

海洋蓝藻固氮基因

The nitrogen fixation gene in marine cyanobacteria

丁昌玲^{1,2}, 孙 军², 顾海峰³, 汪 岷¹, 韩笑天²

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院 海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 3. 国家海洋局 第三海洋研究所 海洋地质和环境开放实验室, 福建 厦门 361005)

中图分类号: Q948.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)07-0075-06

氮是海洋浮游植物必需的大量元素, 又是海洋浮游植物生长的主要限制因子之一, 研究氮元素的补充机制对了解海洋生态系统有重要意义。海区氮营养盐的补充主要通过新生氮实现, 其主要补充机制为径流输入、大气干湿沉降、水体混合、上升流及生物固氮作用。生物固氮是指固氮生物将大气中的氮气还原成氨的过程, 对地球上氮循环和氮平衡具有不可替代的作用。海洋生物固氮作用是维持海洋初级生产力和新生产力的一个重要生态反应。海洋中固氮生物种类较多, 主要包括固氮蓝藻、异养细菌和光合细菌。通常认为群体生活的束毛藻 (*Trichodesmium*) 是固氮量最大的一类海洋蓝藻^[1,2]。但大量研究表明, 在大洋生态系统中, 尤其是寡营养盐海域^[3], 单细胞固氮蓝藻也是主要固氮者^[4-7], 它们的丰度很大, 其固氮量占浮游植物固氮总量的 3%~70%^[8,9], 对初级生产力的影响是不可低估的^[10]。例如, 直径为 3~20 μm 的单细胞固氮蓝藻, 其丰度约为 10~50 个/mL, 发生水华时其密度可达到 1 000 个/mL, 单细胞固氮蓝藻的生物量会超过束毛藻的生物量, 总生物固氮量能达到甚至会超过束毛藻^[11]。有研究表明海洋生物固氮速率主要受直径小于 10 μm 的固氮蓝藻的影响^[12], 其中单细胞固氮蓝藻的贡献巨大^[11,13]。

以往对海洋生态环境中单细胞固氮蓝藻的固氮功能及其物种多样性不甚清楚, 但最近在大洋中甚至淡水环境发现一些具有固氮作用的单细胞蓝藻, 在实验室及现场实验过程中检测到这些蓝藻能进行固氮作用, 并用分子生物学技术得到固氮酶基因 (*nif H*)^[8,11,14]。随着对单细胞蓝藻固氮作用的深入研究, 发现单细胞固氮蓝藻物种在基因水平方面因生存环境不同而存在差异^[15,16]。

单细胞蓝藻个体微小, 所含的 *nif H* 拷贝数也很少, 尤其是直径在 0.2~10 μm 左右的细胞, 而且 *nif H* 易受环境影响, 用传统研究方法不易准确地测

定其固氮作用。传统的方法主要存在以下 3 个方面的不足: 第一, 主要依据环境样品中固氮生物的活动对固氮作用进行测定, 但不能深入研究生物体内的固氮活动, 第二, 不能准确地反映固氮作用的时空差异, 第三, 主要在培养条件中进行, 而只有约 1%~10% 的固氮藻类能够在培养条件下成活^[17-19]。为了克服以上缺陷, 目前多采用分子生物学技术研究固氮生物及其固氮作用。其中研究较多的是固氮酶 *nif H*, 通过研究和分析 *nif H* 的特性, 从基因水平上来检测单细胞固氮蓝藻的固氮作用。本文对固氮酶基因及分子生物学方法检测单细胞固氮蓝藻作一简单介绍, 以期今后深入研究海洋固氮蓝藻的固氮过程和机理提供参考。

1 固氮酶及固氮系统

1.1 固氮酶的结构

生物固氮作用是通过体内固氮系统实现的, 其中, 固氮酶是最主要功能蛋白。20 世纪初, 就开始了大量固氮酶结构、功能及其性质的研究。Carnahan 等^[20]得到了游离的固氮酶, 并利用特定的化学试剂, 成功地完成了体外用固氮酶合成氨的实验。后来相继分离得到了固氮酶蛋白。

生物体内的固氮系统实际上是多种蛋白的复合体, 其中固氮酶是作用中心。目前已经确定至少有 3 种固氮酶存在。一种是含钼离子的固氮酶, 在固氮生物中普遍存在, 其固氮能力较强, 是研究得比较详细的一种^[21,22]。另一种是含钒离子的固氮酶, 也是一种比较重要的固氮酶, 通常在存在钒离子并且缺乏

收稿日期: 2007-03-17; 修回日期: 2007-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40676089)

作者简介: 丁昌玲 (1983-), 女, 山东日照人, 硕士, 主要从事海洋生态学研究; 孙军, 通讯作者, 电话: 0532-82898647, E-mail: phytoplankton@163.com

钼离子的情况下表达^[23,24]。第三种是含铁离子的固氮酶,这种固氮酶存在于少数生物中,只有在缺乏钼离子和钒离子的条件下才会被表达^[25]。

1.1.1 含钼固氮酶

含钼固氮酶是由钼铁蛋白和铁蛋白组成的^[26]。钼铁蛋白是高度保守蛋白,大小约为 240 ku,是固氮酶的活性中心,钼铁蛋白组成形式为 $\alpha_2\beta_2$,结构和 β 结构分别由 *nif D* 和 *nif K* 编码,铁蛋白在固氮过程中起到重要作用,是一个 α_2 二聚体,大小约为 60 ku,由 *nif H* 编码^[27]。固氮酶的功能和机制主要取决于其结构^[22,28]。

1.1.2 含钒固氮酶

含钒固氮酶由钒铁蛋白和铁蛋白组成。铁蛋白大小为 64 ku,由 *vnf H* 编码,其结构和功能机制与含钼固氮酶中铁蛋白的相似^[29];在有些鱼腥藻中,钒铁蛋白包含 α 、 β 和 γ 三种结构,其中 32% 为 α 结构,35% 为 β 结构, α 结构和 β 结构由 *vnf D K* 编码, γ 结构由 *vnf G* 编码,它对固氮酶的作用活性有重要作用,在含钼固氮酶中未发现 γ 结构^[30]。

1.1.3 含铁固氮酶

含铁固氮酶由铁蛋白和铁铁蛋白组成。其中,铁铁蛋白存在 2 种组成形式,为 $\alpha_2\beta_2$ 或 $\alpha_1\beta_2$,结构大小为 58 ku,由 *anf D* 编码, β 结构大小为 50 ku,由 *anf K* 编码,铁蛋白由两个 32.5 ku 大小的结构组成,由 *anf H* 编码^[31]。

1.2 固氮酶 *nif H*

编码固氮酶中铁蛋白的 *nif H* 为高度保守序列,其表达随时间、空间、光照和营养盐的变化而变化^[13,32-34],而且 *nif H* 序列的功能信息比 *nif D K* 的更丰富^[35],因此 *nif H* 序列是鉴定固氮生物物种及分析固氮生物多样性的重要依据。研究 *nif H* 时存在的主要问题是如何在含有多种不同生物的样品中得到特异的 *nif H* 序列,尤其是在物种丰度较低的样品中。聚合酶链式反应能够快速高效地扩增基因序列,因此目前多采用此种分子生物学技术来研究和分析固氮酶 *nif H*,从基因水平上评估固氮蓝藻的固氮作用。蓝藻中 *nif H* 是多拷贝的,第一个被测定的 *nif H* 序列是海洋中固氮蓝藻——铁氏束毛藻 (*Trichodesmium thiebautii*) *nif H* 中的 359 bp 的片段序列^[36]。通过捕获 PCR 技术 (capture PCR, CPCR) 对 *nif H* 的研究表明,在大多数物种的固氮酶基因中,如鱼腥藻 *Anabaena* PCC7120, *nif H* 的前面有一个启动子,与由 *nif H*、*nif D* 和 *nif K* 组成的结构基因共同构成一个转录单位,当结构基因形成转录单位时,启动子首先激活 *nif H*,通过激活 *nif H*

来启动结构基因^[37,38]。在铁氏束毛藻中,*nif D* 上游存在一个类 *nif H* 启动子,其序列与 *nif H* 启动子序列相似^[21],但其功能还不清楚。不同属种的 *nif H* 存在差异,其差异性反映了固氮酶的结构多态性和物种多样性。

2 检测固氮酶 *nif H* 的分子生物学方法

根据固氮酶基因的特性,目前多采用分子生物学技术,对海洋中固氮单细胞蓝藻的 *nif H* 进行定性和定量分析,来研究固氮单细胞蓝藻的固氮作用及其对生态系统的影响。常用的分子生物学技术多以 PCR 和分子杂交为基础。PCR 技术常用逆转录 PCR、定量 PCR 等。扩增单细胞蓝藻 *nif H* 时,通常用 Zehr & Mc Reynolds 法来设计引物^[36]。分子杂交基于分子变性和复性的性质,使作为探针的寡核苷酸序列与 DNA 杂交,杂交反应后得到指纹图谱,通过分析指纹图谱得到目的基因信息。DNA 低密度阵列法和 DNA 微阵列法属于分子杂交技术。

2.1 PCR 技术

PCR 是一种快速、高效、简易的实验方法,PCR 的应用使海洋单细胞蓝藻 *nif H* 研究得到迅速发展。通过 PCR 得到不同 *nif H* 序列,对比各 *nif H* 间的碱基差异,用邻近归并 (neighbor-joining) 法建立相关的基因系统树,基因系统树能够直观地显示基因之间的差异^[9,14],由此可以了解单细胞蓝藻的物种和分布^[14]。以往 PCR 扩增固氮酶 *nif H* 和 16S rRNA 基因时发现,16S rRNA 基因文库有多种分化枝,而 *nif H* 文库只有 3 种主要的分化枝,基因大量扩增时使用的试剂如 DNA 聚合酶等可能会对 *nif H* 序列产生一定的影响^[39]。

海洋环境生存着许许多多不同种类的生物,固氮生物又常常是低丰度的,在 *nif H* 水平上探测和鉴定固氮生物,要解决的主要问题是能够快速有效地从环境中得到 *nif H* 序列。PCR 可以快速、高效地扩增目的 DNA,为 *nif H* 研究提供了一种有效可行的方法。Zehr 等用 Zehr & Mc Reynolds 法设计了一种引物,特别适用于 PCR 法研究海洋环境生存的固氮蓝藻 *nif H* 多样性。固氮生物基因组中存在一种编码叶绿素酯还原酶的 *frxC*,它与 *nif H* 之间是同源关系,Zehr & Mc Reynolds 引物不会使 *frxC* 发生扩增,避免了同源基因的干扰。研究发现有些生物 *nif H* 是多拷贝的,不是所有的 *nif H* 序列都是功能基因^[36],如果这些不能表达的非功能基因也被检测出来,将会对固氮生物的多样性检测造成干扰,所以要充分考虑到两点:第一,*nif H* 是否是多

拷贝的;第二,*nif H*中是否含有功能片段。

2.2 逆转录 PCR 技术 (RT-PCR)

有关研究表明,RT-PCR 技术灵敏度尤其适合于分析单细胞蓝藻固氮作用^[39~41]。从单细胞蓝藻样品中提取 RNA,以固氮酶的 mRNA 为模板逆转录得到 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,对获得的目的基因进行分析。蓝藻固氮酶 mRNA 的丰度变化是单细胞蓝藻固氮作用的特征指数之一。

目前对大西洋和太平洋海域的单细胞蓝藻研究较多,对印度洋海域的研究较少。在北太平洋和大西洋热带海域,单细胞固氮蓝藻普遍存在。对 0、25、50、100、150 m 各水层样品进行 24 h 连续实验,用 RT-PCR 方法建立 *nif H* 文库,分析发现 *nif H* 表达具有一定的规律。无论在白天还是夜间,其他固氮生物 *nif H* 都会进行表达,而单细胞蓝藻的 *nif H* 表达只在夜间发生。单细胞蓝藻 *nif H* 序列分析结果表明,大西洋和太平洋中单细胞蓝藻物种系统关系彼此分离,固氮系统因物种不同而不同。大西洋和太平洋中单细胞蓝藻,无论固氮种类还是非固氮种类,其丰度都是从表层到 25 m 急剧增加,并且与太平洋相比,大西洋中单细胞蓝藻丰度和细胞直径更大,太平洋中细胞直径约为 2.5 μm ,在大西洋中细胞直径则为 3~7 μm ^[9,12]。*nif H* 研究的数据累积表明,春夏季节北大西洋热带海域的单细胞固氮蓝藻物种组成相对比较稳定^[9,12,15,42]。在北太平洋亚热带海域,用 RT-PCR 方法分析一个昼夜周期中单细胞蓝藻的 *nif H*,发现同一水层的单细胞蓝藻 *nif H* 在不同时间其丰度值不同。在 25 m 水层中,21:00 和 0:00 时出现丰度最大值,15:00 和 18:00 时出现最小值。不同水层丰度值也不同,而且丰度最大值出现的时间不同,在 50 m 和 100 m 水层中,12:00 时的丰度值比 00:00 时的丰度值更大一些,说明在同一水层 *nif H* 丰度随时间变化而变化,在同一时间 *nif H* 随水深变化而变化。而 150 m 水层中几乎检测不到 *nif H*^[11],即在深水层几乎没有单细胞固氮蓝藻存在。

2.3 实时定量 PCR 技术 (Real-time quantitative PCR)

实时荧光定量 PCR 技术利用每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数 (C_t 值)与起始模板拷贝数之间的线性关系做标准曲线,根据 C_t 值标准曲线对 *nif H* 进行定量分析。 C_t 值越小,基因拷贝数越大。 C_t 值标准曲线直观地显示不同 *nif H* 的特征。此方法可精确有效地分析单细胞固氮蓝藻 *nif H*。

Church 运用实时定量 PCR 方法研究太平洋海域 *nif H* 表达时发现,单细胞固氮蓝藻 *nif H* 表达有特定的时间规律,并因物种不同而不同,真光层水域的单细胞固氮蓝藻随昼夜光照变化而变化^[41,43]。Short 等应用此技术发现,在切萨皮克湾及其附近水域 907h22 *nif H* 拷贝最大值约为 140 / mL,912h4 *nif H* 拷贝数最大值约为 340 / mL,912h4 序列的丰度在切萨皮克湾口附近较大,其丰度值随盐度的增加而增加,并且在 4 月份正午时出现最大值^[27]。具体研究过程中根据实验目的可选用适合的方法或者两种方法结合使用。Zehr 等研究夏威夷附近海域的单细胞蓝藻 *nif H* 时,用 RT-PCR 与 QPCR 得到不同物种的 *nif H*,发现在一个昼夜周期中,实验培养条件下的单细胞蓝藻 *nif H* 表达水平与现场环境中的 *nif H* 表达水平基本保持一致,36 h 持续实验中,发现营养盐磷对 *nif H* 的表达和固氮作用的影响不明显。其他条件可能会影响 *nif H* 的表达和细胞的固氮作用^[13]。QRT-PCR 等结果发现,某些单细胞蓝藻的固氮作用和光合作用在细胞水平上并不是空间隔离的^[13,43]。此现象的具体机制还未被证实,可以推测这些细胞之间可能存在生理状态上的差异。

2.4 DNA 低密度阵列法 (DNA macroarray)

DNA 低密度阵列法是一种杂交技术。DNA 低密度阵列法首先要建立一个 *nif H* 文库,从中扩增不同种类的基因片段,固定在载体膜上构成 DNA 阵列,它可以包括几百到几万的 DNA 片段;然后提取自然环境中不同物种的 *nif H* 片段作为探针与 DNA 阵列杂交,通过荧光标记检测分析。DNA 低密度阵列法的实验程序具有重复利用性。

DNA 低密度阵列法可以区分 78%~88% 的序列信息,对于丰度和序列组成相似程度高的 *nif H* 不够精确。Steward 等^[40]改进和发展了 DNA 低密度阵列法,并通过研究表明 DNA 低密度阵列法可以半定量地分析 *nif H* 多样性。Jenkins 等^[44]研究切萨皮克湾微型固氮浮游植物 *nif H*,不同站位、不同深度的样品通过 DNA 宏阵列分析后呈现截然不同的指纹图谱,杂交图谱与环境中国氮生物 *nif H* 的分布与物种特征是相对应的,用聚类分析法作 *nif H* 系统图,便可直观地反映 *nif H* 的分布状态和多样性。多项研究工作证实 DNA 低密度阵列法在分析固氮生物功能基因的时空分布差异和物种多样性方面是一种有效可行的方法^[45]。

2.5 DNA 微阵列法 (DNA microarray)

过去由于缺少合适的研究方法,从功能基因差

异性和基因表达水平上研究环境变化与群落特征的关系受到限制。DNA 微阵列法解除了这种限制。DNA 微阵列法一般采用微矩阵方法将寡核苷酸探针排列在载体上,使之与标记的靶基因进行杂交,杂交信号强度与分子间杂交程度呈正相关,杂交反应的信号反映出不同细胞中功能基因的差异。探针能特异性鉴别 70%~100%的靶基因。同 DNA 宏阵列法一样,DNA 微阵列法近来常被应用于微型浮游植物生态研究学及生态系统研究^[41,46~48]。

Moisander 等^[42]首次应用此方法从 *nif H* 水平来分析海洋中微型植物群中固氮生物群落组成和功能。溶解无机氮、盐度、溶解有机磷、溶解有机碳等营养条件对固氮生物群落具有非常重要的影响。Moisander 等用自然环境样品 *nif H* 作为靶基因,培养样品的 *nif H* 作为探针,杂交后发现,氮元素充足时蓝藻不会发生固氮作用,但是能够检测到 *nif H*,

表 1 几种常用研究方法的特点比较

研究方法	优点	缺点
PCR 技术	技术成熟,操作简便快捷	不能定量,易交叉污染
DNA 低密度阵列法	1. 可重复利用,耗费低;2. 可半定量分析基因	不能准确区分拷贝数小的基因
DNA 微阵列法	1. 可同时检测大量基因;2. 高分辨率;3. 操作时间短	1. 只能定性,无法定量;2. 应用的技术繁多
逆转录 PCR 技术	1. 既能定性研究,也可以定量分析;2. 实验产物稳定,灵敏度高	1. RNA 的制备和分析难度较大;2. 检测费用昂贵
实时定量 PCR 技术	1. 可评估基因拷贝数,进行定量分析;2. 特异性高,精确度高	工作量大,耗时久

3 展望

研究海洋生物固氮对海洋生物多样性、海洋生态环境保护、赤潮研究以及海洋生产力的持续发展都有极为重要的作用。其中蓝藻类浮游植物的贡献得到越来越广泛的重视,特别是单细胞固氮蓝藻类群已成为固氮生物与作用研究领域的新的热点。中国此方面的研究还处于起步阶段,关键的科学问题集中在下面几个方面:(1) 特征海域单细胞固氮蓝藻的个体多样性,优势类群;(2) 特征海域单细胞蓝藻丰度和固氮作用程度;(3) 影响单细胞固氮蓝藻分布和固氮作用的其他生物和环境因素;(4) 中国近海单细胞固氮蓝藻对海区新生氮和新生产力贡献评估。

参考文献:

[1] Falkowski P G. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean[J]. *Nature*, 1997, 387: 272-275.
 [2] Gruber N. Oceanography: A bigger nitrogen fix[J].

说明营养条件影响 *nif H* 的表达。有些群落物种很丰富,建立基因文库相当复杂,DNA 微阵列含有丰富的 *nif H* 序列信息,一次可以对大量样品进行检测分析,对研究结构复杂的群落尤其适用。DNA 微阵列法最大的优点是,可以重复使用已经建立的探针矩阵对群落中不同的样品进行平行研究。Moisander^[43]应用研究切萨皮克湾固氮蓝藻时空分布时采用 DNA 微阵列法,实验数据与 QPCR 法研究结果基本一致,并发现表层的群落比深层的群落可变性更大。

目前以上分子生物学方法在蓝藻固氮研究中被普遍采用,每种方法各有其优缺点(表 1),在实际操作中,可以根据具体要求选择合适的方法,以确保实验结果的准确性。随着分子生物学技术的发展和进步,对单细胞蓝藻的固氮酶 *nif H* 的认识和研究将会更加深入和全面。

Nature, 2005, 436: 786-787.

[3] Dugdale R C, Menzel D W, Ryther J H. Nitrogen fixation in the Sargasso Sea[J]. *Deep-Sea Res*, 1961, 7: 298-300.
 [4] Martinez L, Silver M W, King J M, et al. Nitrogen fixation by floating diatom mats: a source of new nitrogen to oligotrophic ocean waters[J]. *Science*, 1983, 221: 152-154.
 [5] Mitsui A, Kumazawa S, Takahashi A, et al. Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically[J]. *Nature*, 1986, 323: 720-722.
 [6] Waterbury, J B, Watson S W, Valois F W. Temporal separation of photosynthesis and dinitrogen fixation in the marine unicellular cyanobacterium *Erythrospira marina*[J]. *EOS Trans Am Geophys Union*, 1988, 69: 1 089.
 [7] Waterbury J B, Watson S W, Valois F W, et al. Biological and ecological characterization of the marine unicellular bacterium *Synechococcus* [J]. *Can Bull Fish Aquat Sci*, 1986, 214: 71-120.
 [8] Dore J E, Brum J E, Tupas L M, et al. Seasonal and

- interannual variability in sources of nitrogen supporting export in the oligotrophic subtropical North Pacific Ocean[J]. **Limnol Oceanogr**, 2002, 47: 1 595-1 607.
- [9] Falcn L I, Carpenter E J, Cipriano F, *et al.* N₂ Fixation by unicellular bacterioplankton from the Atlantic and Pacific Oceans: Phylogeny and in situ rates [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, 312: 765-770.
- [10] Guerinet M L, Colwell R R. Enumeration, isolation, and characterization of N₂ fixing bacteria from seawater[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1985, 50: 350-355.
- [11] Zehr J P, Waterbury J B, Turner P J, *et al.* Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean[J]. **Nature**, 2001, 412: 635-638.
- [12] Holl C M, Zehr J P, Hansen A, *et al.* High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific[J]. **Nature**, 2004, 430: 1 027-1 031.
- [13] Zehr J P, Montoya J P. Experiments linking nitrogenase gene expression to nitrogen fixation in the North Pacific subtropical gyre[J]. **Limnol Oceanogr**, 2007, 52(1): 169-183.
- [14] Guerinet M L, Colwell R R. Enumeration, isolation, and characterization of N₂ fixing bacteria from seawater[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1985, 50: 350-355.
- [15] Zehr J P, Mellon M T, Zani S. New nitrogen fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by the amplification of nitrogenase (*nif H*) genes[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1998, 64: 3 444-3 450.
- [16] Zehr J P, Carpenter E J, Villareal T A. New perspectives on nitrogen fixing microorganisms in tropical and subtropical oceans[J]. **Trends Microbiol**, 2000, 8: 68-73.
- [17] Brock T D. The study of microorganisms in situ progress and problems [J]. **Symp Soc Gen Microbiol**, 1987, 41: 1-17.
- [18] Ferguson R. L, Buckley E N, Palumbo A V. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1984, 47: 49-55.
- [19] Kirshtein J D, Paerl H W, Zehr J P. Amplification, cloning, and sequencing of a *nif H* segment from aquatic microorganisms and natural communities [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1991, 57: 2 645-2 650.
- [20] Carnahan J E, Mortenson L E, Mower H F. Nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*[J]. **Biochimica Biophysica Acta**, 1960, 44: 520-535.
- [21] Sroga G E, Landegren U, Bergman B, *et al.* Isolation of *nif H* and part of *nif D* by modified capture polymerase chain reaction from a natural population of the marine cyanobacterium *Trichodesmium* sp. [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1996, 136: 137-145.
- [22] Rees D C, Howard J B. Nitrogenase: Standing at the crossroads[J]. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2000, 4: 559-566.
- [23] Rehder D. Vanadium nitrogenase[J]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2000, 80:133-136.
- [24] Robson R L, Eady R R, Richardson T H, *et al.* The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme[J]. **Nature**, 1986, 322: 388-390.
- [25] Crans D C, Smee J J, Gaidamausas E, *et al.* The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds[J]. **Chemical Reviews**, 2004, 104: 849-902.
- [26] Anderson O R. A model of biocomplexity and its application to the analysis of some terrestrial and marsh eukaryotic microbial communities with an emphasis on amoeboid protists[J]. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 2003, 50: 86-91.
- [27] Short S M, Jenkins B D, Zehr J P. Spatial and temporal distribution of two diazotrophic bacteria in the Chesapeake Bay [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, 70: 2 186-2 192.
- [28] Bulen W A, LeComte J R. The nitrogenase system from *Azotobacter*: two-enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution, and ATP hydrolysis[J]. **Proc Natl Acad Sci**, 1966, 56: 979-986.
- [29] Robson R L, Woodley P R, Pau R N. Structural genes for the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum* [J]. **EMBO Journal**, 1989, 8: 1 217-1 224.
- [30] Eady R R. Current status of structure function relationships of vanadium nitrogenase [J]. **Coordination Chemistry Reviews**, 2003, 237: 23-30.
- [31] Chisnell J R, Premakumar R, Bishop P E. Purification of a second alternative nitrogenase from a *nif HDK* deletion strain in *Azotobacter vinelandii*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1988, 170: 27-33.
- [32] Chen Y B, Dominic B, Mellon M T, *et al.* Circadian rhythm of nitrogenase gene expression in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain IMS101 [J]. **Bacteriol**, 1998, 180: 3 598-3 605.
- [33] Mitsui A, Kumazawa S, Takahashi A, *et al.* Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically [J]. **Nature**, 1986. 323: 720-722.
- [34] Ortega-Calvo J J, Stal L J. Diazotrophic growth of the unicellular cyanobacterium *Gloeotheca* sp. PCC6909 in continuous culture [J]. **Gen Microbiol**, 1991, 137: 1 789-1 797.
- [35] Zehr J P, Capone D G. Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment [J]. **Aquat Microb Ecol**, 1996,

- 32: 263-281.
- [36] Zehr J P, McReynolds L A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nif H* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1989, 55: 2 522-2 526.
- [37] Mevarech M, Rice D, Haselkorn R. Nucleotide sequence of a cyanobacterial *nif H* gene coding for nitrogenase reductase [J]. **Proc Natl Acad Sci**, 1980, 77: 6 476-6 480.
- [38] Rice D, Mazur B J, Haselkorn R. Isolation and physical mapping of nitrogen fixation genes from the Cyanobacterium *Anabaena 7120*[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1982, 257: 13 157-13 163.
- [39] Zehr J P, Crumbliss L L, Church M J, *et al.* Nitrogenase genes in PCR and RT-PCR reagents: implications for studies of diversity of functional genes [J]. **Bio-techniques**. 2003, 35(5): 996-1 002.
- [40] Zani S, Mellon M T, Collier J L, *et al.* Expression of *nif H* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected with reverse transcriptase PCR[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, 66: 3 119-3 124.
- [41] Church M J, Jenkins B D, Karl DM, *et al.* Vertical distributions of nitrogen-fixing phylotypes at Stn ALOHA in the oligotrophic North Pacific Ocean[J]. **Aquat Microb Ecol**, 2005, 38: 3-14.
- [42] Falco n L I, Cipriano F, Chistoserdov A Y, *et al.* Diversity of diazotrophic unicellular cyanobacteria in the tropical North Atlantic Ocean[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68: 5 760-5 764.
- [43] Church M J, Short C M, Jenkins B D, *et al.* Temporal patterns of nitrogenase gene (*nif H*) expression in the oligotrophic North Pacific Ocean[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2005, 71: 5 362-5 370.
- [44] Jenkins B D, Steward G F, Short S M, *et al.* Fingerprinting diazotroph communities in the Chesapeake Bay by using a DNA macroarray[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, 70: 1 767-1 776.
- [45] Steward G F, Jenkins B D, Ward B B, *et al.* Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase(*nif H*) gene diversity[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, 70: 1 455-1 465.
- [46] Moisander P H., Shiue L, Steward G F, *et al.* Application of a *nif H* oligonucleotide microarray for profiling diversity of N₂-fixing microorganisms in marine microbial mats [J]. **Environmental Microbiology**, 2006, 8(10): 1 721-1 735.
- [47] Moisander P H, Morrison A E, Ward B B, *et al.* Spatial-temporal variability in diazotroph assemblages in Chesapeake Bay using an oligonucleotide *nif H* microarray [J]. **Environmental Microbiology**, 2007, 9 (7): 1 823-1 835.
- [48] Bodrossy L, Stralis-Pavese N, Murrell J C, *et al.* Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs [J]. **Environ Microbiol**, 2003, 5: 566-582.

(本文编辑:张培新)