究工作仍在进行中 ,对其深入研究将有助于明确氢酶在产氢过程中的作用机理。

3 结论

(1)利用蛋白合成抑制剂氯霉素和放线菌酮对亚心形扁藻氢酶活性表达进行考察 ,结果表明 :氯霉素及放线菌酮均能抑制亚心形扁藻氢酶活性 ,放线菌酮影响效果比氯霉素更显著。说明亚心形扁藻氢酶可能由胞浆核糖体合成。

(2)利用免疫印迹技术和免疫胶体金电镜对亚心形扁藻氢酶蛋白进行亚细胞定位分析表明 :亚心形扁藻氢酶蛋白定位于叶绿体基质。

(3)采用免疫共沉淀技术富集亚心形扁藻细胞氢酶蛋白 ,对该蛋白进行胰蛋白酶酶解后进行基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析 ,得到相应的肽指纹图谱 ,通过搜索数据库检索发现该蛋白与莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)铁氢酶蛋白相匹配 ,初步推断亚心形扁藻氢酶蛋白为铁氢酶蛋白。

REFERENCES(参考文献)

[1] Stephenson M , Stickland LH. Hydrogenase : a bacterial enzyme activating molecular hydrogen. *Journal of Biochemistry* ,1931 , **25** : 205 – 214.

[2] Vignais PM , Billoud B , Meyer J. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews* 2001 **25** :455 – 501.

[3] Gaffron H. Reduction of CO₂ with H₂ in green plants. *Nature* , 1939 , **143** :204 – 205.

[4] Happe T , Hemschemeier A , Winkler M , *et al.* Hydrogenases in green algae : do they save the algae 's life and solve our energy problems ? *Trends in Plant Science* ,2002 **7** :246 – 250.

[5] Happe T , Naber JD. Isolation , characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* . *European Journal of Biochemistry* , 1993 **214** :475 – 481.

[6] Winkler M , Heil B , Happe T. Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca* . *Biochimica et Biophysica Acta* ,2002 **1576** : 330 – 334.

[7] Florin L , Tsokoglou A , Happe T. A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. *The Journal of Biology Chemistry* 2001 , **276** :6125 – 6132.

[8] Wunschiers R , Stangier K , Senger H , *et al.* Molecular evidence for a Fe-hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* . *Current Microbiology* 2001 **42** :353 – 360.

[9] Ueno Y , Kurano N , Miyachi S. Purification and characterization of hydrogenase from the marine green alga , *Chlorococcum littorale* . *FEBS Letters* ,1999 **443** :144 – 148.

[10] Happe T , Mosler B , Naber JD. Induction , localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* . *European Journal of Biochemistry* ,1994 ,**222** :769 – 774.

[11] Happe T , Kaminski A. Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* . *European Journal of Biochemistry* ,2002 **269** :1022 –

- [12] Forestier M, King P, Zhang L, *et al.* Expression of two[Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. *European Journal of Biochemistry*, 2003, **270**: 2750 – 2758.
- [13] Guan Y, Deng M, Yu X, *et al.* Two-stage photo-biological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis*. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, **19**: 69 – 73.
- [14] Guan Y, Zhang W, Deng M, *et al.* Significant enhancement of photobiological H₂ evolution by carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone in the marine green alga *Platymonas subcordiformis*. *Biotechnology Letters*, 2004, **26**: 1031 – 1035.
- [15] Ran C, Yu X, Jin M, *et al.* Role of carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone in enhancing photobiological hydrogen production by marine green alga *Platymonas subcordiformis*. *Biotechnology Progress*, 2006, **22**: 438 – 443.
- [16] Adams MW, Hall DO. Purification of the membrane-bound hydrogenase of *Escherichia coli*. *The Journal of Biochemistry*, 1979, **183**: 11 – 22.
- [17] Zhang L, Happe T, Melis A. Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*, 2002, **214**: 552 – 561.
- [18] Mason CB, Matthews S, Bricker TM, *et al.* Simplified procedure for the isolation of intact chloroplasts from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 1991, **97**: 1576 – 1580.
- [19] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [20] David LS, Robert DG, Leslie AL, *et al.* *Cells: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [21] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, *et al.* Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 1996, **68**: 850 – 858.
- [22] Roessler PG, Lien S. Activation and *de novo* synthesis of hydrogenase in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*, 1984, **76**: 1086 – 1089.