

海洋浮游植物硝酸还原酶研究进展

Study on process of nitrate reductase (NR) in marine phyton-plankton

洪华生, 王玉珏, 王立志

(厦门大学 近岸海洋环境科学国家重点实验室 环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

中图分类号: Q554⁺.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)10-0004-07

硝酸还原酶(NR; EC 1.6.6.1)是存在于包括浮游植物在内的光合自养生物体内的一种诱导酶^[1]。作为浮游植物吸收同化硝酸盐过程中的第一种酶, 它既是硝酸盐吸收过程中涉及到的主要的酶, 也是硝酸盐新陈代谢过程中的主要调节酶^[2, 3]。该酶主要以 NADH (nicotinamide adenine dinucleotide, 烟碱腺嘌呤二核苷酸) 或 NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 烟碱腺嘌呤二核苷酸磷酸) 作为电子提供者将硝氮还原为亚硝氮。硝酸还原酶在硝氮存在时被诱导合成, 在硝酸盐缺乏或其它还原态的氮盐存在时分解, 该分解过程目前还知之甚少^[4]。

硝酸还原酶是一种高分子化合物, 通常被认为是一种同型二聚体 (homodimer), 由 3 个辅基组成: FAD (flavin adenine dinucleotide, 黄素腺嘌呤二核苷酸), heme (亚铁血红素, 细胞色素 b) 和 Mo - pterin (蝶呤), 这三个辅基在一定条件下均可以单独作用, 这导致该酶具有几个部分的活性^[4] (图 1)。该酶发生作用的平衡常数为 $10^{25} \sim 10^{40}$, 非常强烈地倾向于生成亚硝氮的方向, 将硝酸盐还原为亚硝酸盐的反应几乎是单向非可逆的。不同生物中硝酸还原酶的亚基组成和分子量变化很大: 菠菜硝酸还原酶含有两个亚基, 分子质量为 200 ku, 而绿藻 *Ankistrodesmus braunii* 硝酸还原酶中含有分子质量为 58 ku 的 8 个亚基, 总分子质量为 500 ku。

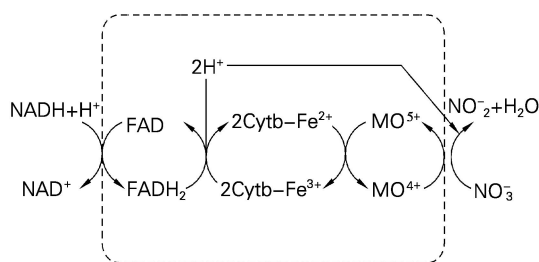


图 1 硝酸还原酶的分子组成 (虚线范围内)

1 海洋浮游植物中硝酸还原酶的研究作用及意义

营养盐是海洋浮游植物生长所必需的成分, 海水中某种营养盐含量过低往往对浮游植物生长形成限制。氮、磷营养盐在环境中存在的水平和形态直接控制着浮游植物种群结构、更替、生物量和生产力等。近年来随着海洋生物地球化学研究的不断深入, 不同浮游植物营养盐代谢的生化和分子基础引起了人们的重视^[4-7]。氮在多数海区被认为是浮游植物生长的营养盐限制因素^[8, 9]。不同氮源的获得、吸收和同化速率在调节浮游植物的生长中起着重要作用。硝态氮是海水中的氮的一种最主要的氮的存在形态, 海洋浮游植物对硝氮的吸收和同化过程的研究对于研究海洋初级生产力具有重要意义。目前在海洋氮方面开展了较多的工作, 已基本了解氮在光合浮游植物中的代谢转化途径及调控机制^[10, 11]。

通常所提到的广义上的氮的同化和狭义上的硝酸盐的同化的重要性不仅表现在常说的氮作为初级生产力的限制性因素方面, 还表现在生产利用新得到的氮 (如硝氮) 和再生氮 (如氨氮) 的区别。因此, 研究海洋浮游植物对硝氮的吸收对理解一些海区的初级生产力速率和生物地球化学循环具有重要作用。目前对于硝氮的吸收速率的研究主要利用稳定同位素追踪的方法来进行。但该方法存在明显的缺陷: 加入的标记的氮可能会干扰营养盐限制的体系^[12], 而且经常会出现标记的 N^{15} 丢失的现象, 最终 N^{15} 被应用

收稿日期: 2007-03-20; 修回日期: 2007-06-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40331004)

作者简介: 洪华生 (1947-), 女, 教授, 博士生导师, 从事海洋生物地球化学及海岸带综合管理研究, 电话: 0592-2182216, E-mail: hshong@xmu.edu.cn



于浮游植物群体,对于单一种群的氮的吸收则很难判断。可见,研究氮同化过程中涉及到的酶,尤其是诱导酶体系,已经成为确定氮利用的一条途径。这些诱导过程通常对应着特定形态的氮,在与其它标记物结合时,可以用来得到营养盐在被利用前和在生物体内的重要数据。在从硝氮到氨氮的过程中,第一个酶是硝酸还原酶,催化还原硝酸氮为亚硝酸氮且被认为是从硝酸到氨的转化过程中的限制步骤,在植物体内控制着硝酸盐同化的初级调节步骤。对硝酸还原酶的研究对于研究浮游植物对氮的吸收和同化过程具有重要意义。

Eppley 等^[13]和 Eppley 等^[14]在 1969 年首次讨论了硝酸还原酶在研究浮游植物生态学中的作用。他们观察到浮游植物在氨氮浓度较高或硝氮缺乏的情况下硝酸还原酶的活性较低或几乎不存在,因而硝酸还原酶的活性不仅可用来指示海洋浮游植物所利用的氮源是硝氮还是氨氮,还可以作为在水华期浮游植物硝氮缺乏的生物指示标志物。Packard 等^[15]在 Beevers 和 Hageman^[16]观察到硝酸还原酶的活性限制植物对硝酸盐的同化的结论基础上,认为硝酸还原酶的活性可以用来指示海洋中浮游植物对硝酸盐的同化速率。尽管关于该结论的正确性有人提出过质疑^[5],但酶在海洋浮游植物对氮的利用的研究上的重要性不容置疑。

Joseph 等^[17]则认为硝酸还原酶活性可能与吸收到细胞内部的硝酸盐的含量有关,通过硝酸还原酶活性可解释直接测到的细胞内硝酸盐的下降,且只要不存在其它氮源的吸收,后来测得的酶活等于当时的速率。Dortch^[18]发现在特定的条件下硝酸还原酶的活性可以约等于氮的同化速率,该特定条件包括:在氮限制培养实验的稳定阶段,在外部氮的吸收速率降至非常低时加入硝酸盐,或在氮限制培养时加入硝酸盐。

硝酸还原酶活性是硝酸盐吸收和利用速率限制因子的假定对于一些硅藻是正确的^[5,19],但在同化过程中其它的一些步骤也对吸收和利用过程产生影响。在一些特殊情况下,亚硝酸还原酶可能是限制性因素,而谷氨酰胺合成酶可能是另一个限制性的因

素。作为具有专一性(特异性)的酶,硝酸还原酶只能限制细胞内硝氮到亚硝酸氮的还原速率而不一定能限制硝氮到氨氮的还原速率^[5]。

2 硝酸还原酶理化特性

2.1 还原剂的选择

硝酸还原酶可以利用 NADH 或 NADPH 做为电子提供者。根据利用 NADH 还是 NADPH,硝酸还原酶可分为不同的形态。目前发现 3 种形态的硝酸还原酶,两种存在于海洋浮游植物和高等植物中,可利用 NADH 或同时利用 NADH 和 NADPH;第三种仅在真菌类中发现,专门用 NADPH。

在光合生物中利用 NADH 提供电子的硝酸还原酶较常见,在一些特殊条件下也发现有 NADPH 提供电子的情况,但具体情况还未得到普遍确定,不同研究者的结果也会存在不同。Syrett^[20]在一篇综述中表明,绿藻中的硝酸还原酶仅利用 NADPH;Hochman^[21]指出淡水中甲藻 *Peridinium cinctum* 的 NADPH-NR 的活性仅占 NADH-NR 活性的 16.5%;Serra 等^[22]在硅藻中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 中发现部分的 NADPH-NR 的活性,约占 NADH-NR 活性的 16%;Gao 等^[23]则发现在硅藻中肋骨条藻中仅存在 NADPH-NR 的活性;Berges 和 Harrison^[5]对多种藻类进行了研究,结果发现仅绿藻 (*Chlorophyceae* 和 *Prasinophyceae*) 中硝酸还原酶可利用 NADPH 代替 NADH, *Prymnesiophyceae* 中也发现一种可表现出活性(表 1);Berges 等^[4,20]通过利用不同的底物,也证明了硝酸还原酶组成上的多样性,认为 NADPH 的应用明显地仅限于绿藻。对于该问题的一个可能解释是细胞膜中存在 NADH:NADPH 转氢酶。如果细胞膜中存在该酶,加入的 NADPH 可以被转化为 NADH 从而被 NADPH-NR 利用。对于原核的细菌,NADH 和 NADPH 都不能提供电子,原核细菌利用铁氧化还原蛋白而不是嘧啶核苷提供电子^[24],加入该种物质可以促进亚硝酸还原酶的活性而抑制硝酸还原酶的活性。若通过测定亚硝酸盐产物来确定硝酸还原酶的活性,则有可能结果偏低,因为亚硝酸还原酶利用铁氧化还原蛋白



将亚硝氮还原为氨氮^[25]。

表1 不同浮游植物种群利用 NADPH 作为电子提供者时的活性表达

生物名称	活性比(%)
Bacillariophyceae	
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	5.10 ±2.86
<i>Skeletonema costatum</i>	3.01 ±2.99
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	4.37 ±1.59
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	29.9 ±16.9
<i>Ditylum brightwellii</i>	
Chlorophyceae	
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	93.9 ±3.4
<i>Chlamydomonas</i> sp.	79.0 ±23.3
Cyanophyceae	
<i>Synechococcus</i> sp.	nd
Prymnesiophyceae	
<i>Pavlova lutheri</i>	35.2 ±9.6
<i>Isochrysis galbana</i>	0.58 ±8.01
<i>Emiliania huxleyi</i>	1.03 ±0.47
Prasinophyceae	
<i>Tetraselmis</i> sp.	39.0 ±14.6
Dinophyceae	
<i>Amphidinium carterae</i>	39.9 ±5.61
<i>Gymnodinium sanguineum</i>	1.69 ±1.29
<i>Prorocentrum minimum</i>	0.30 ±0.31

注:活性表达占用 NADH 作为电子提供者时的活性的平均百分比表示(±SE, n=2), nd 用 NADH 时无活性表达

2.2 反应体系的影响

硝酸还原酶的活性在温度为 20~25 之间, pH 为 7.9 的磷酸缓冲液中存在最大值, 这一点已经被实验证明并得到公认。Joseph 等^[1]分别在 8, 22, 28 下对 *Rhizosolenia* 中的硝酸还原酶活性进行实验, 发现最佳反应温度为 22。Granbom 等^[26]对 *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) 的硝酸还原酶活性在温度为 5, 10, 15, 20, 22, 30, 35 时, pH 为 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 条件下的测定表明, 在温度 20 和 22, pH 为 7.9 时活性值最高。Berges 和 Harrison^[5]分别在 pH 为 7.9 的磷酸缓冲体系、咪唑缓冲体系、Tris((hydroxymethyl) aminomethane) 缓冲体系和 MOPS(3-(N-Morpholin-yl) propanesulfonic acid) 缓冲体系中对 *Thalassiosira pseudonana* 中的硝酸还原酶活性进行测定, 亦发现在 pH 为 7.9 的磷酸缓冲体系中存在最高值。

FAD 也是影响硝酸还原酶活性的一个重要因子。在一些藻类中, FAD 是获得高酶活性的必需条件。Joseph^[1]对 *Rhizosolenia* 中硝酸还原酶的研究发现, FAD 的加入提高了硝酸还原酶的活性。Ever-

est 等^[27]发现, 在一些海洋藻类中 FAD 的存在可使硝酸还原酶活性达到最大值。但 Berges 和 Harrison^[5]则发现, FAD 的加入对不同种藻类硝酸还原酶活性的影响不同, 建议除非是一些特殊种类否则不要使用。

金属离子的影响对不同的藻体也各不相同。Eppley^[13]的研究认为 $MgSO_4$ 的加入有利于提高硝酸还原酶的活性, Huber 等^[28]的研究中也证明 $MgSO_4$ 会对硝酸还原酶的活性起到调节作用, 而 Berges 和 Harrison^[5]则发现 $MgSO_4$ 的加入对 *T. pseudonana* 硝酸还原酶的活性无影响。

2.3 酶的稳定性

硝酸还原酶比较不稳定, 常温下, 即使存在牛血清蛋白(BSA) 120 min 后活性也会降低至 20%^[5]。Hersey and Swift 1976 年也发现甲藻的硝酸还原酶的活性在 2~3 h 内下降了一半。Everest 等^[27]指出海洋浮游植物中硝酸还原酶的活性在 0 下可稳定 24 h。Harrison^[29]发现 *Gonyaulax polyedra* 中硝酸还原酶在 0, 24~30 h 内活性下降一半, 在 *T. pseudonana* 中, 0 下硝酸还原酶可稳定 60 min, 在液氮中保存, 硝酸还原酶的活性可存在更长时间。Ahmed 等^[30]发现海洋浮游植物的整个细胞中 ETS 和 GDH 活性在液氮中一年内不降低, 但 Clayton^[31]的实验结果表明, 液氮中保存的中肋骨条藻的硝酸还原酶的活性降低了 40%。Granbom 等^[26]对 *Kappaphycus alvarezii* 的研究发现, 硝酸还原酶活性在 4 可维持一周, 在 -20 下 3 d 降低了 40%, 在 -70 下活性可维持 10 d 几乎不下降。Berges 和 Harrison^[5]在液氮中的实验亦未发现有降低现象。

3 硝酸还原酶活性的影响因子

硝酸还原酶的表达是一个复杂的过程, 受到各种环境因素和生长条件的影响, 包括硝酸盐浓度、氨盐浓度、光合辐照度、温度、碳架结构、氧含量和二氧化碳浓度的影响。此外, 细胞的生理状况(包括碳氧化合物含量、光合作用和生理周期)等也控制硝酸还原酶的活性。在这些因素中, 光和硝酸盐浓度被认为是控制硝酸还原酶活性的最重要的因素。

3.1 硝酸盐的影响

在 *Pavin* 中, 硝酸还原酶的活性与介质中硝酸盐浓度、不同形态无机氮比例、不同藻类生物量和叶绿素含量有关。但在真核生物中, 硝酸还原酶活性的变化更复杂。种群的硝酸还原酶活性似乎与培养基中无机氮的浓度无关, 而与自然光合作用群落中的物种组成有关。



许多研究表明,硝酸盐的吸收和还原之间并不总是存在耦合关系。如中肋骨条藻,其体内含有硝酸盐贮库,可贮存硝酸盐,在硝酸盐耗尽时或耗尽后可利用贮库中的硝酸盐来维持在外界低硝酸盐浓度下的高还原率。Blasco 等^[6]的研究表明,吸收比还原更易受环境变化的影响。这些结果表明内部的硝酸盐贮库可对体外硝酸盐浓度的变化起缓冲作用。

一些研究者发现,将正在生长的绿藻和硅藻细胞转移到以氨氮为唯一氮源的介质中,可检测到明显的硝酸还原酶活性,从而提出硝氮可能不是合成硝酸还原酶所必需的^[32,33]。Joseph 等^[11]则认为硝酸还原酶的活性依赖于细胞内硝酸盐的浓度而非周围环境中硝酸盐的浓度。Kessler 和 Amy 等^[32,33]观察到,硝酸还原酶的活性并不是由外界铵盐引起的,而是由于细胞内累积的硝酸盐贮库引起的。Eppley 等^[14]认为,硝酸还原酶活性在以铵为氮源的细胞中被抑制,或在以硝酸盐为氮源生长的细胞中当氨的浓度在 $0.5 \sim 1 \mu\text{mol/L}$ 时受抑制。Blasco 等^[6]对秘鲁上升流两个航次的数据分析也发现,在氨氮浓度高的地区硝酸还原酶的活性和硝酸盐的吸收速率均呈现明显的下降。

在很多藻类中都发现,氨氮对硝酸还原酶活性具有抑制作用。尽管现在对氨氮是间接通过消除硝氮的转移起作用还是直接对酶的合成或转录后的翻译修复过程起作用还存在着争论^[20,34,35]。需要指出的是,氨氮的存在对硝酸还原酶活性的影响应该区别于由于藻类对氨氮的优先利用产生的抑制作用^[36]。在一些浮游植物尤其是甲藻中,也存在着硝酸还原酶活性不受氨氮抑制的现象。氨氮不影响甲藻硝酸还原酶活性可能是因为硝酸还原酶存在于叶绿体内,而其它藻类通常存在于细胞质内^[37]。

Blasco 等^[6]通过分析秘鲁上升流区硝酸还原酶活性和浮游植物硝酸盐吸收速率的关系时发现,两个航次中硝酸还原酶的活性均与硝酸盐的吸收速率呈现正相关。Berges 和 Harrison^[5]对 12 个种类的浮游藻类进行了研究,发现硝酸还原酶活性和硝氮吸收速率间的平均斜率约为 0.78,即硝酸还原酶的活性不能完全表达硝酸盐的吸收速率,但两者之间呈正相关性则是无疑的。不同藻种间的变化非常大,硅藻倾向于完全表达,即为 1:1 的关系,如 *D. tertiolecta* 和 *E. huxleyi* 表现出足够高的硝酸还原酶的活性,可以用来表达硝氮的吸收速率,而甲藻硝酸还原酶的活性远低于硝氮的吸收速率,对一些古细菌如 *Synechococcus* 则几乎测不到活性。Joseph^[17]对 *Rhizosolenia formosa* 的研究也发现,硝酸还原酶的

活性与计算得到的细胞对氮的需求之间有很好的线性关系。

3.2 光照的影响

对许多浮游植物而言,硝酸还原酶的活性与光强变化一致,高光强时活性高,黑暗条件下活性低。硝酸还原酶活性受到光照影响的具体原因还不清楚,可能是由于硝酸盐的吸收以及酶对底物的可利用性导致了酶蛋白或硝酸还原酶的转录或转译的直接影响。光的影响似乎同时涉及到红光接收体(可能是一种光敏色素)和蓝光接收体(可能是一种黄素蛋白)。许多研究表明硝酸还原酶的活性和硝酸还原蛋白的量都显示出一昼夜的节律,周期大约为 24 h。硝酸还原酶的日夜节律模式在绿藻、原核细菌、硅藻和其它色素植物间有所不同。光促进硝酸还原酶的合成可能与碳的代谢有关。如果有碳源,球石藻在黑暗中可同化硝酸盐。海洋光合自养生物在黑暗中也会被诱导产生硝酸还原酶,而且海洋硅藻在黎明前硝酸还原酶的活性升高已经是一个非常明确的特性。

3.3 昼夜节律的影响

硝酸还原酶的活性和硝酸还原蛋白的量都显示出一昼夜的节律,周期大约为 24 h。硝酸还原酶的日夜节律模式在绿藻、原核细菌、硅藻和其它色素植物间有所不同。

1975 年 Harris^[38]首次研究发现 *Gonyaulax* 中指示的硝酸还原酶活性的蛋白呈昼夜(24 h)的变动。Ramalho 等对 *Gonyaulax polyedra* 的研究再次证明了该结论,发现其体内硝酸还原酶蛋白活性无论在 LD 条件下还是在 LL 条件下,均呈现 24 h 节律。*Arabidopsis* 的硝酸还原酶的 mRNA 在 LD 和 LL 下均表现出按照 24 h 节律的模式积累,可持续 5 d,酶活性也按该规律变化,但不如蛋白变化的规律性强^[39]。

Joseph 等^[11]对 *Rhizosolenia mat* 分析发现,该藻硝酸还原酶活性呈现 24 h 节律变化趋势:最高在 13:00~16:00,最低在 21:00~24:00。

Lopes^[40]对 *Gracilaria tenuistipitata* 的硝酸还原酶活性进行了 24 h 的研究,发现硝酸还原酶活性在中午时段达最高值,约是黑暗条件下的 30 倍。当藻被放在长期光照时,较 12 h 光:暗循环的活性高,而长期培养于黑暗条件下,硝酸还原酶活性最低。采用 western blot 技术,也发现蛋白含量的变化同活性变化一致。

Granboma 等^[26]对 *Kappaphycus alvarezii* 的周日变化研究表明,最大活性出现在 LD 培养的 6 h,黑暗条件下活性最小。硝酸还原酶活性在光暗之前开



始降低,在黑暗条件下仅为最大活性的 25%。当藻体在光量子通量密度为 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时,LL 下生理节奏是 24 h 间隔(连续光照的从 24~48 h 期间测定)且在整个培养期间硝酸还原酶活性维持较高,在 25 和 $55 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下该规律则不复存在(先在 $55 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下连续光照 24 h,再转入 25,55,100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的条件)。

4 硝酸还原酶的分子调控机制

对不同海洋浮游植物中硝酸还原酶的分子调控研究重点集中在硝酸还原酶的转录表达、酶分子结构以及硝酸还原酶抗体的研究方面。

1975 年, Harris^[38] 首次对 *Gonyaulax* 中的硝酸还原酶的活性蛋白进行研究,发现其含量呈昼夜节律(24 h)的变动,1995 年 Ramalho 等^[39] 对 *Gonyaulax polyedra* 的研究再次证明了该结论。Ramalho 等^[39] 对 *Arabidopsis* 中硝酸还原酶进行的 Western blot 的实验结果表明,硝酸还原酶蛋白含量的变化和活性变化相一致,表明蛋白在每天合成和降解。*Arabidopsis* 的硝酸还原酶的 mRNA 在 LD 和 LL 下均表现出 24 h 的变化模式,可持续 5 d,酶活性也呈现同一变化模式。采用蛋白分析和 mRNA 的方法可以更清晰准确地对硝酸还原酶的生理规律进行研究。

尽管不同真核生物中硝酸还原酶的作用是相似的,都是一种典型的寡聚酶,但在数目、大小以及亚基的组成上变化非常大。不同研究者通过电泳实验对不同生物体内硝酸还原酶蛋白进行分析,发现 *Chlorella vulgaris* 中硝酸还原酶由 4 个分子质量为 90 ku 的亚基组成, *Ankistrodesmus braunii* 则是由 8 个分子质量为 60 ku 的亚基组成, *Neurospora crassa* 和 *Rhodotorula glutinis* 均含有 2 个分子质量分别是 115 ku 和 118 ku 的亚基。据此, Ramalho 等对 *Gonyaulax* 的分析认为,硝酸还原酶由 6 个分子质量为 52 ku 的亚基组成。

海洋硅藻中的硝酸还原酶在分子质量上与高等植物相近,大约为 95~120 ku。但是甲藻中硝酸还原酶的组成基团的分子质量远小于该值,只有 52 ku。但研究表明,从海洋硅藻的硝酸还原酶中制备的抗体与高等植物的反应非常弱,仅在亲缘关系较近的种群间存在交叉反应。Gao 等^[23] 研究指出,中肋骨条藻制备的硝酸还原酶的抗体与绿藻 *Dunaliella teriolecta*, 金藻 *Emiliania huxleyi*, *Isochrysis galbana* 和甲藻 *Amphidinium carterae* 间不存在交叉反应,而用威氏海链藻制备的抗体与同属中的其它种类,如 *T. pseudonana* 存在交叉反应,与骨条藻

等的交叉反应较弱,与其它硅藻间更弱或几乎不存在交叉反应,表明其具有较强的特异性。

5 存在问题及研究展望

1969 年 Eppley 首次将硝酸还原酶应用到海洋生态学研究,目前硝酸还原酶在海洋浮游植物中的研究已经取得了长足的进展。研究已经从简单的对硝酸还原酶活性的分析深入到对硝酸还原酶分子调控机制的研究,在研究方法和理论上都逐步趋向成熟和深入。但早期的工作过多地集中于现场样品的调查上,对不同样品硝酸还原酶的抽提方法和活性分析方法上的研究还远远不够。实验室的工作也更多集中在对现场的模拟上,而对分析方法的确定研究相对较少,这样的研究带来了很多的问题。许多研究者致力于确定硝酸还原酶的活性与海洋中浮游植物对硝酸盐的同化速率的关系。但因为该方法涉及到酶的活性的测定^[41],酶蛋白的量可以用免疫方法来测定^[42],但这需要在酶的量和酶的活性间进行转化。然而,直接的活性测定需要建立在酶的抽提过程不存在损失和底物等其它因素饱和的前提下。在一些研究中,硝酸还原酶已用于估算硝酸盐的吸收速率,但结果变化非常大而且很难同其它的现场测定数据相联系。在现场和实验室都发现,硝酸还原酶活性与浮游植物对硝酸盐的同化速率的关系不是很理想。通常情况下,直接测定活体的硝酸还原酶是不可能的,但可通过对硝酸还原酶活性的计算来支持观察到的进入细胞内部的氮通量^[5]。因此,实验室的工作至关重要,因引起足够的重视。

因此,今后这方面的工作必须以实验室研究为基础,在室内分析和测定方法足够成熟的情况下再将现场数据与实验室分析相结合,才能对现场情况进行更好的分析。在当前研究的基础上,今后的研究的重点主要应该放在以下几个方面:(1) 研究方法的建立和完善,由于硝酸还原酶存在种间差异,因而必须根据研究的浮游植物种类建立硝酸还原酶的测定方法;(2) 选择不同种群进行研究,比较研究它们对硝酸盐的同化速率以及硝酸还原酶的作用,定量它们之间的关系;(3) 硝酸还原酶的分子调控机制,从不同浮游植物中分离纯化硝酸还原酶,研究它们的理化特性、调控基因及调控因子;(4) 开展硝氮吸收蛋白和硝氮吸收过程中其它化合物的相互作用研究,重点研究不同形态氮对硝酸还原酶活性的影响及调控作用。

参考文献:

- [1] Joseph L, Villareal T A, Lipschultz F L. A high



- sensitivity nitrate reductase assay and its application to vertically migrating *Rhizosolenia mats* [J]. **Aquatic Microbial Ecology**, 1997, 12: 95-104.
- [2] Ferrario-Méy S, Murchie E, Hirel B, *et al.* Manipulation of the pathways of sucrose biosynthesis and nitrogen assimilation in transformed plants to improved photosynthesis and productivity [A]. Foyer C H, Quick W P. A Molecular Approach To Primary Metabolism in Higher Plants [C]. London: Taylor and Francis, 1997. 125-153.
- [3] Touchette B W, Burkholder J M. Review of nitrogen and phosphorus metabolism in seagrass[J]. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 2000, 250: 133-167.
- [4] Berges J A. Minireview: Algal nitrate reductases [J]. **European Journal of Phycology**, 1997, 32: 3-8.
- [5] Berges J A, Harrison P J. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton [J]. **Limnology and Oceanography**, 1995, 40: 82-93.
- [6] Blasco D, Macisaac J J, Packard T T, *et al.* Relationship between nitrate reductase and nitrate uptake in phytoplankton in the Peru upwelling region[J]. **Limnology and Oceanography**, 1984, 29: 275-286.
- [7] Bressler S L, Ahmed S I. Detection of glutamine synthetase activity in marine phytoplankton: optimization of the biosynthetic assay [J]. **Marine Ecology Progress Series**, 1984, 14: 207-217.
- [8] Ryther J H, Dunstan W M. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment [J]. **Science**, 1971, 171: 1 008-1 013.
- [9] McCarthy J J, Carpenter E J. Nitrogen cycling in near-surface waters of the open ocean [A]. Carpenter E J, Capone D G. Nitrogen in the Marine Environment [C]. New York: Academic Press, 1983. 487-512.
- [10] Schaefer D A, Dugdale R C, Wilkerson F P. The Conservation of Glutamine Synthetase and Implications for Nitrogen Uptake in Marine Phytoplankton [R]. San Antonio TX: ASLO/AGU Ocean Sciences, 2000.
- [11] Schaefer D A, Dugdale R C, Wilkerson F P. Development of molecular probes for functional genes of glutamine synthetase in marine phytoplankton [R]. Santa Fe: ASLO Ocean Sciences, 1999.
- [12] Dugdale R C, Wilkerson F P. The use of ^{15}N to measure nitrogen uptake in eutrophic oceans; experimental considerations [J]. **Limnology and Oceanography**, 1986, 31: 637-689.
- [13] Eppley R W. Nitrate reductase in marine phytoplankton [A]. Hellebust, Craigie J S. Handbook of Phycological Methods [C]. Cambridge: Cambridge University Press, 1978. 217-223.
- [14] Eppley R W, Coatsworth J L, Soloozano L. Studies of nitrate reductase in marine phytoplankton [J]. **Limnology and Oceanography**, 1969, 14: 194-205.
- [15] Packard T T, Blasco D, Macisaac J J, *et al.* Variations in nitrate reductase activity in marine phytoplankton [J]. **Investigaciones Pesqueras**, 1971, 35: 209-219.
- [16] Beevers L, Hageman R H. Nitrate reduction in higher plants [J]. **Annual Review of Plant Physiology**, 1969, 20: 495-522.
- [17] Joseph L, Villareal T A. Nitrate reductase activity as a measure of nitrogen incorporation in *Rhizosolenia formosa* (H. Peragallo): Internal nitrate and diel effects [J]. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 1998, 229: 159-176.
- [18] Dortch Q, Ahmed S I, Packard T T. Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities in *Skeletonema costatum* as measures of nitrogen assimilation rates [J]. **Journal of Plankton Research**, 1979, 1: 169-186.
- [19] Berges J A, Cochlan W P, Harrison P J. Laboratory and field responses of algal nitrate reductase to diel periodicity in irradiance, nitrate exhaustion, and the presence of ammonium [J]. **Marine Ecology Progress Series**, 1995, 124: 259-269.
- [20] Syrett P J. Nitrogen metabolism of microalgae [J]. **Canada Bulletin of Fish Aquatic Science**, 1981, 210: 182-210.
- [21] Hochman A. Studies of nitrate reductase in the fresh water dinoflagellate *Peridinium cinctum* [J]. **Archives of Microbiology**, 1982, 133: 62-65.
- [22] Serra J L, Llaa M J, Cadenas E. Characterization of the nitrate reductase enzyme activity in the diatom *Skeletonema costatum* [J]. **Plant Science Letter**, 1978, 13: 41-48.
- [23] Gao Y, Smith G, Alberte R. Nitrate reductase from the marine diatom *Skeletonema costatum* biochemical and immunological characterization [J]. **Plant Physiology**, 1993, 103: 1 437-1 445.
- [24] Guerreo M G, Vega J M, Losada M. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation [J]. **Annual Review of Plant Physiology**, 1981, 32: 169-204.
- [25] Wray J L, Fido R J. Nitrate reductase and nitrite re-



- ductase [A]. Lea P J. Enzymes of Primary Metabolism [C]. New York: Academic Press, 1990. 241-256.
- [26] Granbom M, Chow F. Characterisation of nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) [J]. **Aquatic Botany**, 2004, 78: 295-305.
- [27] Everest S A, Hipkin C R, Syrett P J. The effect of phosphate and flavin adenine dinucleotide on nitrate reductase activity of some unicellular marine algae [J]. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 1984, 76: 263-275.
- [28] Huber J L, Huber S C, Campbell W H, *et al.* Reversible light/ dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation [J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1992, 296: 58-65.
- [29] Harrison W G. Nitrate metabolism of the red tide dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* Stein [J]. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 1976, 21: 199-209.
- [30] Ahmed S I, Kenner R A, King F D. Preservation of enzyme activity in marine plankton by low - temperature freezing [J]. **Marine Chemistry**, 1976, 4: 133-149.
- [31] Clayton J R. Nitrogen metabolism as a function of its availability in the marine diatom *Skeletonema costatum* [D]. Washington: University of Washington, 1984, 244.
- [32] Amy N K, Garrett R H. Purification and characterization of the nitrate reductase from the diatom *Thalassiosira pseudonana* [J]. **Plant Physiology**, 1974, 54: 629-637.
- [33] Kessler E, Osterheld H. Nitrification and induction of nitrate reductase in nitrogen deficient algae [J]. **Nature**, 1970, 228: 287-288.
- [34] Collos Y. A linear model of external interactions during uptakes of different forms of inorganic nitrogen by microalgae [J]. **Journal of Plankton Research**, 1989, 11: 521-533.
- [35] Flynn K J. Algal carbon - nitrogen metabolism: a biochemical basis for modeling the interactions between nitrate and ammonium uptake [J]. **Journal of Plankton Research**, 1991, 13: 373-387.
- [36] Dortch Q. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton [J]. **Marine Ecology Progress Series**, 1990, 61: 183-201.
- [37] Fritz L, Stringer C G, Colepicolo P. Immunolocalization of nitrate reductase in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* (Pyrrophyt) [J]. **Journal of Physiology**, 1996, 32: 632-637.
- [38] Harris E. Nitrate reductase in *Gonyaulax polyedra* [D]. Cambridge, MA: Biology Department, Harvard University, 1975.
- [39] Ramalho C B, Hastings J W, Colepicolo P. Circadian oscillation of nitrate reductase activity in *Gonyaulax polyedra* is due to changes in cellular protein levels [J]. **Plant Physiology**, 1995, 107: 225-231.
- [40] Lopes P F, Cabral de Oliveira M, Colepicolo P. Characterization and daily variation of nitrate reductase in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2002, 295: 50-54.
- [41] Berges J A, Harrison P J. Relationship between nucleoside diphosphate kinase activity and light - limited growth rate in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) [J]. **Journal of Physiology**, 1993, 29: 45-53.
- [42] Smith G J, Zimmerman R C, Alberte R S. Molecular and physiological responses of diatoms to variable levels of irradiance and nitrogen availability: Growth of *Skeletonema costatum* in simulated upwelling conditions [J]. **Limnology and Oceanography**, 1992, 37: 989-1007.

(本文编辑:张培新)