

ETS 活性和呼吸作用*

ETS ACTIVITY AND RESPIRATION

张武昌

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

有机物的呼吸降解是与光合作用相反的过程,通过光合作用和呼吸作用的状况可以了解一个海区的营养状况和输出有机碳的能力。光和作用只局限于海水上层,呼吸作用却可以在水体的各个深度进行。研究呼吸作用对定量研究海洋生态系统的能流和物流以及建模具有重要意义。水体的呼吸作用通常用 Winkler 滴定氧法来测定,但是海水的呼吸作用很弱, Winkler 滴定氧法的精度很难达到;大型浮游生物和富营养水体可以使用这种方法,但是需要长时间的培养,费时费力,不适合中尺度时间和空间的海洋学调查。因此,尽管测量呼吸作用非常重要,但是对浮游生物的呼吸作用的研究却不多。人们一直在寻找迅速准确的方法来测量海水中浮游生物的呼吸作用,以了解呼吸作用在海洋中的分布。本文简要介绍通过测量 ETS(电子传递系统:Electron Transport System)活性估计呼吸作用的方法。早在 1961 年, Curl 和 Sandberg 就提出把与呼吸作用有关的酶的活性作为呼吸作用的指标。1971 年, Packard 提出测量呼吸作用中酶的活性来估计呼吸率。ETS 存在于细胞的线粒体和微粒体中,是由细胞色素(Cytochrome),黄素蛋白(Flavoprotein)和金属离子组成的复杂的链状结构(如图 1)。生物的营养物质(蛋白质,脂肪和葡萄糖)降解为 ETS 的反应底物:琥珀酸和 NADH(烟酰胺腺嘌呤还原型)或 NADPH(烟酰胺腺嘌呤磷酸还原型)。ETS 将反应的能量用于生成三磷酸腺苷(ATP),金属离子则将电子传递给氧生成水。

1 ETS 活性的测量

测量 ETS 活性的原理是,为破碎的细胞提供过量的反应基质(NADH, NADPH, 琥珀酸),同时用人工电子受体 INT(氯化 2-对碘苯 3-对硝基苯 5-苯基四氮唑)收集 ETS 传递的电子,在此过程中,INT 由无色变为红色的甲臍(Formazan)。用分光光度法测量甲臍的产量,从而计算 ETS 的活性。

1999 年第 3 期

1971 年 Packard 提出最初的方法以后,许多作者进行了改进,这里介绍 1981 年 Packard 和 Williams 的方法。

1.1 试剂配制

磷酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.0):每升含 2 ml 曲拉通 X-100 (Triton X-100), 1.5 g 聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl pyrrolidone, PVP), 18.5 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1g NaCN。

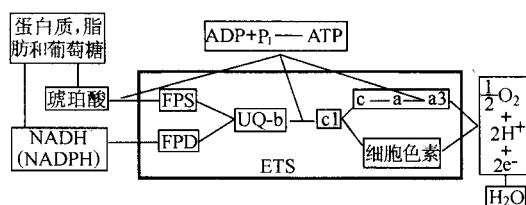


图 1 ETS 结构示意图

ADP: 二磷酸腺苷, Pi: 磷酸, UQ-b: 辅酶 Q-细胞色素-b 复合体;

FPS: 黄素蛋白(琥珀酸脱氢酶系); FPD: 黄素蛋白(NADH 降解系统)

反应基质:每升上述磷酸缓冲液中含 0.6 g NADH, 0.2 g NADPH, 36 g 琥珀酸钠。0~4 °C 保存,当天准备。INT 试剂(4 mmol/L):100 mg 氯化 2-对碘苯 3-对硝基苯 5-苯基四氮唑[2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride]溶于 50 ml 水,用 Na_2CO_4 和 HCl 调节 pH 值至 7.5;过滤,冷冻保存。

1.2 测定过程

根据海水中浮游生物体的浓度,将 2~8 L 海水过

* 国家自然科学基金资助项目 49790010 号;
中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3582 号。
收稿日期:1998-05-26;修回日期:1998-10-15

滤到玻璃纤维滤膜上,抽滤过程中压力不低于 1/3 大气压,拣出可见的浮游动物,用滤纸吸去水分,放入组织研磨器,0~4 °C 加入 3 ml 磷酸缓冲液研磨 2 min。在操作过程中要注意防止细菌污染。记录研磨后的体积,转入 15 ml 锥形离心管,0~4 °C 2 000 r/min (575 g)离心 5 min。吸出上清液 1 ml,加入 1 ml INT, 3 ml 反应基质,黑暗中现场海水温度培养 20 min。培养过程中 INT 反应为甲膳,培养液由透明变为粉红(如果变为红色,说明生物量过大,应减少过滤体积)。培养完毕,加入 1 ml 1:1(V/V) 1 mol/L H₃PO₄ 和丙酮的混合液,阻断反应,0~4 °C 2 000 r/min(575 g)离心 5 min,暂放于冰面上。记录体积,3 h 内用分光光度计测量 490 nm 和 760 nm 波长的吸光度值。490 nm 波长的吸光度与甲膳的浓度成正比,760 nm 的吸光度值用做浑浊度的指标。

样品中的色素也产生一定的吸光度,要做为空白减去,这个空白值叫做色素空白。因为各个样品的色素空白是不同的,所以每个样都要测色素空白。在上清液中不加入反应基质重复以上操作即可测定色素空白。

试剂也有吸光作用,应做为空白减去,这个空白值称为试剂空白。用滤膜过滤 1 ml 过滤海水,按以上操作分析该滤膜即可测定试剂空白。试剂空白(490 nm, 1 cm 光程)超过 0.05 说明试剂被细菌污染或试剂质量不好。

ETS 活性用下式求得:

$$\text{ETS} (\times 10^{-6} \text{h}^{-1}) = 60 \times S \times H \times (\text{COD} - \text{RB}) / (1.42 \times f \times V \times t)$$

其中,ETS 单位即每升海水每小时消耗的氧的体积; H 为研磨后的体积,单位 ml; S 为反应阻断后的体积,单位 ml;COD 为吸光度减去色素空白;RB 为试剂空白; V 为过滤海水的体积,单位 L; f 为参加反应的上清液的体积; t 为反应的时间,约 20 min;60 将单位换算为小时,1.42 将 O₂ 单位换算为 μl 。

1.42 是这样计算出来的:0.133 % Triton X-100 溶液中 INT-甲膳混合物在 490 nm 处的摩尔吸光系数是 $15.9 \times (\text{mol/L})^{-1}$ 。INT 还原为甲膳需要 2 个电子,而氧需要 4 个电子才能还原为水,所以 1 mol 浓度的 INT-甲膳混合物相当于 0.5 mol 浓度的 O₂(或 11.2 L 溶于 1 L 水),考虑到溶液体积,O₂ 浓度为 1×10^{-3} (1 μl O₂ 溶于 1 ml 水)的吸光系数为 $15.9 \times 10^3 / (11.2 \times 10^3) = 1.42$ 。上述结果乘 34.3 将 O₂ 单位换算为 $\mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{d})$ 。

2 不同基质对 ETS 活性的贡献

呼吸作用是一个氧化还原反应,通过 ETS 的电子由不同的基质提供。如图 1 所示,ETS 的反应基质有:琥珀酸,NADH 和 NADPH。在非海洋生物中,NADH 和琥珀酸是线粒体中电子的主要供体,而 NADPH 是微粒体中电子的主要供体。1995 年,Claude Savenkoff 等^[1]对同一样品分别使用这 3 种基质和它们的混合物测试 ETS 活性,发现 3 种脱氢过程对海洋生物 ETS 活性的贡献是不同的。无论原核生物还是真核生物,NADH 是最活跃的供氢者,仅以 NADH 为基质时测得的 ETS 活性是使用混合基质时所得活性的 85.5 %~100 %。另外,INT 不能完全氧化琥珀酸的还原产物。3 种脱氢过程分别测量之和大于同时测量时 3 种酶的活性,由此可见,各个脱氢过程可能竞争共用的电子受体。

3 ETS 活性和呼吸作用的关系

ETS 活性只是浮游生物呼吸作用 R 的一个指标,并不是呼吸作用的实际值,因此需要把 ETS 换算为 R 值,于是, R 和 ETS 的关系成为研究的焦点。虽然测定 ETS 的目的是估计海洋中浮游生物群落的呼吸作用,但是由于浮游生物群落的呼吸作用很弱,需要精度很高的自动滴定氧装置,所以对许多实验室中单种培养的细菌,原生动物,浮游植物,浮游动物的 ETS- R 关系进行的研究很多,来自自然海区的资料却很少。1995 年,Javier Aristegui 等^[2]收集了来自热带、亚热带和寒带海洋体长小于 225 μm 的浮游生物的大量资料,得出了如下关系:

$$\log R = 0.357 \pm 0.750 \log \text{ETS} (n=197, r^2=0.75, P < 0.0001)$$

上述关系表明,大洋中微型浮游生物的呼吸作用和 ETS 活性是具有相关性的,因此可以测量大洋中的 ETS 活性和上述方程来估计浮游生物的呼吸强度,从而在较大的时间和空间尺度上研究海洋中碳的平衡问题。

值得注意的是上述关系只适用于呼吸作用为氧 10~515 $\text{mg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 的海水,低于这个范围,由于不能获得准确的耗氧率,上述关系很难保证。

4 影响 R /ETS 的因素

为了简化计算,常用 R /ETS 比值表示两者的关系
海洋科学

系。虽然总的说来呼吸作用和 ETS 有很好的相关性,但是 R/ETS 比值却变化很大。如表 1 所示,不同类群的 R/ETS 比值变化很大,从 0.16 到 2.34 不等。但是

如果不考虑 2.34, 1.93 和 1.39 这 3 个大一点的数值, R/ETS 比值变化在 3~4 倍之间。

表 1 不同作者获得的桡足类和混合浮游动物种群的 R/ETS 值(仿 Santiago Hernandez-Leon, 1996)

生物	R/ETS	文献
<i>Calanoides carinatus</i>	0.65±0.19 (n=13)	Packard <i>et al.</i> (1974)
<i>Calanus pacificus</i> (VI 期幼体)	0.59±0.19 (n=2)	King and Packard (1975)
<i>C. pacificus</i> (VII 期幼体)	0.74±0.07 (n=2)	King and Packard (1975)
<i>C. pacificus</i>	0.46±0.06 (n=48)	Owens and King (1975)
<i>Acartia tonsa</i>	0.47±0.08 (n=13)	Bamstedt (1980)
<i>A. australis</i>	0.16±0.02 (n=4)	Ikeda and Skjoldal (1980)
<i>Calanus helgolandicus</i> and		
<i>C. finmarchicus</i>	0.19±0.02 (n=10)	Hirche (1983)
<i>Euchaeta norvegica</i>	0.77±0.19 (n=6)	Skjoldal <i>et al.</i> (1984)
南极浮游动物	0.57±0.26 (n=12)	Ikeda and Hing Fay (1981)
浮游动物	0.50±0.17 (n=146)	King and Packard (1975)
浮游动物	0.38±0.05 (n=12)	Bidigare <i>et al.</i> (1982)
浮游动物	2.34±0.76 (n=5)	Alcaraz and Packard (1989)
桡足类	0.71±0.40 (n=2)	King and Packard (1975)
桡足类	1.39±0.66 (n=2)	Bamstedt (1979)
桡足类 (100~200 μm)	1.93±2.14 (n=31)	[3]
桡足类 (200~500 μm)	0.65±0.32 (n=130)	[3]
桡足类 (500~1 000 μm)	0.61±0.31 (n=18)	[3]
桡足类 (>1 000 μm)	0.23±0.14 (n=23)	[3]

R/ETS 比值变动的原因是什么呢? 1996 年, Santiago Hernandez-Leon^[3]研究了这个问题,结果表明,温度、体长和食物的丰度可能影响 R/ETS 比值。他测定了不同体长(100~200, 200~500, 500~1 000 和 > 1 000 μm)的浮游动物的 R 和 ETS 活性,发现 R/ETS 比值与温度呈负相关,个体越小,随着温度的降低 R/ETS 比值增大得越明显。发生在冬季末期的一次水华中, R/ETS 比值和初级生产力的变动趋势相似。 R/ETS 的高值和初级生产力的高值同时发生说明食物可能对 R/ETS 比值有影响。

ETS 的电子传递作用是动态平衡过程,在 ETS 活性一定的情况下,呼吸作用 R 的值却有很大的变化范围,这取决于机体中 ADP、磷酸和 ATP 的浓度。体内 ATP 多时, R 很小;相反, ATP 少而 ADP 和磷酸多时, R 会变大。另外,基质的浓度对 R 也有影响,当生物处于饥饿而基质缺乏时,即使测出的 ETS 活性很高, R 值也不会高,这一点正如巧妇难为无米之炊。研究证明这种情况在自然群体中很少发生。食物对 R/ETS 比值的影响说明呼吸作用的变化是 R/ETS 比值变动的主要原因。

生物 ETS 活性随时间发生波动说明 ETS 传递电

子的效率也是限制呼吸的因子。当基质充足时,呼吸增加还要依靠 ETS 的增加,这是 ETS 和 R 值同步变动的的原因。因为酶在反应中是不消耗的,所以 ETS 酶随时间波动的机制尚需研究。

5 呼吸作用在海洋中的分布

R 和 ETS 之间的关系尚有许多不确定的地方,所以由此得出的呼吸值仅是估计值。但是,由于测定 ETS 比测氧法快得多,能提供中尺度时间和空间的调查资料,所以有些对海洋浮游生物群落呼吸作用的调查使用了这种方法。从这些调查可以看出呼吸作用的一些分布规律。从极区到热带,呼吸作用增大:在南极,呼吸作用为碳 0.45~1.69 g/(m²·d),北大西洋为 2.1~3.3 g/(m²·d),热带的印度尼西亚为 1~4.2 g/(m²·d)。和初级生产力相比,呼吸消耗了相当一部分初级生产力。从平面分布看,呼吸作用的高值与生物量的高值出现在同一区域。从垂直分布看,呼吸作用的高值出现在深度 50 m 以上,表层以下。

除上述 R/ETS 比值有很大变化范围外,还有许多不利因素影响这种方法的推广,例如:在测定 ETS

活性的过程中浮游植物光合作用电子转移的影响,藻类和细菌对氧化酶的竞争等。所以,对 ETS 活性的调查要结合实测呼吸作用,以便获得现场的 R/ETS 校正值。因为对 ETS 活性的测定是迄今为止进行中尺度呼吸作用调查的最快、最简单、最便宜的方法,所以人们对 ETS 活性的兴趣持续不衰。我国对 ETS 活性的研究也逐渐受到重视。

参考文献

- 1 Claude Savenkoff, *et al.* . *Journal of Plankton Research*, 1995, 17(8): 1 593~1 604
- 2 Javier Aristegui *et al.* . *Journal of Plankton Research*, 1995, 17(7): 1 563~1 571
- 3 Santiago Hernandez-Leon *et al.* . *Journal of Plankton Research*, 1996, 18(2): 239~255