

七子花叶片蛋白组分含量动态分析

杨蓓芬, 李钧敏, 金则新

(台州学院 生态研究所, 浙江 临海 317000)

摘要:对七子花叶片中 5 种蛋白组分含量的动态变化进行了研究。结果表明:七子花叶片的总蛋白含量变化曲线呈“W”型,叶片生长初期含量基本保持稳定,5 月中旬含量开始下降,并且下降幅度较大,6 月中旬达一低值后,其含量迅速上升,到 7 月中旬(盛花期)达一峰值,接着其含量下降,到 8 月中旬达到最低,后又上升直至落叶时达到最高值。水溶蛋白含量季节性变化呈“低—高—低—高”,在叶生长初期上升,峰值出现在 5 月中旬,以后逐渐下降,到 7 月中旬达最低值,之后缓慢上升,落叶前达到最高值。盐溶蛋白在叶生长初期迅速下降,到 5 月中旬达最低值,后一直呈上升趋势。醇溶蛋白与碱溶蛋白在叶生长初期有所下降,至 6 月中旬达到最小值,以后迅速上升,至 7 月中旬达到高峰后大幅度下降,在落叶前又有所回升。杂蛋白在叶生长初期迅速下降,至 5 月中旬达到最低值后,基本趋于稳定。推测水溶蛋白、盐溶蛋白和醇溶蛋白、碱溶蛋白与七子花的展叶和开花生理过程有密切关系。

关键词:七子花;叶片;水溶蛋白;盐溶蛋白;醇溶蛋白;碱溶蛋白;杂蛋白

中图分类号:Q946.1

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2007)06-0028-04

万方数据 Dynamic Change of the Content of Protein Components in the Leaves of
Heptacodium miconioides

YANG Bei-fen, LI Jun-min, JIN Ze-xin

(Institute of Ecology, Taizhou University, Linhai, Zhejiang 317000, China)

Abstract: The dynamic changes of the content of 5 protein component in the leaves of *Heptacodium miconioides* during the growth period were analyzed. The results showed that the dynamic change curve of the total protein content in the leaves of *H. miconioides* was just like the letter “W”, i. e., the total protein content at the early stage of growth period was stable and declined with a relatively large extent in the middle of May. It reached to the lowest in the middle ten days of June and increased rapidly to reach a peak in the middle of July (blooming period). Then it declined and the neap was in the middle of August. At last, it ascended and reached another peak at the defoliation period. The seasonal changes of water-soluble protein showed as “low-high-low-high” type. The content of water-soluble protein ascended at the early stage of the growth period. The peak appeared in the middle of May and declined gradually and the neap was in the middle of July. Then it ascended slowly and reached another peak at the defoliation period. The content of salt-soluble protein declined quickly at the early growth stage. It declined and the neap was in the middle of May. Then it ascended all through. The content of ethanol-soluble protein and alkali-soluble protein declined at the early growth stage and the minimal content reached in the middle of June. Then they ascended quickly while the peak reached in the middle of July and declined rapidly. They ascended a little before defoliation. The content of the remnant holdover protein declined at a large extent at the early growth stage and the minimal content reached in the middle of May and then the content was stable. It

收稿日期:2007-01-15 修回日期:2007-06-20

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(399203);台州市科技局资助项目(044205)

作者简介:杨蓓芬(1965-),女,浙江临海人,副教授,主要从事植物学教学与研究工作。

suggested that it was important of the water-soluble protein, salt-soluble protein, ethanol-soluble protein and alkali-soluble protein in the regulation of unwrapping and blooming physiological process.

Key words: *Heptacodium miconioides*; leaves; water-soluble protein; salt-soluble protein; ethanol-soluble protein; alkali-soluble protein; remnant holdover protein

植物蛋白不但在植物的生长发育过程(如展叶、开花)中有重要是调节作用,而且含有比较齐全的人类不可缺少的氨基酸成分^[1]。植物在生长过程中,从环境中吸收氮素,经过同化作用,转化为氨基酸,再合成蛋白质^[2]。

七子花(*Heptacodium miconioides*)是中国特有的珍稀濒危植物,属国家首批二级重点保护植物,先后被列入中国被子植物关键类群中高度濒危种类^[3]和中国生物多样性保护行动计划中优先保护物种^[4]。一些学者曾对七子花的细胞学、群落特征、种群结构与分布格局^[5~7]等进行了研究,对该群落结构、种群动态以及濒危状况有了初步的认识。通过测定七子花生长过程中叶片水溶蛋白、盐溶蛋白、碱溶蛋白、醇溶蛋白和杂蛋白含量的变化趋势,揭示它们与七子花生长与发育的关系,为七子花的保护和开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究地概况

材料采自浙江省临海市的括苍山(20°49'N, 120°55'E),该地属于亚热带湿润季风气候,年平均气温 10.5~12.5℃,年降水量 1 700~2 027 mm,土壤系腐殖质丰富的黄壤土,主峰米筛海拔 1 382.4 m。七子花种群分布于离主峰不远的双夹水坑(海拔 950 m)。该地七子花在 3~4 月开始萌芽、展叶,进入叶片生长季节,6 月底至 8 月为花期,之后叶片逐渐变黄,10 月下旬全部脱落。

1.2 材料

2004 年 4~10 月份,每月中旬采集位置相对固定的七子花叶片。采集时,用湿布包裹,保鲜袋封装,立即带回实验室。将材料洗净,用吸水纸吸干,进行蛋白质组分的提取。

1.3 方法

1.3.1 蛋白质组分的提取^[8] (1) 水溶蛋白的提取。将新鲜叶片剪成小碎片,取 0.2 g 置于研钵中,加 2 mL H₂O 研磨至匀浆。移入离心管中,以 1 mL 水冲洗研钵,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液于另一离心管中,向离心管沉淀中加入 2 mL 水,搅拌 5 min,离心 5 min,并将上清液与上述上清液合并,残渣用以提取盐溶蛋白。再在上清液中加入等

体积丙酮,室温放 0.5 h 后,4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃去上清液,取沉淀,即为水溶蛋白,放入-20℃冰箱中保存,待测定。

(2) 盐溶蛋白的提取。向水溶蛋白提取的残渣中加入 2 mL 10% NaCl 溶液,搅拌 5 min,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液于另一离心管,残渣提取 2 次,将上清液合并,残渣用以提取醇溶蛋白。上清液按水溶蛋白的提取方法进行盐溶蛋白收集,并放入-20℃冰箱中保存,待测定。

(3) 醇溶蛋白的提取。向盐溶蛋白提取的残渣中加入 2 mL 70% 乙醇,搅拌 5 min,混合液放在 80℃ 水中水浴加热 5 min,并随时搅拌。其后,取出离心管,继续搅拌 5 min,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液于另一离心管,残渣提取 2 次,将上清液合并,残渣用以提取碱溶蛋白。上清液按水溶蛋白提取方法进行醇溶蛋白收集,并放入-20℃冰箱中保存,待测定。

(4) 碱溶蛋白与杂蛋白的提取。在醇溶蛋白提取的残渣中加入 2 mL 0.2% NaOH 溶液,搅拌 5 min,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液于另一离心管,残渣提取 2 次,将上清液合并,残渣即为杂蛋白。上清液按水溶蛋白提取的方法进行碱溶蛋白收集,并将碱溶蛋白和杂蛋白放入-20℃冰箱中保存,待测定。

1.3.2 蛋白质组分含量的测定和计算 利用微量凯式定氮法^[9]测定叶片中蛋白质组分的含量。

蛋白质组分含量(占叶片鲜重)计算式为: $C = (V_{2HCl} - V_{1HCl}) \times 0.0108 \times 6.25 \times (\text{消化液总量 (mL)} / \text{测定用消化液量 (mL)}) \times (100/W) \times 0.014 \times \%$,其中,C 为蛋白质组分含量; V_{1HCl} 为滴定对照所用盐酸(mL); V_{2HCl} 为滴定样品所用盐酸(mL);W 为样品重量(g)。

1.3.3 数据处理 每一组分提取和测定均重复 3 次,利用 SPSS 11.5 for Windows 数据处理软件进行含量统计和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 七子花叶片中蛋白质组分含量的季节变化

2.1.1 总蛋白 由图 1 可知,总蛋白含量变化曲线

呈“W”型。从4月中旬至5月中旬,总蛋白含量基本保持稳定,5月中旬至6月中旬(即开花前)其含量一直下降,并且下降幅度较大,到6月中旬达一较低值。之后,其含量迅速上升,到7月中旬(盛花期)达一峰值,接着,其含量下降,到8月中旬达到最低,后又上升直至落叶时为最高。

2.1.2 水溶蛋白 在七子花叶片的整个生长季节中,水溶蛋白含量随叶片的生长而变化。从4月中旬至5月中旬,随着七子花幼叶的逐渐成熟,水溶蛋白含量呈上升趋势,且上升幅度较大,到5月中旬达到最高值。之后,其含量递减,到7月中旬(开花期)降至较低水平,后期缓慢上升,但上升幅度较小。

2.1.3 盐溶蛋白 七子花叶片中盐溶蛋白含量随着季节的变化而出现波动,与水溶蛋白、碱溶蛋白、醇溶蛋白相比,其变化幅度最大,变化规律与水溶蛋白相似,4—5月中旬盐溶蛋白含量上升,5—6月迅速下降,6—8月中旬(花期)基本保持稳定,8月以后,其含量又出现上升趋势,并且上升幅度较大。

2.1.4 碱溶蛋白 七子花叶片中碱溶蛋白含量变化幅度最小。4—5月,其含量上升,7月中旬达到最大值,为1.2%(鲜重)。盛花期后,碱溶蛋白的含量下降,9月中旬达到最低值,之后又缓慢上升。

2.1.5 醇溶蛋白 生长季中,七子花叶片的醇溶蛋白含量的变化规律与碱溶蛋白相似,只是醇溶蛋白的变化幅度较碱溶蛋白稍大。

2.1.6 杂蛋白 生长季中,七子花叶片的杂蛋白含量在5种蛋白组分中最大。4—5月,随叶片的生长其含量迅速下降,达到最低值,下降幅度最大,之后,迅速上升,6月中旬达到峰值。6—8月份,是七子花的花期,杂蛋白含量下降,花谢后又呈上升趋势,直至落叶。

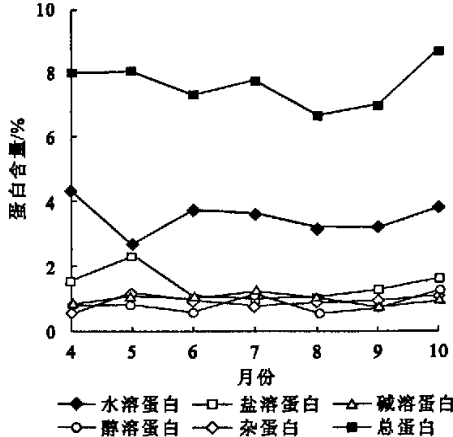


Fig. 1 The season changes of the content of different protein components in the leaves of *H. miconioides*

2.2 七子花叶片各蛋白组分的百分含量动态变化 由图2可知,水溶蛋白、盐溶蛋白、碱溶蛋白和醇溶蛋白的含量在整个生长期有3个高峰,第一高峰在5月(展叶期),第二高峰在7月中旬(盛花期),第三高峰在9月中旬;而相应的杂蛋白含量出现3个低谷。

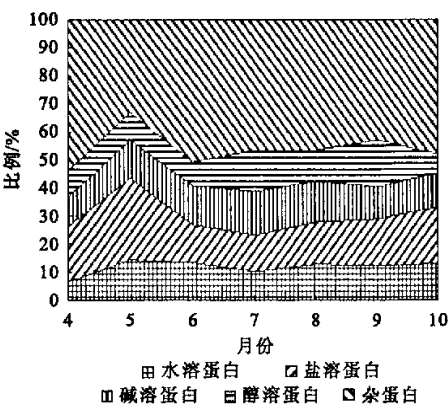


图2 七子花叶片各蛋白组分含量
Fig. 2 The content of different protein components in the leafblades of *H. miconioides*

2.3 七子花叶片各蛋白组分的相关性分析 研究表明(表1),水溶蛋白、盐溶蛋白、碱溶蛋白含量、醇溶蛋白与杂蛋白含量之间均不存在显著的相关性。只有醇溶蛋白含量与总蛋白含量之间存在显著的正相关($r=0.763, P<0.05$)。

表1 七子花叶片中各蛋白组分的相关性
Table 1 The correlations analysis of content of protein in the leaves of *H. miconioides*

	水溶蛋白	盐溶蛋白	碱溶蛋白	醇溶蛋白	杂蛋白	蛋白总量
水溶蛋白	—					
盐溶蛋白	0.425	—				
碱溶蛋白	0.319	-0.113	—			
醇溶蛋白	0.077	0.143	0.297	—		
杂蛋白	-0.695	-0.337	-0.369	0.292	—	
蛋白总量	0.158	0.593	0.041	0.763*	0.346	—

* 表示 0.05 水平上显著相关。

3 结论与讨论

蛋白质是生物体的主要组成部分,作为催化各种生理活动的酶和细胞结构物质的蛋白质,在植物生长发育过程中发挥着重要作用^[10]。植物叶蛋白原料丰富、营养价值高、食用效果好、经济价值高,是一种具有开发价值的新型蛋白质资源^[11]。

七子花叶片总蛋白含量的变化曲线呈“W”型,

叶片生长初期含量基本保持稳定,5月中旬开始直下降,并且下降幅度较大,6月中旬达一低值后,其含量迅速上升,到7月中旬(盛花期)达一峰值后,其含量下降,8月中旬达到最低值,后又上升直至落叶时为最高。叶片总蛋白含量与生长发育过程中结构蛋白的形成及开花落叶时期酶的活动过程有关。在整个生长季中,各种蛋白质组分的动态变化曲线不同;4月份,叶片刚长出不久,叶片薄,细胞体积小,细胞分裂旺盛,需要大量的蛋白质,因而此时叶片中蛋白质含量较高,各蛋白组分含量均较高;4—5月,叶片细胞的体积不断增大,大液泡逐渐形成,因而水溶蛋白、盐溶蛋白、碱溶蛋白的含量均上升,5—6月中旬,只有杂蛋白的含量上升,其他4种蛋白组分均下降,可能是由于此时叶片的生长速度最快,叶面积和厚度增加迅速,水溶蛋白、盐溶蛋白、碱溶蛋白、醇溶蛋白的合成速率小于叶片的生长速率所致,因此,推测杂蛋白可能是叶片组织蛋白的主要成分;6—7月是花初期到花盛期,醇溶、碱溶和总蛋白的含量均出现明显的上升趋势,水溶蛋白和杂蛋白的含量下降,醇溶蛋白含量基本稳定,说明这一时期叶片的蛋白质合成大于分解,是进行蛋白质积累的阶段;7—8月为花盛期到花谢期,叶片中碱溶、醇溶、杂蛋白和总蛋白含量明显下降,尤其是醇溶蛋白含量下降幅度最大,水溶和盐溶蛋白含量略有增加,因而碱溶、醇溶和杂蛋白可能是参与七子花开花过程的主要蛋白组分;9—10月份,叶片逐渐衰老,直至脱落,叶片中除了碱溶蛋白含量在9月略有减少外,其他的4种组分的含量和总蛋白含量均有所增加,可能是因为七子花的叶片在9月份开始变黄,叶片含水量不断减少的缘故。

从蛋白各组分占总蛋白的百分含量可以看出,水溶蛋白与盐溶蛋白可能与七子花的展叶过程有着

密切的关系,而醇溶蛋白与碱溶蛋白则可能与开花的生理过程关系密切。醇水溶蛋白与盐溶蛋白可能为功能性蛋白,而醇溶蛋白与碱溶蛋白可能为贮藏蛋白。七子花叶片中5种蛋白组分含量之间不存在显著相关性,说明它们的合成途径和中间代谢产物均存在较大的差异;醇溶蛋白与总蛋白之间存在显著的相关性,推测叶片的醇溶蛋白可能在蛋白质的合成和分解过程中起调节作用。关于七子花叶片中这5种蛋白组分的组成成分、合成和运输途径、分子结构有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 蔡华珍,张凤宽,刘各省.我国植物蛋白质资源开发与利用初探[J].吉林农业大学学报,2000,22(1):102-106.
- [2] Boggio S B, Palatnik J F, Heldt W, et al. Changes in amino acid composition and nitrogen metabolizing enzymes in ripening fruits of *Lycopersicon esculentum* Mill[J]. Plant Science, 2000, 159: 125-133.
- [3] 陈灵芝.中国的生物多样性现状及其保护对策[M].北京:科学出版社,1993:47-53.
- [4] 中国生物多样性保护行动计划总报告编写组.中国生物多样性保护行动计划[M].北京:中国环境出版社,1994:75-80.
- [5] 张朝阳,顾志建,岳中枢.七子花的细胞学研究[J].云南植物研究,2000,22(4):428-430.
- [6] 金则新.浙江天台山七子花群落研究[J].生态学报,1998,18(2):127-132.
- [7] 金则新.浙江天台山七子花种群结构与分布格局研究[J].生态学杂志,1997,16(4):15-19.
- [8] 张志良,瞿伟菁.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2003:162-163.
- [9] 王秀奇,秦淑媛.基础生物化学实验[M].第2版.北京:高等教育出版社,1999:113-122.
- [10] 金则新,李钧敏,钟章成,等.大血藤叶片生化成分的动态变化[J].武汉植物学研究,2002,20(4):303-307.
- [11] 程道梅.大有开发价值的蛋白质新资源——植物叶蛋白[J].资源开发与市场,2000,16(1):17-18.