

以硝酸鹽運輸蛋白的基因表現評估東海矽藻缺氮之跨陸棚趨勢

吳怡萱¹、康利國²、王玄芳²、龔國慶¹、張正^{1,2}¹國立臺灣海洋大學海洋環境化學與生態研究所²國立臺灣海洋大學海洋生物研究所

前言

浮游植物是海洋食物鏈中的初級生產者，能吸收大氣中的溫室氣體—二氧化碳，行光合作用後使無機碳轉換成有機碳，這些有機碳最後有一部分會以死亡細胞或是生物排泄物的形式沉降到深海中，整個過程稱為生物幫浦 (biological pump)，有利於減緩全球的溫室效應 (Falkowski 2002)。在許多浮游植物當中，矽藻體型較大，且具有矽質細胞壁，因此沉降速率較其他浮游植物還要快，是生物幫浦中沉降作用主要的貢獻者。而體型較大的矽藻也可供橈腳類和魚類直接食用，在傳統食物鏈當中將能量有效率的向上傳遞。

矽藻在生長時受到許多環境因子的影響，當環境中光照和溫度都很充足並適合浮游植物生長時，營養鹽就成了最主要的限制因子 (Hecky 1988)。在各種海洋環境的營養鹽當中，氮是最常發生，而且影響程度最顯著的限制因子 (Downing et al. 1999)。在行光合作用的真核生物當中，存在著一群硝酸運輸蛋白 (nitrate transporter gene; *Nrt*)，負責細胞對硝酸鹽的吸收 (Galván and Fernández 2001)，而 *Nrt2* 的表現量被認為可以做為自然環境中浮游植物缺氮程度的指標 (Kang et al. 2007)。偵測基因的相對表現量是研究浮游植物生態的新興方法，但在自然界偵測到的表現量差異同時受到海水中細胞濃度以及細胞中 *Nrt2* mRNA 含量的影響，所以還需利用參考基因的表現量來校正 (Kang et al. 2011)。最近的測試結果顯示 *EFL* 可以作為矽藻中良好的參考基因。

本研究合併使用 *Nrt2* 和 *EFL* 引子 (Kang et al. 2011)，針對 2010 年八月與 2011 年六月東海航次的矽藻樣本偵測 *Nrt2* 的基因表現，藉以瞭解矽藻在東海陸棚海域是否受到含氮營養鹽的限制。

ORII Cr 1744

2010/8/25-2010/8/27

ORII Cr 1796

2011/6/8-2011/6/10

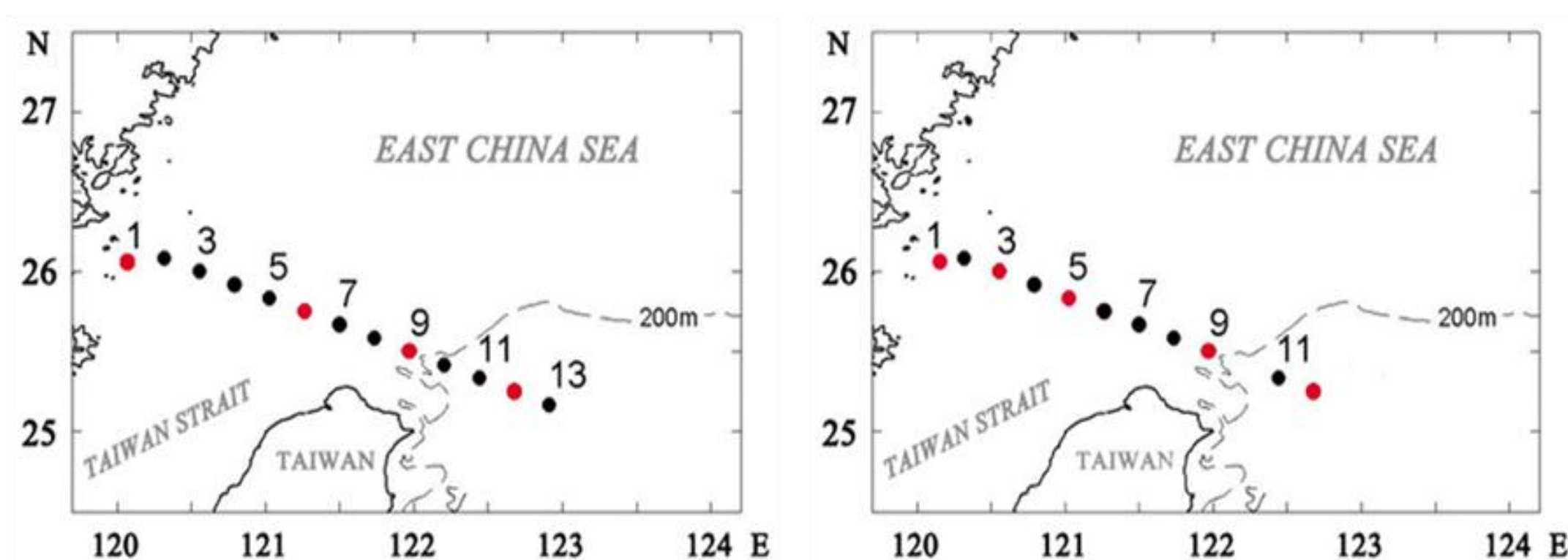


Fig. 1. 東海航次測站分布圖，紅點測站為進行培養實驗的測站。

材料與方法

樣本採集—浮游植物之樣本採集自海研二號 2010 年 8 月 25-27 日之 1739 航次與 2011 年 6 月 8-10 日之 1796 航次 (Fig. 1)。在各測站利用網目為 20 μ m 的浮游生物網在水深 5 米處進行水平拖網，收網後將承接瓶內的水樣以 1 mm、200 μ m 以及 20 μ m 的網布依序過濾，再將留在 20 μ m 網布上之細胞去除多餘水分後收集至抗凍管，RNA 樣本先加入 RLT buffer 再以液態氮保存。

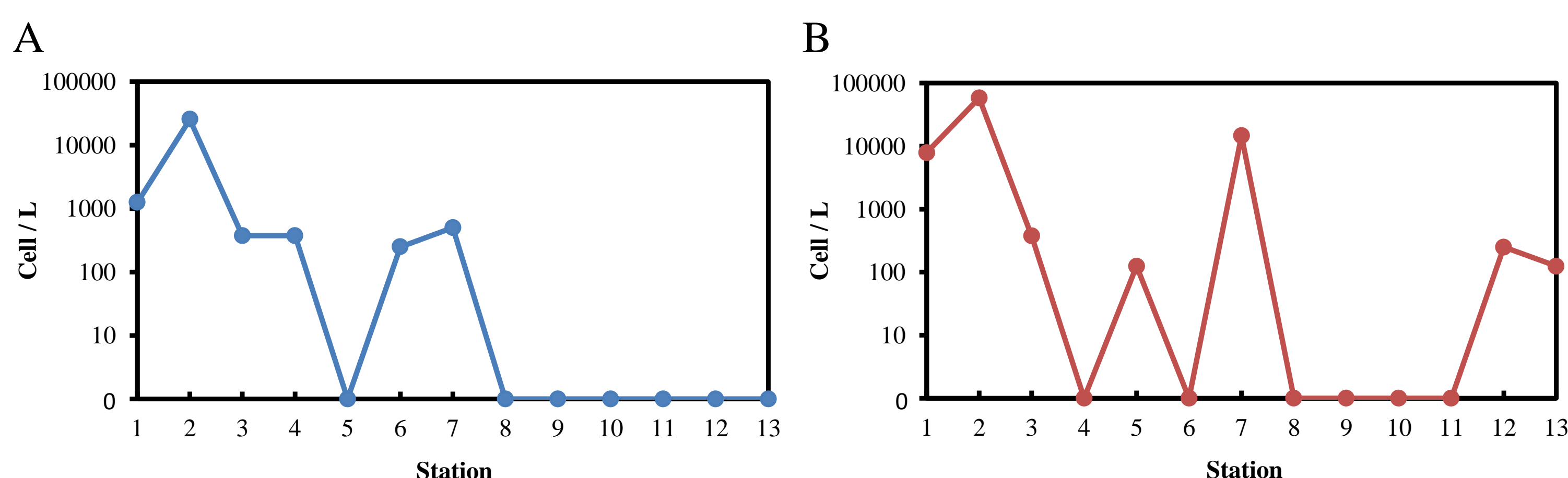
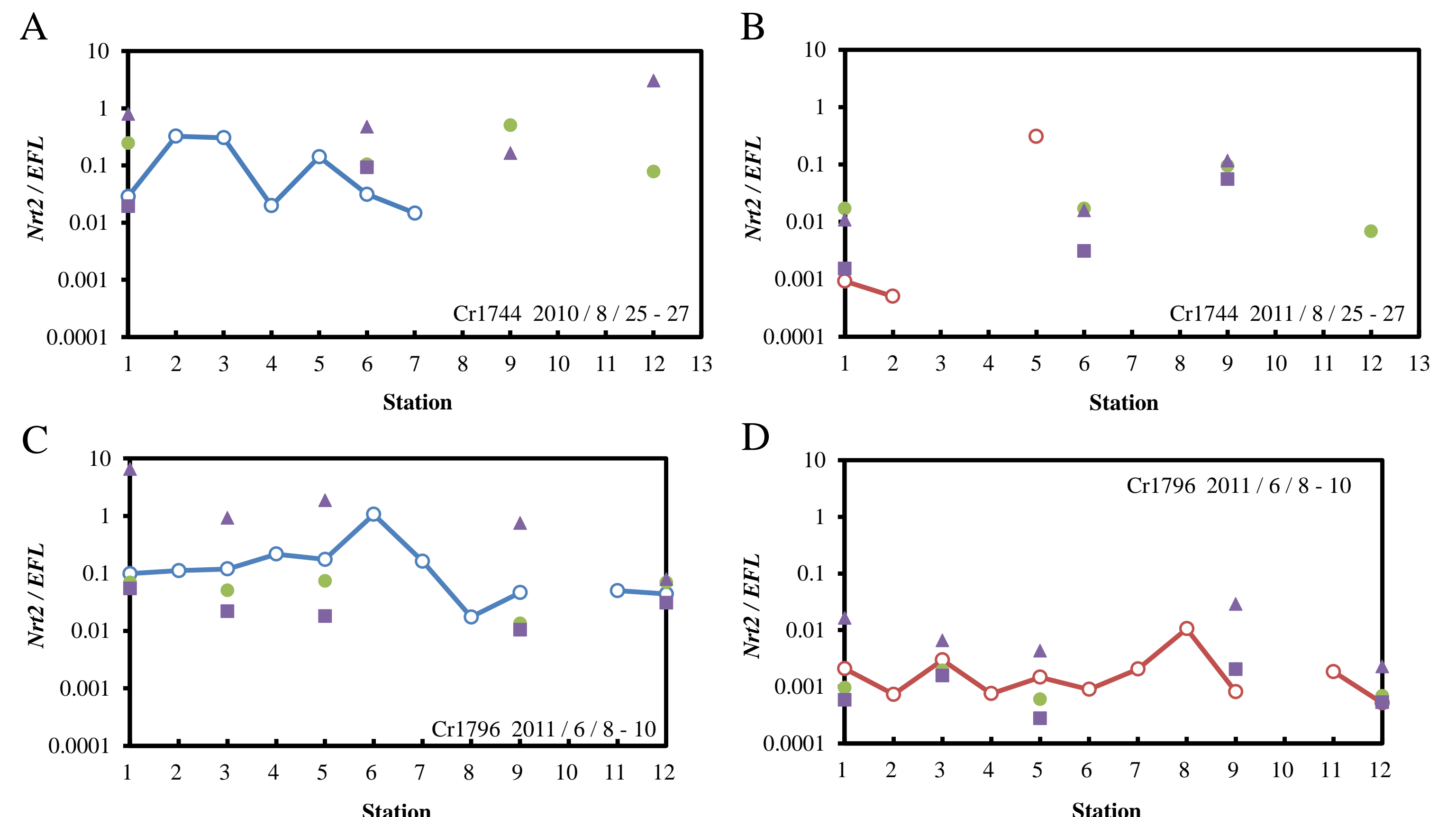
培養實驗—在 1739 航次的 1、6、9、12 四個測站與 1796 航次的 1、3、5、9、12 五個測站進行培養實驗，取七公升採水瓶內五米深的海水，加入一公升在各測站進行水平拖網後承接瓶內水樣，混和後將水樣以 1 mm、200 μ m 的網布過濾，分裝成三個兩公升的培養瓶，一瓶為對照組培養一小時，一瓶加入氮培養一小時，一瓶讓其缺氮且培養 24 小時，培養結束後以 20 μ m 的網布過濾水樣，再將留在 20 μ m 網布上之細胞去除多餘水分後收集至抗凍管，並加入 RLT buffer 以液態氮保存。

全體 RNA 萃取—將所收集的 sample 加入適量的 RLT buffer 打破細胞，然後加入 100% 酒精沉澱 RNA，離心後去除多餘的酒精並以 DEPC 回溶 RNA，最後放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

全體 RNA 純化—2010 年 8 月之 1739 航次的樣本額外進行一次 purification，將全體 RNA 與 TRI reagent 混和後放置室溫讓其反應，加入 chloroform 混和後離心取上清液與 isopropanol 混和，離心後加入 70% 酒精沉澱 RNA，再次離心後以 DEPC 回溶 RNA，再加入 2 M potassium acetate 置於冰上反應，離心後加入酒精清洗兩次，最後去除多餘的酒精並以 DEPC 回溶 RNA，放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

反轉錄反應 (Reverse transcription; RT)—全體 RNA 與 random primer 置於 70 度高溫下反應 5 分鐘，反應完成後立刻置於冰上，再加入 10 x RT buffer、10 x random primer、25 mM dNTP、RNase inhibitor、1 μ l MultiScribe RTase 及 DEPC water，最終體積 20 μ l，將全體 RNA 於 PCR 機器中反應，使 total RNA 反轉錄成 cDNA。

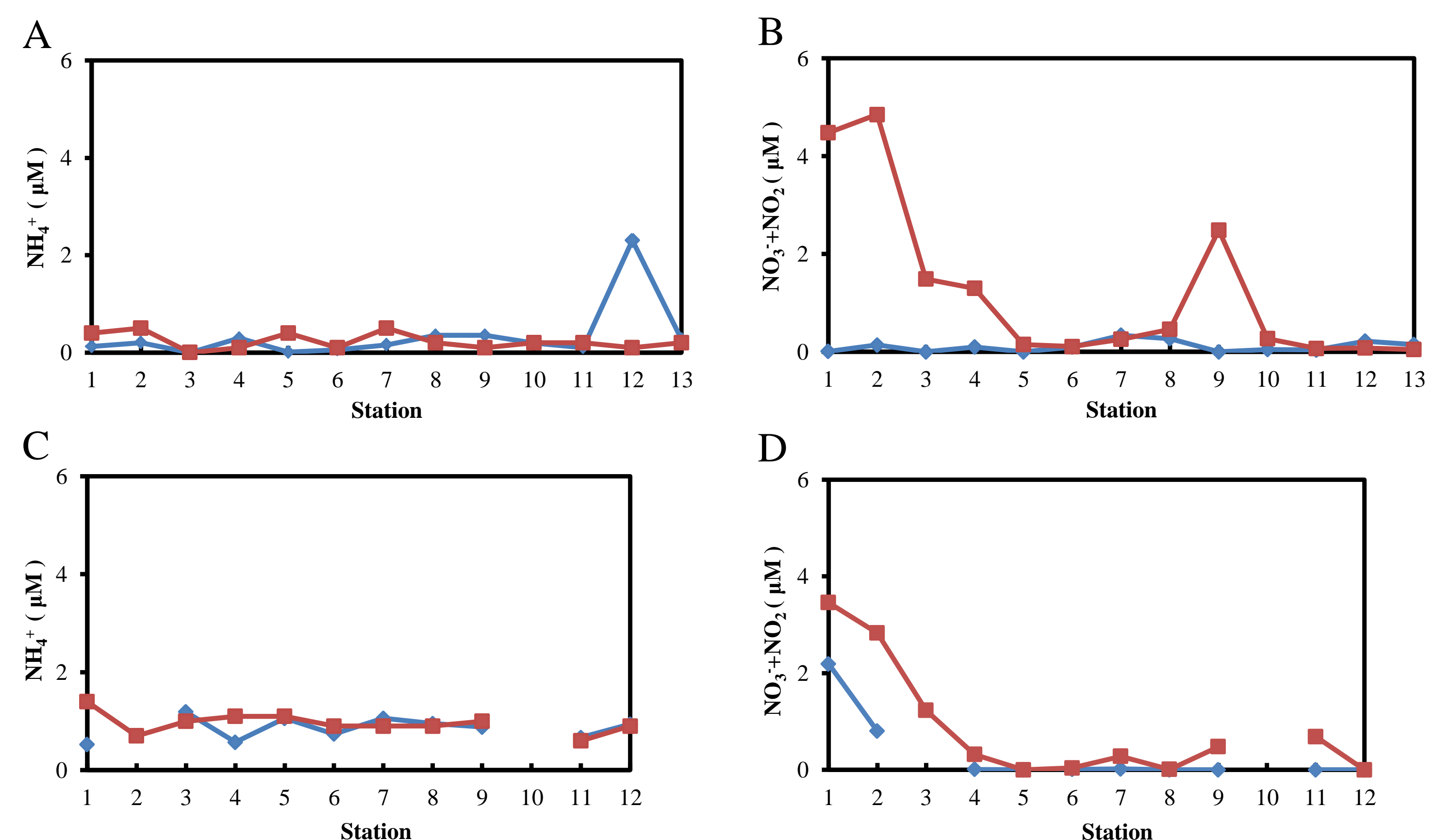
定量 PCR—先將 cDNA 以 30 μ l dH₂O 稀釋，每個反應加入 5 μ l cDNA、2.5 μ l forward primer、2.5 μ l reverse primer、10 μ l 2x SYBR Green PCR mixture，最終體積為 20 μ l，此時使用的引子為實驗室康利國學長所設計之針對 *Skeletonema* 與 *Cheateoceros* 兩物種的 *EFL* gene 與 *Nrt2* gene 共四對引子，將樣品放置 ABI PRISM 7500 Sequence Detector 內進行反應，反應中偵測 SYBR Green 與雙股產物結合後產生的螢光值，反應結束後進行 melting curve 分析，將溫度升溫至 95 $^{\circ}$ C，雙股產物會因為升溫而打開雙股，此時 SYBR Green 無法結合，產生螢光下降的情形而決定 melting temperature，可判斷引子的專一程度。

Fig. 2. 2010 年八月航次的 *Skeletonema* (A) 與 *Chaetoceros* (B) 細胞組成豐富度。Fig. 3. 2010 年八月 (A、B) 與 2011 年六月 (C、D) 兩航次 *Skeletonema* 和 *Chaetoceros* 的 *Nrt2* 相對表現量。(○為 *Skeletonema* *Nrt2* 基因表現量的現場值；○為 *Chaetoceros* *Nrt2* 基因表現量的現場值；▲為缺氮 24 小時培養的測值；●為培養實驗控制組的測值；■為加氮一小時的測值)。

結果與討論

在 2010 年八月的樣本中，由第八至第十三測站並未偵測到 *Skeletonema* *Nrt2* 的基因表現 (Fig. 3A)，可能是樣本中 *Skeletonema* 細胞含量過低 (Fig. 2A)。另外在第一站、第四站、第六站與第七站的表現量偏低，這四個測站的細胞含量均為中等，因此推測這四個測站的 *Skeletonema* 並不缺氮營養鹽。在第二站、第三站與第五站的表現量較高，接近鄰近培養測站的最高值，因此推測在這三個測站中 *Skeletonema* 的細胞內缺氮。對 *Chaetoceros* 而言 (Fig. 3B)，僅在第一、第二與第五測站偵測到 *Nrt2* 基因表現，且沿岸的第一與第二站現場值偏低，可推測在沿岸此藻種並不缺氮，而第五站的測值是所有測值的最高值，依照第六站的培養結果，第五站的細胞應是處於缺氮的狀態。在第四站與第八到十一站都沒有結果，原因是樣本中本無此種矽藻 (Fig. 2B)，其餘測站則是測值太低或是偵測到的產物專一性不好，且某些測站也出現僅培養實驗能得到結果的現象。

2011 年六月的航次沒有在第十站進行採樣，在其他測站 *Skeletonema* 的 *Nrt2* 相對表現量在沿岸與黑潮區皆偏向最低表現量 (Fig. 3C)，顯示在這兩個區域 *Skeletonema* 並不缺氮。而在台灣海峽區域內(第三到第七站)，所獲之測值大約落在最高與最低值中間，顯示出細胞正利用硝酸鹽當作主要氮源。在湧升區域(第八到第十站)的 *Nrt2* 表現量下降，顯示這個區域的 *Skeletonema* 細胞並不缺氮。*Chaetoceros* 的 *Nrt2* 測量結果普遍都比 *Skeletonema* 物種的表現量要低，同時在沿岸的區域表現量也是偏低，顯示細胞不缺氮，而在台灣海峽區域，*Nrt2* 表現量中等，顯示細胞主要在利用硝酸鹽的情形，其中以第五站最明顯。到了湧升區域，除第八站之外，測值開始下降，直至黑潮區也都是測值偏低的情形。第八站的測值為所有測值當中最高的，而且接近第九站培養實驗的最大測值，由於環境中並不缺氮 (Fig. 4C)，細胞為何缺氮尚待進一步釐清。

Fig. 4. 2010 年八月 (A、B) 與 2011 年六月 (C、D) 航次含氮營養鹽的含量 (μ M) (◆為水深 5 米的資料；■為水深 25 米的資料)。

參考文獻

- Downing, J. A., Osenberg, C. W., Sarnelle, O. 1999. Meta-analysis of marine nutrient-enrichment experiments: variation in the magnitude of nutrient limitation. *Ecology* 80:1157-1167.
- Falkowski, P. G. 2002. The ocean's invisible forest. *Sci. Am.* 287: 54-61.
- Galván, A. and Fernández, E. 2001. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 225-233.
- Hecky, R.E. 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnol. Oceanogr.* 33: 796-822.
- Kang, L. K., Wang, H. F., Chang, J. 2011. Diversity of phytoplankton nitrate transporter sequences from isolated single cells and mixed samples from the East China Sea and mRNA quantification. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 122-130.