

# 磷饥饿番茄液泡膜蛋白组分的适应性变化研究

徐 函 兵<sup>1,2</sup>, 朱 庆 松<sup>2</sup>, 单 树 花<sup>1,3</sup>, 刘 晶 茹<sup>1</sup>, 宋 克 敏<sup>1</sup>

(1. 华中农业大学 植物科技学院, 湖北 武汉 430070; 2. 信阳农业高等专科学校, 河南 信阳 464000; 3. 太原师范学院, 山西 太原 030031)

**摘 要:**通过溶液培养试验,研究了磷饥饿下番茄幼苗可溶性蛋白及根部液泡膜蛋白适应性的变化。结果表明:磷饥饿番茄幼苗根中可溶性蛋白质含量显著高于对照,而茎叶中可溶性蛋白质含量变化不显著;另外,茎叶中可溶性蛋白变化比根中迟;磷胁迫番茄幼苗根中的磷可能被转移到茎叶中重新利用。磷饥饿番茄幼苗根中液泡膜蛋白含量与各自的对照大体相当;通过 SDS-PAGE 检测到磷饥饿番茄液泡膜蛋白中新增 49.9、52.6 kD 多肽谱带,由于磷饥饿处理时间相对较短,尚未对番茄幼苗的生长造成严重影响,所以,该多肽(49.9、52.6 kD)可能是磷饥饿特异诱导多肽。

**关键词:**番茄;磷饥饿;可溶性蛋白;液泡膜蛋白

**中图分类号:**Q 946.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)07-0113-03

磷是植物营养三要素之一。在许多环境中,磷也是植物最难获得的矿质元素之一,经常导致植物磷饥饿。为了适应磷饥饿,植物体内的许多生理生化过程将经受重大调整,许多蛋白质和酶的含量及活性发生变化,并且有一些磷饥饿特异诱导蛋白质和酶的合成(如磷酸酶、RNA 酶、高亲和力和磷转运蛋白等),这些蛋白质和酶共同对低磷胁迫下磷的吸收、活化、转运及利用起重要作用。众所周知,在成熟细胞中,液泡占了细胞体积的 80%~90%,而液泡在胞质溶胶的动态平衡中发挥着重要作用。在磷充足时,植物细胞把过剩的磷贮存在液泡内;在缺磷时又释放出液泡中的磷以维持胞质中磷的水平<sup>[1]</sup>。该试验研究了磷饥饿番茄液泡膜蛋白质变化,以期鉴别磷饥饿特异诱导的多肽;同时对磷饥饿番茄组织中可溶性蛋白变化状况进行观察分析,以便进一步了解番茄对低磷环境的适应机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以番茄品种“世纪星”(Lycopersicon esculentum Mill. ‘Shijixing’)为试材。

### 1.2 试验方法

1.2.1 液泡膜微囊的提取和分离 植物材料培养、液泡膜微囊的提取和分离与单树花等<sup>[2]</sup>方法相同。

**第一作者简介:**徐函兵(1970-),男,河南潢川人,硕士,讲师,现主要从事植物生理学教学与科研工作。

**责任作者:**宋克敏(1962-),男,博士,副教授,现主要从事植物生理生化教学与科研工作。E-mail:skminy@sohu.com。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30170082)。

**收稿日期:**2012-12-21

1.2.2 液泡膜蛋白样品的制备 0.5 mL 蛋白提取液 [0.1 mol/L Tris, 0.05 mmol/L Na<sub>2</sub> EDTA, 0.1 mol/L KCl, 6 mmol/L HCl, 2%(V/V) 巯基乙醇, pH 8.4] 和液泡膜微囊制剂 0.5 mL 充分混合后在冰浴 10 min。4℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。再次向沉淀中加入蛋白提取液, 悬浮沉淀, 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。向沉淀中加入 0.5 mL 预冷的 0.1 mol/L 乙酰胺-甲醇溶液, -20℃ 过夜, 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。沉淀用 0.1 mol/L 乙酰胺-甲醇溶液洗 2 次, 最后用 80% 丙酮洗 1 次。液氮干燥, 冷藏备用。

1.2.3 蛋白质 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶厚 1.0 mm、宽 10.0 cm、长 12.0 cm。4% 浓缩胶, 分离胶浓度为 10%。浓缩胶 120 V, 分离胶 80 V 恒压电泳约 4 h。硝酸银染色。根据标准蛋白的迁移率计算未知蛋白的分子量。银染后的凝胶用 Gene Genius 凝胶成像系统成像和分析。

### 1.3 项目测定

可溶性蛋白提取参照李合生<sup>[3]</sup>的方法;可溶性蛋白含量和液泡膜蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法。

### 1.4 数据分析

所有试验数据用 Excel 软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 磷饥饿时番茄幼苗可溶性蛋白总含量的变化

由表 1 可知,番茄根中可溶性蛋白质含量胁迫处理均显著高于对照( $P < 0.05$ );而茎叶中可溶性蛋白质含量变化则相反,胁迫处理均低于对照,但影响不显著;同时,根中可溶性蛋白质含量变化比茎叶出现得早。

表 1 磷饥饿时番茄幼苗根中可溶性蛋白质含量变化

Table 1 Change of soluble protein contents from the roots of tomato seedlings under Pi starvation

处理天数 /d	可溶性蛋白质含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$			
	根		茎叶	
	磷饥饿	对照	磷饥饿	对照
3	18.2450	17.2309	64.3062	64.4129
5	20.5400	17.4444	63.2387	64.3595
7	21.8210	19.1523	56.0867	62.0645
9	22.7817	20.0063	49.8420	60.1431

## 2.2 磷饥饿时番茄幼苗根液泡膜蛋白质含量的变化

由表 2 可知,磷饥饿与对照番茄幼苗根液泡膜蛋白质含量大体相当,没有明显的变化。

表 2 番茄幼苗根液泡膜蛋白质含量

Table 2 Contents of tonoplast proteins of the roots of tomato seedlings

处理天数 /d	蛋白质含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$	
	磷饥饿	对照
3	90.5±12.5	92.4±11.6
5	89.5±14.4	85.7±16.4
7	94.2±13.8	91.7±11.7

## 2.3 磷饥饿对番茄幼苗可溶性蛋白组成和相对含量的影响

由图 1 可以看出,磷饥饿 3 d,处理与对照之间根中可溶性蛋白没有明显变化;磷饥饿 5 d,与对照相比,处理中 51.3、38.9 kD 多肽谱带浓度有所增加;由图 2 可以看出,磷饥饿 7 d 的多肽谱带与磷饥饿 5 d 可溶性蛋白质组分变化相似。而茎叶可溶性蛋白组分在磷饥饿处理 7 d 时才发生变化,与对照相比,处理中 61.8、69.4 kD 多肽谱带浓度有所增加。

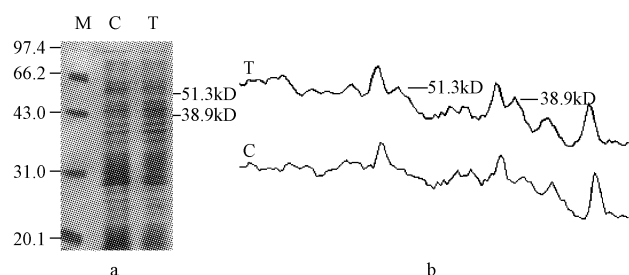


图 1 磷饥饿 5 d 番茄幼苗根可溶性蛋白 SDS-PAGE 分析

注:a:电泳图;b:扫描图;M:标准蛋白;T:磷饥饿处理;C:对照。下同。

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of soluble proteins from the roots of tomato seedlings under Pi starvation for 5 d

Note:a:Profile;b:Scanning illustrative plates of SDS-PAGE;M:marker;T:Pi starvation treatment;C:Control. The same as below.

## 2.4 磷饥饿对番茄幼苗根液泡膜蛋白质组成和相对含量的影响

由图 3 可知,磷饥饿与对照相比,处理 5 d 的根液泡膜蛋白质组分中 45.7 kD 的多肽谱带浓度增加,并新增 2 条 52.6、49.9 kD 的多肽谱带;而且 52.6 kD 多肽谱带

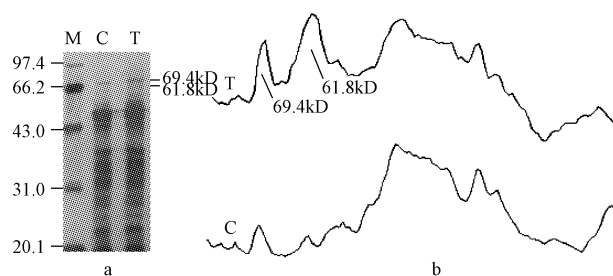


图 2 磷饥饿 7 d 番茄幼苗茎叶中可溶性蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of soluble proteins from the shoots of tomato seedlings under Pi starvation for 7 d

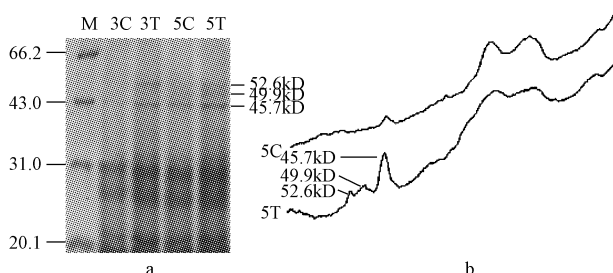


图 3 磷饥饿 3、5 d 番茄幼苗根液泡膜蛋白 SDS-PAGE 分析

注:M:标准蛋白;3、5 T:磷饥饿处理 3、5 d;3、5 C:对照 3、5 d。

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of tonoplast proteins from the roots of tomato seedlings under Pi starvation for 3, 5 d

Note:Marker;3, 5 T:Pi starvation treatment for 3 or 5 d;3, 5 C:Control for 3 or 5 d.

在磷饥饿 3 d 幼苗中已经出现。

## 3 讨论

磷不仅是植物营养三要素之一,而且是构成植物体内许多重要有机化合物(如核酸、磷脂等)的组成成分,并在光合作用、呼吸作用及一系列酶活性的调节中起着重要作用。然而,在许多环境中,磷是植物最难获得的矿质元素之一。这可以导致植物处于磷饥饿的状态。低磷胁迫能引起植物蛋白质和酶的含量及活性发生变化,并且有一些磷饥饿特异诱导蛋白质和酶的合成(如磷酸酶、高亲和力和磷转运蛋白等)。已经在烟草<sup>[4]</sup>、番茄<sup>[6]</sup>、油菜<sup>[6]</sup>、玉米<sup>[7]</sup>等多种植物中发现磷饥饿诱导磷酸酶活性的升高。磷饥饿时细胞内磷酸酶能够水解核酸、磷脂、甘油磷酸等有机磷化合物,使磷再循环利用。

该试验结果表明,磷饥饿处理番茄幼苗根中可溶性蛋白质含量显著高于对照( $P < 0.05$ ),而茎叶中可溶性蛋白质含量变化不显著;并且根中可溶性蛋白质含量变化比茎叶出现得早(表 1)。SDS-PAGE 的结果也进一步证实了这一点。SDS-PAGE 的结果表明,磷饥饿 5 d,与对照相比,根中 51.3、38.9 kD 多肽谱带浓度有所增加,而此时茎叶中多肽谱带尚无明显差异(图 1~2)。这可能是磷饥饿时根细胞中的磷主要被转运往茎叶重新利用<sup>[7]</sup>,茎叶可能

比根晚一些处于低磷胁迫之中,因此,推测茎叶中可溶性蛋白变化比根中迟可能与根中磷的重复利用有关。

该试验结果还表明,磷饥饿与对照番茄幼苗根液泡膜蛋白质含量大体相当(表 2),但液泡膜蛋白组成有一定的差异(图 3)。这个结果说明,蛋白质的总量并不依赖于供磷状况,但蛋白质合成时不同蛋白质的表达在一定程度上受供磷状况的影响。越来越多的研究表明,植物在磷饥饿下,会诱导出高亲和力和磷转运子。这在马铃薯<sup>[8]</sup>、番茄<sup>[9]</sup>等植物的研究中都得到了证实。该试验直接以番茄幼苗为材料,用 SDS-PAGE 方法,在幼苗根中也检测到 52.6、49.9 kD 液泡膜多肽。实际上,52.6、49.9 kD 液泡膜多肽的诱导与磷转运(磷吸收)的变化是一致的<sup>[9]</sup>。另外,由于该试验中磷饥饿处理时间相对较短,尚未对番茄幼苗的生长造成严重影响,所以,该多肽(52.6、49.9 kD)可能是磷饥饿特异诱导的液泡膜多肽。由于液泡膜蛋白含量不足细胞总蛋白的 1%,并且液泡膜与细胞中其它膜相比,蛋白含量相对较少,因此即使混入少量的其它膜也会使样品中含有比较多的非液泡膜蛋白成分,有鉴于此,该试验过程中对液泡膜进行了纯化<sup>[10]</sup>。虽然高纯度的液泡膜结合 SDS-PAGE 可以鉴别出一定量的多肽,但这些新多肽是否是磷转运蛋白质的组成成分尚不能确定,因此,这些新的多肽的具体功能鉴定,如进一步对其基本生化性质、氨基酸序列分析及与其它试材中检测到的磷饥饿诱导蛋白的同源性比较,蛋白质重组和表达等还需进一步更多的试验。

## Study on Changes in Protein Components of Tonoplast from the Roots of Tomato Seedlings During Phosphate Starvation

XU Han-bing<sup>1,2</sup>, ZHU Qing-song<sup>2</sup>, SHAN Shu-hua<sup>1,3</sup>, LIU Jing-ru<sup>1</sup>, SONG Ke-min<sup>1</sup>

(1. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070; 2. Xinyang Agricultural College, Xinyang, Henan 464000; 3. Taiyuan Normal University, Taiyuan, Shanxi 030031)

**Abstract:** The changes in tonoplast proteins and soluble proteins under Phosphate (Pi) starvation were studied in tomato seedlings growing by solution culture method. The results indicated that with the extension of Pi starvation time, the soluble protein contents increased significantly in tomato roots, but the changes in shoots were not remarkably. In addition, it was also noted that the changes were later in shoots than in roots. It was reasonable to suppose that due to the remobilization of Pi from root to shoot during Pi stress, the shoot was later under Pi stress than the root in tomato, so the changes of proteins in response to Pi stress were later in shoots than in roots. The contents of tonoplast proteins from the roots of tomato under Pi starvation approximated to those of their unstressed controls respectively. However, the components of polypeptides under Pi starvation differ from those of the controls. These results indicated that Pi stress had no effect on the total amount of synthesis of proteins but has some effect on the differential expression of proteins during protein synthesis. SDS-PAGE showed that there were two novel polypeptides (49.9, 52.6 kD) that appeared in tonoplast under Pi starvation for 5 day but not in control. Because Pi stress treatment duration in our study was relatively short which had no serious effect on the growth of the seedlings, the differential expression of polypeptides above-mentioned (49.9, 52.6 kD) may be specific to Pi stress.

**Key words:** tomato; phosphate starvation; soluble proteins; tonoplast proteins

## 参考文献

- [1] Lee R B, Ratcliffe R G, Southon T E. <sup>31</sup>P NMR measurement of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots; relationships with phosphorus status and phosphorus fluxes [J]. J Exp Bot, 1990, 41 (9): 1063-1078.
- [2] 单树花, 宋克敏, 刘晶茹, 等. 磷饥饿下番茄幼苗根液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 活性的适应性变化[J]. 植物生理与分子生物学报, 2006, 32(6): 685-690.
- [3] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 178-185.
- [4] Ninomiya Y, Ueki K, Sato S. Chrome to graphic separation of extracellular acid phosphatase of tobacco cell cultured and Pi-supplied and omitted conditions[J]. Plant Cell Physiol, 1977, 18: 413-120.
- [5] Goldstein A H, Mayfield S P, Danon A, et al. Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum* III: Changes in protein secretion under nutrient stress [J]. Plant Physiol, 1989, 91: 175-182.
- [6] Carswell M C, Grant B R, Plaxton W C. Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphate [J]. Planta, 1997, 203: 67-74.
- [7] 樊明寿, 陈刚, 孙国荣. 低磷胁迫下玉米根中磷的运转与再利用[J]. 作物学报, 2006, 32(6): 946-948.
- [8] Cogliatti D H, Clarkson D T. Physiological changes in, and phosphate uptake by potato plants during development of, and recovery from phosphate deficiency[J]. Physiol Plant, 1983, 58: 287-294.
- [9] 宋克敏, 焦新之, 李琳, 等. 磷酸饥饿对番茄幼苗生长状况及其磷吸收的影响[J]. 云南植物研究, 1998, 20(3): 343-353.
- [10] 徐函兵, 何晖, 单树花, 等. 磷饥饿番茄液泡膜微囊的制备及纯化[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(16): 4767, 4769.