

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150239

强光下一氧化氮对三角褐指藻 EPA 产量的影响

许文宗, 闫 爽, 王黎颖, 徐仰仓

(天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457)

摘 要: 二十碳五烯酸(EPA)是一种长链多不饱和脂肪酸,具有重要的医药价值. 本文研究了光照强度和亚硝基铁氰化钠(SNP)分解产生的 NO 对三角褐指藻 EPA 产量的影响及机理. 采用氧电极法探究光照强度与三角褐指藻光合速率的关系,结果显示三角褐指藻的光饱和点为 $126.3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. 采用气相色谱法检测 EPA 的含量,结果显示外源 NO 可通过促进强光下三角褐指藻的快速生长来提高强光下三角褐指藻 EPA 的产量,而对单位生物量中 EPA 含量并没有影响;用血球计数板法检测三角褐指藻的生长速率,结果显示在光强 $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时三角褐指藻出现了光抑制,而 SNP 能解除这种抑制. 探究 NO 促进三角褐指藻快速生长的机理,结果显示 NO 提高了乙醇酸氧化酶(GO)的活性. 用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测外源 NO 对 GO 基因表达量的影响,结果显示 GO 的两个同工酶“GOX 和 GLY”的基因表达量均增强了. 采用 AMCA 开关法对纯化的 GO 进行 S-亚硝基化鉴定,结果显示 GOX 和 GLY 均发生了 S-亚硝基化修饰. 分别采用 ISNO-AAPair、GPS-SNO 和 ISNO-PseAAC 方法预测 S-亚硝基化位点,结果显示 GLY 的 238 位、GOX 的 237 位和 332 位很可能是 NO 的修饰位点. 因此,NO 提高 GO 活性的途径有两条:提高 GO 基因的表达量;对 GO 酶蛋白进行 S-亚硝基化修饰. 综上所述,NO 通过提高 GO 活性促进强光下三角褐指藻的快速生长从而提高三角褐指藻 EPA 的产量.

关键词: EPA; 光照强度; 三角褐指藻; S-亚硝基化; 一氧化氮; 乙醇酸氧化酶

中图分类号: Q93 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2017)01-0018-07

Effect of Nitric Oxide on EPA Yield in *Phaeodactylum tricornutum* under High Light Irradiance

XU Wenzong, YAN Shuang, WANG Liying, XU Yangcang

(Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Eicosapentaenoic acid(EPA, 5, 8, 11, 14, 17-cis-eicosapentaenoic acid) is an n-3 C_{20} -polyunsaturated fatty acid that has a variety of functions in the field of medicine. In this research, the effect of exogenous nitric oxide(NO) on EPA yield in *Phaeodactylum tricornutum* under high light irradiance was studied. The relationship between light intensity and photosynthetic rate of *Phaeodactylum tricornutum* was determined with oxygen electrode method, and the results indicate that the light saturation point of *Phaeodactylum tricornutum* is $126.3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. The *Phaeodactylum tricornutum* was cultivated in F/2 medium. 15 days later, the EPA content was determined by gas chromatography. It was found that EPA yield in *Phaeodactylum tricornutum* under high light irradiance was increased by exogenous NO, which depended on the effect of NO promoting *Phaeodactylum tricornutum* growth, but NO had no significant effect on EPA content per g dry algae powder. The growth rate of *Phaeodactylum tricornutum* was detected by cell count technique, and the results showed that there was a light inhibition in the growth of *Phaeodactylum tricornutum* under $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ light irradiance, and SNP could relieve the inhibition. Glycolic acid oxidase(GO) inhibitor oxalic acid decreased *Phaeodactylum tricornutum* growth rate which was promoted by exogenous NO which increased GO activity. It indicated that exogenous NO accelerated *Phaeo-*

收稿日期: 2015-12-10; 修回日期: 2016-03-15

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目; 天津市科技兴海资助项目(KJXH2012-14)

作者简介: 许文宗(1989—), 男, 广西合浦人, 硕士研究生; 通信作者: 徐仰仓, 教授, xuyuc@tust.edu.cn

dactylum tricornutum growth rate by increasing GO activity. After purification, the GO was identified with AMCA switch method, and it was found that both GOX and GLY (two isozyme of GO) were S-nitrosylated by NO. The SNO site positions in GLY and GOX were analyzed by the software of iSNO-AAPair, GPS-SNO and iSNO-PseAAC. The 238th cysteine in GLY, the 237th cysteine and the 332th cysteine in GOX were probably S-nitrosylated by NO. In addition, GOX and GLY gene expression levels detected by Real-Time PCR were increased by exogenous NO. The data demonstrate that NO can increase GO activity both by stimulating gene expression and by post-transcriptional S-nitrosylation. In summary, NO, by enhancing GO activity, can quicken the growth of *Phaeodactylum tricornutum* under high light condition and then improve the overall EPA yield.

Key words: EPA; light irradiance; *Phaeodactylum tricornutum*; S-nitrosylation; NO; glycolic acid oxidase

二十碳五烯酸(EPA)是一种长链多不饱和脂肪酸,在营养强化、防治心血管疾病、减轻炎症、降低血压等方面有着十分重要的作用^[1],已成为保健品、药品的重要原料.三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是一种单细胞海洋硅藻,富含 EPA,其含量占总脂肪酸含量的 30% 以上^[2],是工业化生产 EPA 的潜在生物^[3-5]. EPA 的产量由单产(EPA 含量/生物量)和总生物量两个因素决定.研究发现较低的光照强度有利于三角褐指藻生物量的累积^[6],但光照强度与三角褐指藻 EPA 单产之间的关系还不清楚.

一氧化氮(NO)是生物体内重要的活性分子,在生物的生长、发育、成熟、衰老、抗逆等生理过程中发挥着重要的作用^[7]. NO 调节生命活动的途径很多,如调节基因的表达^[8],对蛋白进行转录后修饰^[9],参与细胞信号传导^[10]等. NO 能提高植物对干旱、低温和盐等胁迫的抗性. NO 参与三角褐指藻适应光强的过程尚未见研究报道.因此,本文研究了强光下外源 NO 对三角褐指藻的生长及 EPA 产量的影响及其作用机理.

1 材料与方法

1.1 三角褐指藻的培养

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)由本研究室保存,藻种接入 F/2 培养基(pH 8.0),22℃、光/暗周期 14 h/10 h 的条件下,125 r/min 摇床培养.

1.2 光合速率测定

采用氧电极法^[11]测定光合速率.离心收集培养 4 d 的三角褐指藻,换新鲜培养液,调整 A_{665} 至 0.350 左右,光下适应 1 h,取样品 2 mL 放入 DW2/2 型氧电极(Hansatech 公司)的小室,适应 2 min 后检测.光照强度梯度分别设置为 0、10、20、50、100、150、200、250、300、350、400 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,每个梯度保持 3 min.结束后按照式(1)计算得出藻液的光合

速率.

$$P = VKt/\rho \quad (1)$$

式中: P 为光合速率, $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$; V 为小室内氧气浓度变化速率, h^{-1} ; K 为 30℃ 水中的溶氧量 235 $\mu\text{mol}/\text{L}$; t 为时间, h; ρ 为叶绿素质量浓度, mg/L .

根据光合速率和光照强度的数值,利用 Matlab 软件拟合光照强度-光合速率的响应曲线,拟合式(2)^[12-13].

$$P = P_{\max} \cdot \tan(\alpha I / P_{\max}) + R_d \quad (2)$$

式中: $P_{\max}$ 为三角褐指藻理论最大净光合速率; R_d 为光照强度为 0 时的呼吸速率, $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$; α 为初始斜率; I 为光照强度, $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$.

1.3 EPA 含量的测定

采用气相色谱法^[14].称取 80 mg 三角褐指藻干粉,加入 2 mol/L KOH-CH₃OH 2 mL,75℃水浴皂化 30 min,冷却后加入 3 mol/L HCl-CH₃OH 2 mL,75℃水浴甲酯化 15 min,冷却后加入 1 mL 正己烷和少量的蒸馏水萃取脂肪酸.用岛津 GC-7890 II 型气相色谱仪测定 EPA 的含量.色谱条件:色谱柱为强极性柱(0.2 mm × 50 m),柱温 200℃,检测器温度 280℃,检测器为氢火焰离子化检测器(FID),载气为氮气,流量为 1 mL/min,分流比为 50:1.以标准脂肪酸甲酯为对照,确定脂肪酸种类.用面积归一法计算 EPA 的含量.

1.4 三角褐指藻生长速率的测定

三角褐指藻生长速率的实验设计如下:将三角褐指藻分别在 5 种条件下培养:A 为光强 80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,B 为光强 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、C 为光强 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s}) + 0.5 \text{ mmol}/\text{L}$ 亚硝基铁氰化钠(SNP)、D 为光强 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s}) + 0.5 \text{ mmol}/\text{L}$ SNP + 0.1 mmol/L cPTIO(一氧化氮专一清除剂),E 为光强 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s}) + 20 \text{ mmol}/\text{L}$ 草酸(OA).15 d 后采用血球计数板法和细胞干质量法检测培养液中的细

胞密度和干质量. 三角褐指藻的生长速率根据取样点时的细胞密度或干质量减去接种时的细胞密度或干质量获得.

1.5 乙醇酸氧化酶提纯及酶活性测定

参照杨净等^[15]的方法提纯乙醇酸氧化酶, 略加改动. 4℃、4 000 r/min 离心收集三角褐指藻, 得到藻泥后加预冷的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲溶液 (pH 8.0), 冰浴研磨, 4℃、4 000 r/min 离心 5 min, 上清液用 10% HAc 调节 pH 至 5.3, 4℃、4 000 r/min 离心 5 min, 上清液经 15% ~ 35% 的 (NH₄)₂SO₄ 分步沉淀, 沉淀用 5 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3) 溶解, 并以 5 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.3) 为洗脱液, 过 Sephadex G-25 柱 (2.5 cm × 40 cm), 收集具有乙醇酸氧化酶活性的洗脱液, 收集液加入 4 mmol/L FMN, 4℃下放置 30 min, 再以 5 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3) 为洗脱液, 过 DEAE-Cellulose 柱 (2.5 cm × 20 cm), 收集具有乙醇酸氧化酶活性的洗脱液.

采用氧电极法测定乙醇酸氧化酶活性^[16]. 三角褐指藻的培养条件分别为: A 为光强 200 μmol/(m²·s)、B 为光强 200 μmol/(m²·s) + 0.5 mmol/L SNP 和 C 为光强 200 μmol/(m²·s) + 0.5 mmol/L SNP + 0.1 mmol/L cPTIO. 4 d 后检测体内的 GO 活性. 以光强 80 μmol/(m²·s) 培养的三角褐指藻为原料, 分离纯化 GO, 分别测定离体 GO 活性 (D) 和离体 GO 反应体系中加入 50 nmol/L SNP 后 GO 活性 (E). 酶反应系统包括 pH 7.8 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液、0.5 mmol/L KCN、0.05 mmol/L NH₃·H₂O、0.36 mmol/L 黄素单核苷酸钠 (FMN-Na)、6 mmol/L 乙醇酸钠、1 mL 酶提取液, 反应总体积 4.3 mL, 反应温度 30℃, 用 DW2/2 型氧电极测耗氧速率, 酶活性单位为 μmol/(mg·min).

1.6 乙醇酸氧化酶的亚硝基化鉴定及位点预测

采用 AMCA switch method^[10]方法进行乙醇酸氧化酶的亚硝基化鉴定. 将纯化后的 1 mg/mL 乙醇酸氧化酶 2 mL 加入 5 mL HENS 缓冲液, 缓冲液配方: 25 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (Hepes) (pH 7.7), 1 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA), 0.01 mmol/L 新亚铜试剂 (eocuproine), 2.5% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 20 mmol/L 甲基硫代甲砷 (MMTS). 50℃水浴 30 min. 过量的 MMTS 通过丙酮沉淀法除去, 沉淀用 5 mmol/L 抗坏血酸钠还原, 室温下与标记物 100 mmol/L AMCA-HPDP 反应 90 min, 之后进行 SDS-PAGE 电泳. 凝胶经水冲洗后, 置于紫外透射平台 (波长为 345 nm), 荧光条带用 Canon MVX430 相

机照相.

采用计算机软件 ISNO-AAPair^[17]、GPS-SNO^[18]和 ISNO-PseAAC^[19]对乙醇酸氧化酶中 S-亚硝基化位点 (SNO site) 进行预测.

1.7 乙醇酸氧化酶基因表达量的检测

培养 7 d 的三角褐指藻经 4 000 r/min 离心 10 min 得到藻泥 (约 200 mg), 加入 2 mL Tri-zol (Invitrogen 公司), 冷冻研磨, 置于离心管中, 25℃孵育 5 min, 加入 200 μL 氯仿, 剧烈摇晃, 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 400 μL, 加入 400 μL 异丙醇, 充分混匀, 30℃孵育 30 min 后, 14 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 1 mL 75% 冰乙醇洗涤沉淀, 12 000 r/min 离心 5 min. 室温空气干燥 10 min, 加焦碳酸二乙酯 (DEPC) 溶解 RNA. 取 12 μL RNA (2 μg), 按照反转录试剂盒 (Bio-Serve Cat NO: BS-PCR005) 的操作说明合成 cDNA. 内参基因采用 RPS (ribosomal protein small subunit 30 S, Gene ID: 4524662), 使用软件 Primer 5.0 设计引物为: RPS P5: TTAAAATTCAAGTCTCTGGTCGTT, RPS P3: GATTGTATTGGCTTCTTGTGTTG. 乙醇酸氧化酶的两个同工酶 Gene ID: 7194878 和 Gene ID: 7198075 使用软件 Primer 5.0 设计引物分别为: GOX P5: CGAAGAAACCGCCCAAGTCAAATC; GOX P3: CTCGGCCCAGCAAGAAAGAAATG; GLY P5: CGCTTTGGCCCTCACCGTAGATTT; GLY P3: GCTGAACCTCGGGCGACAACCTGACT. PCR 的扩增在 SLAN-96 P Real-time PCR system 上进行, 按试剂盒 (Bio-Serve Cat NO: BS-PCR002) 的说明操作, 其反应体系为: PCR Mixture 2 × Mix 15 μL, 上游引物 0.5 μL (10 μmol/L), 下游引物 0.5 μL (10 μmol/L), 模板 5 μL, 用水补足至 30 μL. 反应条件: 95℃预变性 3 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环. 反应结束后, 用 SLAN 8.2 软件对获得的信号数据进行处理, 分析熔解曲线和相对表达量.

2 结果与分析

2.1 光照强度与三角褐指藻光合速率的关系

光照强度与三角褐指藻光合速率的关系如图 1 所示. 光照强度为 0 时, 三角褐指藻的净光合速率为负值, 随着光照强度的增加, 三角褐指藻的净光合速率也增大, 100 μmol/(m²·s) 后, 氧的释放速率减缓. 根据 BEN-ZION 的方法^[20]计算出光饱和点为 126.3 μmol/(m²·s), 说明光强大于 126.3 μmol/(m²·s)

时将会出现光抑制甚至损伤三角褐指藻细胞的细胞结构。

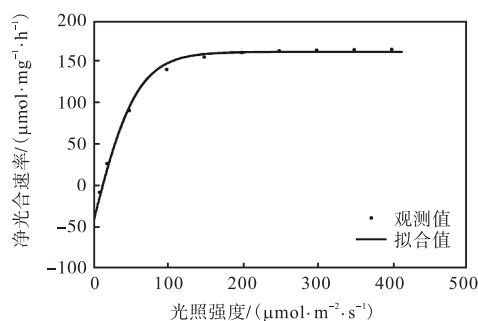


图 1 三角褐指藻净光合速率曲线

Fig. 1 Net photosynthesis rate curve of *Phaeodactylum tricornutum*

2.2 光照强度和亚硝基铁氰化钠对三角褐指藻 EPA 产量的影响

将三角褐指藻分别培养在光饱和点之下 ($80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 和之上 ($200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 的光照环境中, 15 d 后检测 EPA 含量. 结果发现, 两种光强下, 三角褐指藻的 EPA 总产量(不同培养条件下所有藻细胞所含 EPA)没有显著的差别, 然而, 高光强 ($200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 下 EPA 的单产量(每克干藻粉所含 EPA)是低光强 ($80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 下的 2.35 倍. 该培养条件下高光强抑制了三角褐指藻的生长, 促进了其 EPA 的合成. 若在培养液中加入 0.5 mmol/L 的 SNP, 再放入高光强下培养 15 d, 则 EPA 的总产量是未添加 SNP 的 2.06 倍, EPA 单产量比未添加 SNP 的高 6.3%, 但没有显著差异(图 2). 这说明 SNP 是通过促进三角褐指藻的生长而提高了高光强下 EPA 的总产量.

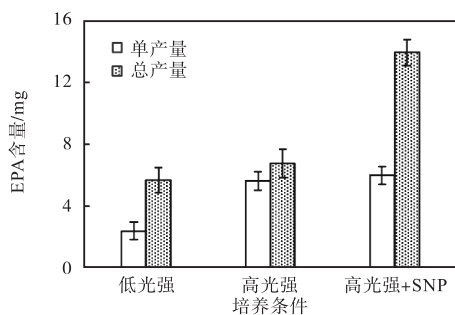


图 2 不同光照培养三角褐指藻 EPA 的含量

Fig. 2 EPA content in *Phaeodactylum tricornutum* under different irradiance and treatment

2.3 光照强度和 NO 对三角褐指藻生长速率的影响

前面的实验暗示光照强度和 NO 与三角褐指藻

的生长速率有关, 对此进行了实验验证, 结果如图 3 所示. 结果发现高光强 (B) 下的细胞含量是低光强 (A) 下的 48.2%, 在高光强 + 0.5 mmol/L SNP (C) 下的细胞含量与低光强下的没有统计意义的区别, 在高光强 + 0.5 mmol/L SNP + 0.1 mmol/L cPTIO (D) 下的细胞含量又降低为低光强下的 43.5%. 这说明在 $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的高光强下, 三角褐指藻出现了光抑制, SNP 能解除这种抑制. SNP 分解后的主要产物是 NO, 而 cPTIO 是 NO 的清除剂, cPTIO 解除了 SNP 的作用效果, 说明 NO 是 SNP 产生效果的化学物质. 若以细胞总干重作为评价三角褐指藻生长速率的指标, 重复上述实验, 得到了类似的结果.

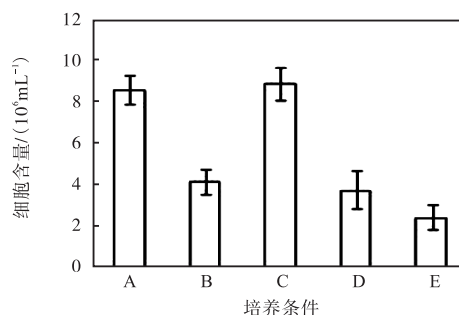


图 3 不同培养条件三角褐指藻的细胞含量

Fig. 3 Cell density of *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions

2.4 NO 对三角褐指藻乙醇酸氧化酶活性的影响

草酸 (OA) 是乙醇酸氧化酶的抑制剂^[21], 乙醇酸氧化酶 (GO) 是光呼吸的关键酶, 光呼吸是解除光抑制的重要方式^[22-24]. NO 对三角褐指藻 GO 活性的影响, 结果如图 4 所示. 对比“高光强 (A)”和“高光强 + 20 mmol/L OA (E)”环境中的生长状况, 发现草酸使三角褐指藻生长速率降低 41.5% (图 3). 说明高光强下乙醇酸氧化酶的活性在一定程度上决定着三角褐指藻的生长速率. 为了查明 NO 促进高光强下三角褐指藻快速生长的机理, 研究了 NO 对 GO 活性的影响. 结果发现培养“高光强 + 0.5 mmol/L SNP (B)”环境中的活性分别是“高光强 (A)”和“高光强 + 0.5 mmol/L SNP + 0.1 mmol/L cPTIO (C)”中的 2.2 倍和 2.0 倍. 以低光强 $80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 条件下培养的三角褐指藻为原料, 分离纯化 GO, 分别测定离体 GO 活性 (D) 和在离体 GO 反应体系中加入 50 nmol/L SNP 后 GO 活性 (E), 结果显示 GO 的活性提高了 53% (图 4). 以上结果说明 NO 提高了三角褐指藻 GO 的活性.

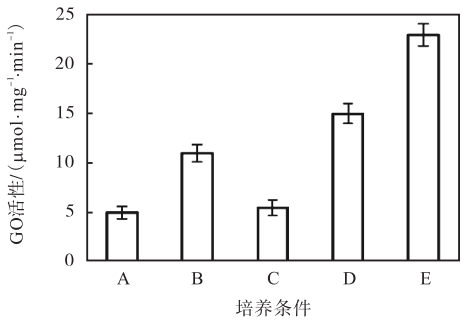


图 4 NO 对三角褐指藻 GO 活性的影响

Fig. 4 Effect of NO on GO activity in *Phaeodactylum tricornutum*

2.5 NO 对三角褐指藻乙醇酸氧化酶的亚硝基化修饰

AMCA switch method^[10]是结合荧光标记和电泳技术鉴定蛋白质 S-亚硝基化的方法,利用该方法对纯化的乙醇酸氧化酶进行 S-亚硝基化鉴定. 结果发现 SDS-PAGE 电泳凝胶片上有两条荧光带(图 5). 乙醇酸氧化酶有两个同工酶,其中 GLY 和 GOX 的相对分子质量分别为 4.7×10^4 、 42×10^4 . 结果表明乙醇酸氧化酶的两个同工酶都发生了 S-亚硝基化. 另外,根据凝胶片上荧光的强弱和相对分子质量的大小,可以初步断定 GLY 的 S-亚硝基化数目少于 GOX 的 S-亚硝基化数目.

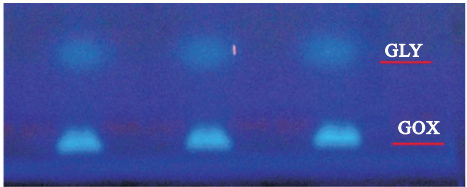


图 5 AMCA 开关法鉴定 S-亚硝基化乙醇酸氧化酶

Fig. 5 S-Nitrosylation glycolic acid oxidase identified by AMCA switch method

利用计算机软件对三角褐指藻乙醇酸氧化酶的 S-亚硝基化位点进行预测. ISNO-AAPair 预测 NO 与 GLY 蛋白的第 108 和第 238 位的半胱氨酸、与 GOX 的第 237、332 和 358 位的半胱氨酸发生了 S-亚硝基化反应. GPS-SNO 预测 GLY 有 3 个 S-亚硝基化位点,GOX 有 9 个 S-亚硝基化位点. ISNO-PseAAC 软件预测 GLY 有 1 个 S-亚硝基化位点,GOX 有 2 个 S-亚硝基化位点. 尽管 3 个软件预测 S-亚硝基化位点的数量各不相同,但 GLY 的第 238 位,GOX 的第 237 位和 332 位是 3 个软件同时预测到的 S-亚硝基化位点(表 1). 这说明 NO 通过上述 3 个位点修饰 GO 的可能性很大.

表 1 GLY 和 GOX 的 SNO 位点预测

Tab. 1 Prediction of SNO site position in GLY and GOX

软件	SNO 位点预测	
	GLY	GOX
iSNO-AAPair	108,238	237,332,358
GPS-SNO	108,238,344	82,91,97,103,237,277,332,356,358
iSNO-PseAAC	238	237,332

2.6 NO 对三角褐指藻乙醇酸氧化酶基因表达量的影响

以 RPS 为内参基因,用 Real-time PCR 检测外源 NO 对三角褐指藻乙醇酸氧化酶基因表达量的影响,结果发现,在高光强下,外源 NO 可使 GOX 的基因表达量提高 2.14 倍,可使 GLY 基因的表达量提高 1.77 倍(图 6). 说明高光强下外源 NO 增强三角褐指藻乙醇酸氧化酶基因的表达量是其提高酶活性的方式之一.

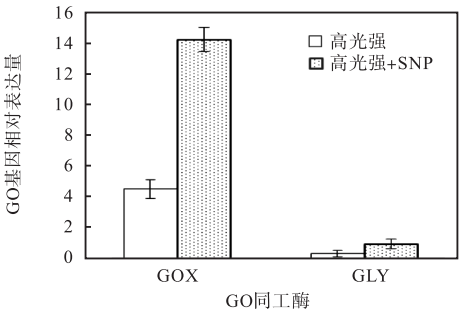


图 6 Real-time PCR 分析 NO 对三角褐指藻乙醇酸氧化酶基因表达的影响

Fig. 6 Real-time PCR analysis of the effect of NO on the expression of glycolic acid oxidase gene in *Phaeodactylum tricornutum*

3 讨论

EPA 是一种具有重要药用和保健功能的生理活性物质,提高 EPA 的产量已成为科学家关注的热点问题. 研究表明,三角褐指藻是生产 EPA 的潜在生物^[3-4,6]. 本研究发现:较低的光照强度有利于积累三角褐指藻的生物量,但降低了单位生物量中的 EPA 含量;较高的光照强度提高了单位生物量中的 EPA 含量,却抑制了三角褐指藻的快速生长(图 2、图 3). 这两种情况均不利于提高 EPA 的总产量. 为了解决上述矛盾,在培养液中添加了 NO 的释放剂 SNP,结果发现 NO 提高了强光下三角褐指藻 EPA 的总产量(图 2). 这说明 NO 促进了高光强下三角褐

指藻的生长(图 3). 光能是植物生长的能量源头, 光被叶绿素吸收后, 经过光反应, 光能转化成活跃的的化学能, 活跃的的化学能再经过暗反应转变为稳定的化学能贮藏于葡萄糖. 若光反应转化的光能较多, 暗反应来不及利用这些能量, 则光反应过程中的电子很容易发生泄露, 泄露的电子破坏了细胞的正常结构, 引起了光抑制^[22, 24-25]. 超过光饱和点($126.3 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)的光照强度($200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)使三角褐指藻的生长速率降低(图 3), 说明三角褐指藻吸收的光能已经盈余, 需及时将过剩的能量消耗, 否则植物体将会受到损害. 光呼吸是植物体内消耗过剩光能的重要方式, 而乙醇酸氧化酶是光呼吸途径的关键酶^[22-23]. 外源 NO 提高了三角褐指藻体内的乙醇酸氧化酶活性(图 4), 加速了光呼吸过程, 消耗了过剩的光能, 减轻了光合电子对细胞结构的损伤, 从而使三角褐指藻能在高光强下正常生长.

NO 是具有重要功能的信号分子, 对蛋白进行转录后修饰是 NO 的重要功能之一^[10, 26-27]. S-亚硝基化是 NO 修饰蛋白质的主要方式^[28], AMCA 开关法^[10]是鉴定蛋白质 S-亚硝基化的重要方法, 利用该方法, 对纯化的乙醇酸氧化酶进行了鉴定, 结果发现乙醇酸氧化酶的两个同工酶均能发射荧光, 且 GOX 发射的荧光强度大于 GLY 的(图 5), 表明 NO 对乙醇酸氧化酶的两个同工酶均进行了 S-亚硝基化修饰, 且对 GOX 的修饰程度大于 GLY. 说明外源 NO 提高三角褐指藻乙醇酸氧化酶活性的原因之一是对该蛋白进行了 S-亚硝基化修饰. S-亚硝基化修饰的分子基础是 NO 结合到蛋白质中的半胱氨酸巯基上, 而构成蛋白质的半胱氨酸很多, NO 与哪个位点的半胱氨酸结合? 根据蛋白质一级结构和空间结构的特点, 科学家开发了预测蛋白质 S-亚硝基化位点的软件, 其中 iSNO-AAPair^[17]、GPS-SNO^[18]和 iSNO-PseAAC^[19]是预测准确率较高的 3 个软件. 运用这些软件对三角褐指藻乙醇酸氧化酶的 S-亚硝基化位点进行了预测, 结果发现, GOX 的 S-亚硝基化位点比 GLY 的多(表 1), 这与 AMCAswitch method 鉴定的结果一致(图 5), 再一次证明了“NO 通过 S-亚硝基化修饰三角褐指藻乙醇酸氧化酶”的结论. 尽管 3 个软件预测乙醇酸氧化酶的 S-亚硝基化位点数量各不相同, 但 GLY 的第 238 位, GOX 的第 237 位和 332 位是 3 个软件同时预测到的位点, 说明 NO 极有可能对这 3 个位点的半胱氨酸进行 S-亚硝基化修饰.

NO 不但能对蛋白进行转录后修饰, 还能调节基

因的表达量^[9]. Real-time PCR 的检测结果表明, 外源 NO 可使 GOX 的基因表达量提高 2.14 倍, 使 GLY 的基因表达量提高 1.77 倍(图 6). 这表明 NO 刺激三角褐指藻乙醇酸氧化酶基因的表达量是其提高强光下该酶活性的另一个重要原因.

综上所述, 低光照能加速三角褐指藻的快速生长, 却抑制了单位生物量中的 EPA 含量, 高光照提高了单位生物量中的 EPA 含量, 却抑制了三角褐指藻的快速生长. 外源 NO 提高了高光强下三角褐指藻 EPA 的总产量, 其原因在于 NO 促进了高光强下三角褐指藻的生长. 外源 NO 促进高光强下三角褐指藻快速生长的机理之一是提高了乙醇酸氧化酶的活性, NO 一方面通过增强乙醇酸氧化酶的基因表达量提高其活性, 另一方面通过对酶蛋白进行 S-亚硝基化修饰提高其活性, GLY 的第 238 位、GOX 的第 237 位和 332 位很可能是 NO 的 S-亚硝基化位点.

参考文献:

- [1] Garg M L, Leitch J, Blake R J, et al. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid incorporation into human atrium following fish oil supplementation[J]. *Lipids*, 2006, 41(12): 1127-1132.
- [2] Chiu S Y, Kao C Y, Tsai M T, et al. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(2): 833-838.
- [3] Rezanka T, Petrankova M, Cepak V, et al. *Trachydiscus minutus*, a new biotechnological source of eicosapentaenoic acid[J]. *Folia Microbiologica*, 2010, 55(3): 265-269.
- [4] 吴伟伟, 高影影, 隆小华, 等. 营养盐对三角褐指藻生长及脂肪酸合成的影响[J]. *水产科学*, 2012, 31(9): 516-521.
- [5] Draaisma R B, Wijffels R H, Slegers P M, et al. Food commodities from microalgae[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(2): 169-177.
- [6] 周慧敏, 冯剑丰, 朱琳, 等. 温度、光照和磷酸盐脉冲输入对三角褐指藻的交互影响[J]. *中国环境科学*, 2015, 35(1): 244-250.
- [7] Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D. New insights into nitric oxide signaling in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59(1): 21-39.
- [8] Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses

- [J]. *Plant Science*, 2007, 172 (5) : 876–887.
- [9] Han P, Zhou X, Huang B, et al. On-gel fluorescent visualization and the site identification of S-nitrosylated proteins[J]. *Analytical Biochemistry*, 2008, 377 (2) : 150–155.
- [10] Carimi F, Zottini M, Costa A, et al. NO signalling in cytokinin-induced programmed cell death[J]. *Plant Cell and Environment*, 2005, 28 (9) : 1171–1178.
- [11] 梁洲瑞, 王飞久, 孙修涛, 等. 利用液相氧电极技术对鼠尾藻叶光合及呼吸作用的初步研究[J]. *水产学报*, 2012, 36 (12) : 1842–1853.
- [12] Liu X J, Duan S S, Li A F, et al. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21 (2) : 239–246.
- [13] Ralph P J, Gademann R. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity[J]. *Aquatic Botany*, 2005, 82 (3) : 222–237.
- [14] 郑雪红, 郑爱榕. 气相色谱法分析小球藻脂肪酸的组成[J]. *海洋科学*, 2012, 36 (6) : 22–27.
- [15] 杨净, 徐杰, 董宇亮, 等. 菠菜中不同等电点的乙醇酸氧化酶的提取和特性[J]. *华南师范大学学报: 自然科学版*, 2005 (4) : 91–98.
- [16] 唐娟娟, 罗兴录, 韦素, 等. 高低淀粉木薯品种光合特性研究[J]. *中国农学通报*, 2012, 28 (36) : 102–106.
- [17] Xu Y, Shao X J, Wu L Y, et al. iSNO-AApair: incorporating amino acid pairwise coupling into PseAAC for predicting cysteine S-nitrosylation sites in proteins[J]. *PeerJ*, 2013, 1 : e171.
- [18] Xue Y, Liu Z, Gao X, et al. GPS-SNO: Computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm[J]. *PloS One*, 2010, 5 (6) : e11290.
- [19] Xu Y, Ding J, Wu L Y, et al. iSNO-PseAAC: Predict cysteine S-Nitrosylation sites in proteins by incorporating position specific amino acid propensity into pseudo amino acid composition[J]. *PloS One*, 2013, 8 (2) : e55844.
- [20] Mass T, Einbinder S, Brokovich E, et al. Photoacclimation of *Stylophora pistillata* to light extremes: Metabolism and calcification[J]. *Marine Ecology Progress*, 2007, 334 (1) : 93–102.
- [21] 詹永乐. 桑叶中乙醇酸氧化酶活性的研究[J]. *蚕业科学*, 2007, 33 (1) : 98–101.
- [22] Maurino V G, Peterhansel C. Photorespiration: Current status and approaches for metabolic engineering[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13 (3) : 249–256.
- [23] Zhu Y R, Lu X Y, Wang S F, et al. The relationship between photorespiration and senescence of *S-polyrhiza* P143[J]. *Plant Science*, 2005, 168 (6) : 1625–1632.
- [24] Millar A H, Whelan J, Soole K L, et al. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2011, 62 : 79–104.
- [25] Bauwe H, Hagemann M, Fernie A R. Photorespiration: Players, partners and origin[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15 (6) : 330–336.
- [26] 陈畅, 黄波, 韩佩韦, 等. 蛋白质巯基亚硝基化: 一种典型氧化还原依赖的蛋白质翻译后修饰[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33 (7) : 609–615.
- [27] 吴飞华, 肖强, 陈娟, 等. 植物中一氧化氮参与的蛋白质翻译后修饰[J]. *细胞生物学杂志*, 2009 (2) : 198–204.
- [28] Benhar M, Forrester M T, Stamler J S. Protein denitrosylation: Enzymatic mechanisms and cellular functions[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10 (10) : 721–732.

责任编辑: 郎婧