

## 氯化镁预处理对美人蕉根部质膜 $H^+$ -ATPase 活性与农田废水硝态氮吸收效率的影响

刘 昂<sup>1</sup>, 吴文卫<sup>2</sup>, 赵 磊<sup>2</sup>, 陈 奇<sup>1</sup>, 白晓华<sup>2</sup>, 陈丽梅<sup>1\*</sup>

(1 昆明理工大学 生命科学与技术学院 生物工程技术研究中心, 昆明 650500; 2 云南省环境科学研究院, 昆明 650034)

**摘 要:**以湿地挺水植物七叶红色大花美人蕉(*Canna generalis* Bailey)幼苗为实验材料,在温室中用 150  $\mu\text{mol/L}$  氯化镁溶液预处理 12 h,然后置于硝态氮( $\text{NO}_3^-$ -N)浓度为 10 mg/L 的农田废水中处理,考察氯化镁预处理对美人蕉吸收农田废水中硝态氮效率的影响,以及处理期间根部质膜  $H^+$ -ATPase 活性、 $H^+$ -泵活性、14-3-3 蛋白与质膜  $H^+$ -ATPase 相互作用。结果显示:经过 150  $\mu\text{mol/L}$  氯化镁溶液预处理 12 h 后,美人蕉吸收农田废水中硝态氮的效率比对照增加 11%;与没有预处理的植株相比,氯化镁预处理美人蕉根中质膜  $H^+$ -ATPase 和  $H^+$ -泵的活性均显著提高,质膜  $H^+$ -ATPase 和 14-3-3 蛋白的相互作用显著增强。研究表明,氯化镁能够通过增强质膜  $H^+$ -ATPase 与 14-3-3 蛋白的相互作用来提高质膜  $H^+$ -ATPase 的活性,从而增加美人蕉对硝态氮的吸收效率。

**关键词:**美人蕉;氯化镁;农田废水;硝态氮;质膜  $H^+$ -ATPase

中图分类号:Q945.79;Q948.116

文献标志码:A

## Effects of Magnesium Chloride Pretreatment on the Plasma Membrane $H^+$ -ATPase Activity and Nitrate Absorption Efficiency of *Canna generalis* in Farmland Wastewater

LIU Ang<sup>1</sup>, WU Wenwei<sup>2</sup>, ZHAO Lei<sup>2</sup>, CHEN Qi<sup>1</sup>, BAI Xiaohua<sup>2</sup>, CHEN Limei<sup>1\*</sup>

(1 Biotechnology Research Center, College of Life Science and Technology, Chenggong Campus, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2 Yunnan Environmental Science Institute, Kunming 650034, China)

**Abstract:** In this study, the seedlings of the wetland emergent plant, *Canna generalis* Bailey, were used as the experimental materials. Pretreatment of the seedlings with 150  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MgCl}_2$  was conducted under the greenhouse conditions for 12 h. Subsequently, treatment of the seedlings with farmland wastewater containing 10 mg/L nitrate ( $\text{NO}_3^-$ -N) was performed to investigate the effects of  $\text{MgCl}_2$  pretreatment on the nitrate absorption efficiency, the plasma membrane  $H^+$ -ATPase and  $H^+$  pump activities and the interaction of plasma membrane  $H^+$ -ATPase and 14-3-3 protein of *C. generalis* in farmland wastewater. The results showed that pretreatment of 150  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MgCl}_2$  for 12 h increased the nitrate absorption efficiency of *C. generalis* Bailey in farmland wastewater by 11%. Compared with those in the roots of the plants without  $\text{MgCl}_2$  pretreatment, both the plasma membrane  $H^+$ -ATPase and  $H^+$  pump activities in *C. generalis* roots with  $\text{MgCl}_2$  pretreatment were significantly elevated.  $\text{MgCl}_2$  pretreatment also enhanced plasma membrane  $H^+$ -ATPase and 14-3-3 protein interaction in *C. generalis* roots. These results suggested that  $\text{MgCl}_2$  pretreatment increased the Plasma membrane  $H^+$ -ATPase activity by enhancing its interaction with 14-3-3

收稿日期: 2013-11-02; 修改稿收到日期: 2013-12-04

基金项目: 云南省科技计划(社会事业发展专项 2010CA001)

作者简介: 刘 昂(1987—), 男, 在读硕士研究生, 从事植物代谢途径基因工程方面的研究。E-mail: 362239599@qq.com

\* 通信作者: 陈丽梅, 博士, 教授, 主要从事植物代谢途径基因工程方面的研究。E-mail: chenlimeikm@126.com

protein, thereby increasing the nitrate absorption efficiency of *C. generalis* in farmland wastewater.

**Key words:** *Canna generalis*;  $MgCl_2$ ; farmland wastewater; nitrate; plasma membrane  $H^+$ -ATPase

硝态氮是植物根系吸收氮素最主要的形态之一,所有的植物都能吸收和利用硝态氮<sup>[1]</sup>。很多研究发现,植物对根际环境中硝态氮的浓度非常敏感,为了适应土壤中高度可变的硝态氮浓度,植物在进化过程中形成了两种硝态氮转运体系——硝态氮高效转运体系(HATS)和低效转运体系(LATS)<sup>[2-5]</sup>。当外部环境中硝态氮的浓度较高( $>1\text{ mmol/L}$ )时,优先使用 LATS;当硝态氮的可用性受到限制时, HATS 被活化并接管硝态氮的吸收过程<sup>[2,4]</sup>。在这两种机制中  $NO_3^-$  都是在 2 个  $H^+$  陪伴下以主动运输方式被植物吸收,与细胞膜上的  $H^+$ -ATPase 相偶联,需要细胞质膜上的  $H^+$ -ATPase 提供质子和能量<sup>[6]</sup>。植物细胞质膜上的  $H^+$ -ATPase 通过水解 ATP 产生能量,将细胞质中的  $H^+$  泵出细胞,在细胞膜两侧产生  $H^+$  浓度梯度和电化学势,从而激活一系列次级离子及代谢产物的运载蛋白,完成物质的吸收和转运<sup>[7-10]</sup>。狄廷均等<sup>[1]</sup>的研究发现,水稻根系在供应硝态氮的情况下,根系细胞膜上  $H^+$ -ATPase 的活性增加。Santi 等<sup>[11]</sup>报道,施加硝态氮可以诱导玉米根系中 2 个  $H^+$ -ATPase 同工酶基因 *MHA3* 和 *MHA4* 的表达,引起根中质膜  $H^+$ -ATPase 水解活性增强。在被动转运过程中,离子通过特异性通道的转运也依赖于质子的电化学梯度。有关研究表明,在物质转运量较多的植物细胞中,特别是一些与营养物质吸收有关的细胞中,如核桃的导管伴细胞<sup>[12]</sup>和根表皮细胞<sup>[13]</sup>等,含有丰富的质膜  $H^+$ -ATPase。可见,硝态氮的吸收与细胞膜上  $H^+$ -ATPase 活性密切相关,质膜  $H^+$ -ATPase 在植物细胞的物质跨膜次级转运过程中发挥着重要的作用。 $H^+$ -ATPase 活性大小直接影响到植物对营养物质的吸收。

质膜  $H^+$ -ATPase 以二聚体形式存在,单体的分子量约为 100 kD,具有水解 ATP 的活性。质膜  $H^+$ -ATPase 单体是由 10 个跨膜区域组成的跨膜蛋白,包括磷酸酶结构域、转导结构域和蛋白激酶结构域 3 个区域,其 N 末端位于膜内侧,是质子入口,中间有一个大的胞质环亲水区域也在质膜内侧,能与底物结合,C 末端的 6 个螺旋构成的环状质子通道是自抑制区(auto-inhibition domain),调控酶的活性<sup>[14]</sup>。用胰蛋白酶将 C 末端水解掉或用分子生物学的方法在基因水平上将 C 末端的核苷酸序列去

除后,酶的活性都会增强<sup>[15-16]</sup>。14-3-3 蛋白是一个高度保守的具有多种调节功能的蛋白质,近来大量研究结果表明,14-3-3 蛋白对植物质膜  $H^+$ -ATPase 的活性有重要的调控作用。质膜  $H^+$ -ATPase 是 14-3-3 蛋白在质膜上的主要结合靶点<sup>[17]</sup>,14-3-3 通过与质膜  $H^+$ -ATPase 的结合增加其活性。镁是植物生长所需的一种营养元素,参与植物体内很多重要的生命过程<sup>[18]</sup>。最近的研究发现,镁离子可以通过与 14-3-3 蛋白的第 8 个环结合,增强 14-3-3 与质膜  $H^+$ -ATPase 的相互作用从而调节其活性<sup>[19]</sup>。Hanstein 等<sup>[20]</sup>最近报道,质膜  $H^+$ -ATPase 的活性与细胞内镁离子浓度呈正相关。Garufi 等<sup>[21]</sup>在玉米中也证实,镁离子可以调节 14-3-3 蛋白与质膜  $H^+$ -ATPase 的相互作用。

美人蕉(*Canna generalis* Bailey)为美人蕉科球茎类花卉植物,多年生直立草本,喜高温和阳光,开花期长,适应性强,具有较高的观赏价值。近年来随着人工湿地处理污水技术的发展,人们对多种常见植物净化废水能力的研究表明,美人蕉根系比较发达,对污水中总氮(TN)、总磷(TP)、化学需氧量(COD)的去除效果较好,已经成为富营养化水体治理的常用人工湿地植物<sup>[22]</sup>。目前对美人蕉的研究主要集中在繁育及对水体污染的修复效果等方面,关于其对废水中  $NO_3^-$  吸收的机理还未见报道<sup>[23]</sup>。设施农业由于追求高产高效益,在生产过程中往往过度施用氮肥,为了降低过度施肥对土壤的影响,生产过程结束后经常用水浸泡土壤,由此产生大量的废水(农田废水)直接排入河流和湖泊而致使水体富营养化。本研究用镁离子预处理美人蕉,考察镁离子预处理对美人蕉吸收农田废水中  $NO_3^-$  效率的影响,同时分析镁离子预处理对美人蕉根中质膜  $H^+$ -ATPase 活性、 $H^+$ -泵的活性、14-3-3 蛋白与质膜  $H^+$ -ATPase 相互作用的影响,探讨镁离子影响美人蕉吸收农田废水中硝态氮效率的机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料培养与处理

供试植物为七叶红色大花美人蕉(*Canna generalis* Bailey)。在湿地土壤中培养至株高 30~40 cm 时挖出,放在自来水中水培,每隔 2 d 换 1 次水,培养 30 d 左右至新根长成后进行实验处理。农田

废水取自云南省玉溪市通海县杞麓湖北岸农田蔬菜种植区,废水中硝态氮的含量为 3.34 mg/L。通过预实验发现氯化镁预处理美人蕉对硝态氮浓度为 10 mg/L 的废水清除吸收效果最好,因此在废水中添加适量硝酸钾使废水硝态氮浓度为 10 mg/L,用于本研究的后续实验。

预实验结果表明,150  $\mu\text{mol/L}$  氯化镁预处理 12 h 条件下实验结果比较理想。在本实验过程中,选取长势大小一致的美人蕉植株分为 2 组,其中一组用 150  $\mu\text{mol/L}$  的氯化镁预处理 12 h(YC),然后放入体积为 3 L 硝态氮浓度为 10 mg/L 的农田废水中培养 6、12、24 h;另一组不经过氯化镁预处理的美人蕉植株作为对照(CK),也在相同体积的农田废水中处理 6、12、24 h。在相应的处理时间点取适量废水用于硝态氮浓度的测定,同时收集美人蕉的根用液氮冷冻后保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中,用于质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 活性、 $\text{H}^{+}$ -泵活性、14-3-3 蛋白与质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 相互作用的测定。

## 1.2 测定指标及方法

**1.2.1 硝态氮去除和吸收效率** 农田废水中硝态氮的浓度测定根据中华人民共和国环境保护行业标准(HJ/T 346-2007)中的紫外分光光度法略作修改。取 YC 和 CK 美人蕉处理 6、12、24 h 的农田废水水样 5 mL,加入 1~2 滴氢氧化铝悬浮液,静置絮凝,离心后上清液用于硝态氮浓度测定。测定时用光程长为 10 mm 的石英比色皿,以新鲜去离子水为参比,分别在 220 nm 和 275 nm 波长处检测吸光度值  $A_{220}$  和  $A_{275}$ ,硝态氮吸光度的校正值为  $A_{220}-2A_{275}$ ,从标准曲线中查得硝态氮浓度。以处理溶液起始的浓度为 100%,减去废水中剩余硝态氮所占的百分比,即为美人蕉吸收废水中硝态氮效率。

**1.2.2 质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 及  $\text{H}^{+}$ -泵活性** 参照 Shen 等<sup>[24]</sup>的方法提取美人蕉根的质膜蛋白,使用 Bradford 比色法测定质膜蛋白的浓度,然后参照 Guo 等<sup>[25]</sup>的方法检测质膜蛋白的纯度并测定质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 的活性。质膜  $\text{H}^{+}$ -泵活性的测定参照 Yan 等<sup>[26]</sup>的方法。

**1.2.3 质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 与 14-3-3 蛋白相互作用水平** 根据作者关于美人蕉转录组分析的结果,对其质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 和 14-3-3 蛋白的氨基酸序列进行比对分析,参照 Guo 等<sup>[25]</sup>的方法,用免疫共沉淀(Co-IP)技术分析质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 与 14-3-3 蛋白在美人蕉根根中的相互作用。在 Co-IP 分析中,加入有磷酸化修饰的蚕豆质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase (VHA2p)C 末端

多肽[N'-ESVVKLKGLDIDTIQQHYT(p)V-C']制备的多克隆抗体(兔抗)沉淀与质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 结合的蛋白,用 4%浓缩胶和 10%分离胶做 SDS-PAGE 电泳分离沉淀下来的蛋白。经过电转 PVDF 膜后,使用大豆 14-3-3 蛋白(兔抗)或 VHA2p 抗体作为一抗进行 Western blot 分析,加入二抗后用 ECL 试剂盒显影观察结果。用图像分析软件 ImageJ 对 Western blot 的信号进行相对定量分析。

## 1.3 数据分析

所有生理生化指标分析均进行 3 次生物学重复。用 Excel 计算平均值及误差,用 DPS 数据处理系统对所得数据进行显著性差异分析( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 氯化镁预处理对美人蕉去除农田废水硝态氮效率的影响

图 1 结果表明,随着处理时间的延长,氯化镁预处理(YC)和对照(CK)培养钵中农田废水的硝态氮浓度均逐渐降低。其中,在前 6 h 农田废水中硝态氮的浓度下降最迅速,YC 和 CK 废水中硝态氮的浓度分别下降为 4.34 和 5.43 mg/L,去除量分别为初始值的 56.6%和 45.7%;在培养 6~24 h 期间,美人蕉对硝态氮的去除效果明显下降,YC 和 CK 培养钵中农田废水硝态氮的最终浓度分别下降为 1.12

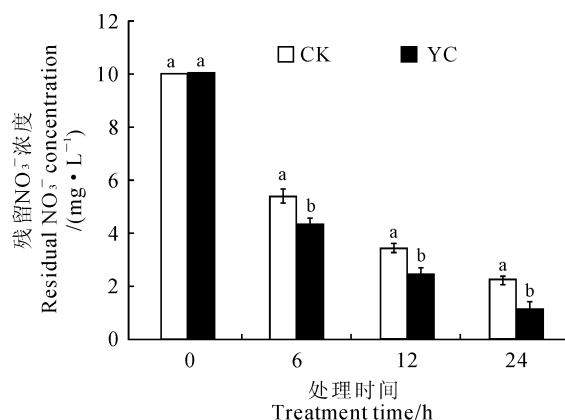


图 1 氯化镁预处理(YC)和对照(CK)美人蕉去除农田废水硝态氮的效果比较

不同字母代表同期处理与对照间在 0.05 水平显著性差异;棒线表示标准差( $n=3$ )

Fig. 1 The removal efficiency of nitrate from farm wastewater by the *C. generalis* with (YC) and without (CK)  $\text{MgCl}_2$  pretreatment

The different letters on the figure indicate significant difference between treatment and control at 0.05 level; The bar line on the map shows the standard deviation( $n=3$ )

和 2.21 mg/L,期间去除量均为初始值的 32.2%;处理结束时,YC 和 CK 美人蕉对农田废水硝态氮的去除率分别为 88.8%和 77.9%。YC 与 CK 比较而言,每个取样时期 YC 处理农田废水中剩余硝态氮的浓度都显著低于 CK。说明氯化镁预处理和对照美人蕉对农田废水中硝态氮都有很好的去除效果,并在处理前期(0~6 h)去除效率很高,而在后期(6~24 h)明显降低;氯化镁预处理能够增强美人蕉对农田废水中硝态氮的去除效果和效率。

## 2.2 氯化镁预处理对美人蕉根中质膜 $H^+$ -ATPase 和 $H^+$ -泵活性影响

### 2.2.1 $H^+$ -ATPase 活性

很多研究表明植物体内物质的跨膜运输与质膜  $H^+$ -ATPase 的活性相关,上述研究结果证实氯化镁预处理可以提高美人蕉吸收废水中硝态氮的效率,为进一步了解氯化镁预处理提高美人蕉吸收废水中硝态氮的效率是否与根部质膜  $H^+$ -ATPase 活性的变化有关,试验又检测了 YC 和 CK 美人蕉根中质膜  $H^+$ -ATPase 的活性变化。图 2,A 结果表明,CK 和 YC 美人蕉根部质膜  $H^+$ -ATPase 的活性均随着在农田废水中培养时间的延长而逐渐增加,且各处理时间点均显著高于培养处理前,YC 始终显著高于同期对照(CK)。其中,CK 和 YC 美人蕉根部质膜  $H^+$ -ATPase 的活性在农田废水处理前(0 h)分别为 1.81 和 2.14  $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,YC 美人蕉根部质膜  $H^+$ -ATPase 的活性是 CK 美人蕉的 1.18 倍,但其间差异没有达

到显著水平( $P>0.05$ ),说明氯化镁预处理在一定程度上提高了美人蕉根部质膜  $H^+$ -ATPase 的活性。在农田废水中处理 24 h 后,CK 和 YC 美人蕉根部质膜  $H^+$ -ATPase 的活性分别上升为 2.94 和 3.56  $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,分别比农田废水处理前(0 h)显著提高 62.4%和 66.4%,即 YC 质膜  $H^+$ -ATPase 活性随处理时间的延长上升的幅度更大。可见,农田废水能显著诱导美人蕉根部质膜  $H^+$ -ATPase 活性的提高,且氯化镁预处理能显著增强这种诱导作用。

### 2.2.2 质膜 $H^+$ -泵活性

质膜  $H^+$ -ATPase 活性的升高最直观明显的作用效果就是激活  $H^+$ -泵活性,促进  $H^+$ 从胞内分泌到细胞外,产生质子的电势能够为植物代谢次级产物提供动力。为了解氯化镁预处理对美人蕉根部质膜  $H^+$ -泵活性的影响,我们进一步分析了 YC 和 CK 美人蕉根中  $H^+$ -泵活性。图 2,B 结果表明,YC 美人蕉和 CK 美人蕉根中  $H^+$ -泵活性的变化趋势与质膜  $H^+$ -ATPase 活性的变化相似,在没有进行农田废水处理前(0 h),YC 美人蕉根中  $H^+$ -泵的活性比 CK 高约 16%,说明氯化镁的预处理也显著增加了美人蕉根部  $H^+$ -泵活性。放入农田废水中处理后,YC 和 CK 美人蕉根中  $H^+$ -泵的活性均随处理时间的延长而升高,在 24 h 时达到最大值,约为未处理前(0 h)的 1.4 倍;但在各个时间点 YC 美人蕉根中  $H^+$ -泵的活性都要显著大于 CK,在 24 h 时 YC 美人蕉根中  $H^+$ -

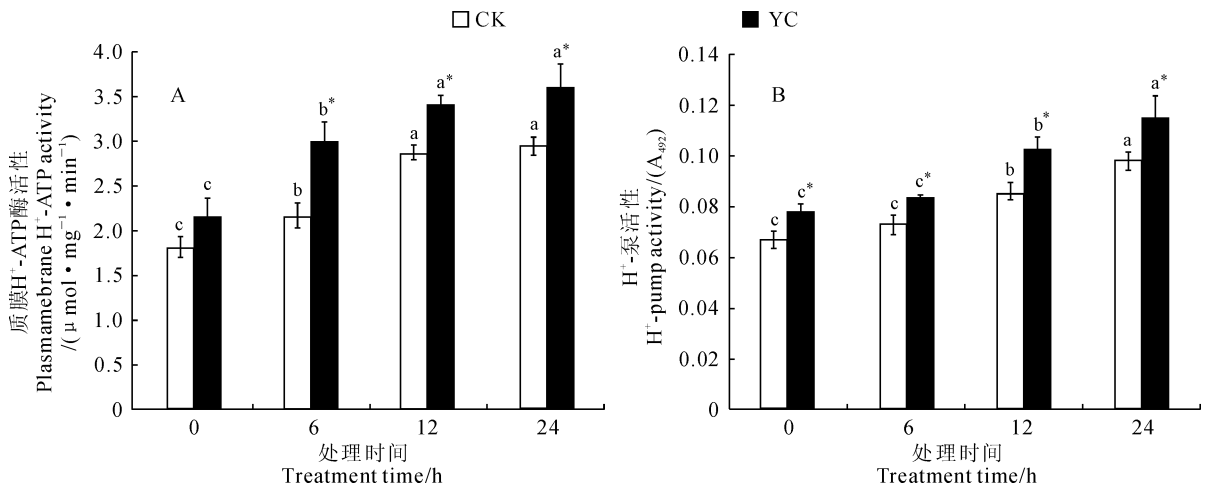


图 2 农田废水处理 YC 和 CK 美人蕉根中质膜  $H^+$ -ATPase 活性(A)和  $H^+$ -泵活性(B)

不同小写字母表示处理间在 0.05 水平显著性差异,而 \* 表示同期 YC 与 CK 间在 0.05 水平显著性差异

Fig.2 Plasma membrane (PM)  $H^+$ -ATPase activity (A) and  $H^+$  pumping activity (B) in the roots of YC and CK of *C. generalis* treated with farmland wastewater

The different normal letters in the same treatment indicate significant difference among treatment time at 0.05 level, while the \* indicate significant difference between YC and CK during the same time at 0.05 level

泵活性约为同期 CK 的 1.2 倍。这同样说明农田废水诱导增强了美人蕉根部  $H^+$ -ATPase 的活性,氯化镁预处理进一步促进了这种诱导作用。

### 2.3 氯化镁预处理对美人蕉根中质膜 $H^+$ -ATPase 与 14-3-3 蛋白互作水平的影响

质膜  $H^+$ -ATPase 与 14-3-3 蛋白的结合可以激活质膜  $H^+$ -ATPase 的活性,为了解氯化镁预处理

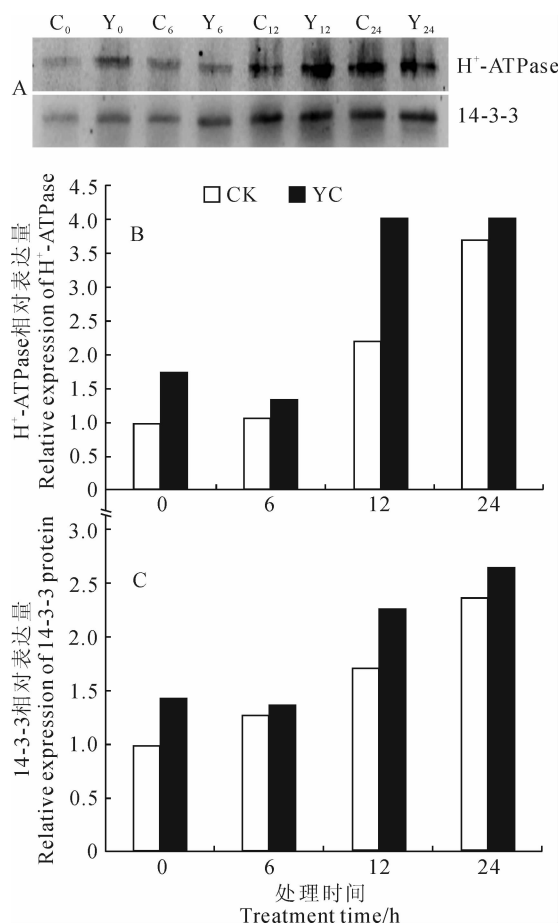


图3 农田废水环境下YC和CK美人蕉根质膜  $H^+$ -ATPase 与 14-3-3 蛋白相互作用的 Co-IP 分析  
A. 质膜  $H^+$ -ATPase 和 14-3-3 蛋白的相互作用;C 和 Y 分别表示对照和氯化镁预处理;0、6、12、24 分别表示处理 0、6、12、24 h;  
B. 与 14-3-3 蛋白结合的质膜  $H^+$ -ATPase 蛋白的相对定量;  
C. 与质膜  $H^+$ -ATPase 结合的 14-3-3 蛋白的相对定量

Fig. 3 The interaction of PM  $H^+$ -ATPase and 14-3-3 proteins in roots of YC and CK of *C. generalis* cultured under farmland wastewater condition with

Co-immunoprecipitation (Co-IP) analysis

A. The interaction between PM  $H^+$ -ATPase and 14-3-3 proteins;C and Y stand for CK and YC;0,6,12 and 24 stand for *C. generalis* treated in farmland wastewater for 0,2,6,12 or 24 h;B. The relative quantification of PM  $H^+$ -ATPase that bound 14-3-3 protein;C. The relative quantification of 14-3-3 protein that bound PM  $H^+$ -ATPase

是否增加质膜  $H^+$ -ATPase 与 14-3-3 蛋白的结合能力,我们提取 YC 和 CK 美人蕉的质膜蛋白,做了免疫共沉淀(Co-IP)实验检测(图 3,A)并通过软件对质膜  $H^+$ -ATPase 蛋白的相对表达量进行分析。结果表明,在农田废水处理前(0 h),YC 美人蕉根中沉淀出来质膜  $H^+$ -ATPase 的量是 CK 的 1.71 倍(图 3,B),与质膜  $H^+$ -ATPase 结合的 14-3-3 蛋白的量约是 CK 的 1.42 倍(图 3,C),说明氯化镁预处理增强了 YC 美人蕉根部质膜  $H^+$ -ATPase 与 14-3-3 蛋白的相互作用。放入农田废水中处理后,YC 和 CK 美人蕉根中沉淀出来的质膜  $H^+$ -ATPase 量显著增加(图 3,B),与质膜  $H^+$ -ATPase 结合的 14-3-3 蛋白量也明显增多(图 3,C),说明质膜  $H^+$ -ATPase 与 14-3-3 蛋白的相互作用显著增强,但 YC 美人蕉根中质膜  $H^+$ -ATPase 与 14-3-3 蛋白的相互作用增强的程度更大,YC 美人蕉根中与质膜  $H^+$ -ATPase 结合的 14-3-3 蛋白量大约是 CK 的 1.3 倍。YC 和 CK 比较而言,每个取样时期 YC 处理农田废水中美人蕉根部质膜  $H^+$ -ATPase 与 14-3-3 蛋白的表达量都高于 CK。说明氯化镁预处理显著提高了美人蕉根部质膜  $H^+$ -ATPase 与 14-3-3 蛋白的结合能力。

### 3 讨论

根细胞对硝态氮的吸收是植物氮代谢过程中的重要一步,在生理和分子方面得到广泛研究。在硝态氮的吸收阶段,由细胞膜  $H^+$ -ATPase 提供能量的  $H^+/NO_3^-$  共转运是目前公认的  $NO_3^-$  跨膜运输方式<sup>[27]</sup>。物质逆浓度梯度的跨膜转运是一个耗能过程,但植物细胞不能直接利用 ATP 水解产生的能量来促进物质逆浓度梯度跨质膜转运。质膜  $H^+$ -ATPase 是质子泵,能够水解并利用 ATP 产生的能量将细胞质膜内侧的  $H^+$  泵出到质膜外侧,由此能够产生跨膜 pH 梯度和跨膜电势梯度。此电化学梯度为物质跨膜转运提供驱动力,促进各种营养物质、离子等的跨膜转运。有研究表明,二价阳离子能够通过与 14-3-3 蛋白的第 8 个环(loop 8)结合,增强 14-3-3 蛋白与靶蛋白的相互作用从而调节其活性。菠菜中  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  均能够增加 14-3-3 蛋白与磷酸化的硝酸还原酶(NR)结合而降低 NR 的活性<sup>[19]</sup>。玉米中精胺和  $Mg^{2+}$  可以调节 14-3-3 蛋白与质膜  $H^+$ -ATPase 的相互作用<sup>[21]</sup>,从而调节质膜  $H^+$ -ATPase 的活性。有研究发现,一些二价阳离子如  $Mg^{2+}$  可以启动质膜  $H^+$ -ATPase 的质子转运<sup>[28]</sup>,质膜  $H^+$ -ATPase 的活性依赖于  $Mg^{2+}$ ,

并随  $Mg^{2+}$  浓度的增加而增加<sup>[29]</sup>,即  $Mg^{2+}$  对质膜  $H^+$ -ATPase 的活性具有一定的调控作用。本研究也证实氯化镁预处理能够增强美人蕉根中质膜  $H^+$ -ATPase 的活性、 $H^+$ -泵活性及 14-3-3 蛋白与质膜  $H^+$ -ATPase 的相互作用,与这些研究结论一致。此外,本研究中氯化镁预处理还显著增加美人蕉对农田废水中硝态氮的吸收效率。这些研究结果说明美人蕉吸收废水硝态氮时也需要质膜  $H^+$ -ATPase 的泵  $H^+$  作用。除此之外, $Mg^{2+}$  也可能对其它参与硝态氮转运的蛋白产生影响,但有关硝态氮吸收的现有研究表明,两种硝态氮转运体系中的硝态氮转运蛋白的活性仅受糖类、氨基酸、生长素以及光合产物等因素的影响<sup>[30]</sup>,还没有  $Mg^{2+}$  影响硝态氮转运蛋白活性的报道。由此推测,可能氯化镁对硝态氮转运蛋白的影响较小。根据这些研究结果可以推测氯化镁预处理是通过增强美人蕉根中 14-3-3 蛋白与质膜  $H^+$ -ATPase 的相互作用来增加质膜  $H^+$ -ATPase 的活性和泵  $H^+$  作用,进而提高美人蕉对废水中硝态氮的吸收效率。

本研究还发现未经氯化镁预处理的美人蕉放入农田废水后质膜  $H^+$ -ATPase 的活性和  $H^+$ -泵活性

及 14-3-3 蛋白与质膜  $H^+$ -ATPase 的相互作用也显著增强。此外,氯化镁预处理的美人蕉放入农田废水后质膜  $H^+$ -ATPase 的活性和  $H^+$ -泵活性及 14-3-3 蛋白与质膜  $H^+$ -ATPase 的相互作用也进一步增强。这一现象不难理解,因为越来越多的研究发现,对质膜  $H^+$ -ATPase 活性的调控可以发生在转录、翻译及翻译后水平上<sup>[15]</sup>。在非生物胁迫条件下,如果需要更大的运输活性时,质膜  $H^+$ -ATPase 蛋白的表达量会增加<sup>[31]</sup>。Sperandio 等<sup>[32]</sup>的研究发现水稻经过氮饥饿后重新提供硝态氮会显著诱导根中某些质膜  $H^+$ -ATPase 基因的转录。由于本研究使用的美人蕉幼苗在进行废水处理前均养在自来水中,氯化镁预处理也在自来水中进行,这种条件等同于美人蕉幼苗经过氮饥饿处理,放到农田废水中处理后由于废水中存在较高浓度的硝态氮,对美人蕉根中质膜  $H^+$ -ATPase 蛋白的表达可能产生了显著的诱导作用,从而使质膜  $H^+$ -ATPase 的活性、 $H^+$ -泵活性及 14-3-3 蛋白与质膜  $H^+$ -ATPase 的相互作用进一步增强,这也说明美人蕉对废水中硝态氮的吸收需大量  $H^+$  的跨膜运输。

## 参考文献:

- [1] DI T J(狄廷均),ZHU Y Y(朱毅勇),QIU M H(仇美华),*et al.* Response of plasma membrane  $H^+$ -ATPase of rice root to ammonium and nitrate nutrition[J]. *Chinese Journal of Rice Science*(中国水稻科学),2007,**21**(4):360—366(in Chinese).
- [2] GLASS A D,SHAFF J,KOCHIAN L. Studies of the uptake of nitrate in Barley[J]. *Plant Physiology*,1992,**99**(2):456—463.
- [3] CRAWFORD N. Nitrate:nutrient and signal for plant growth[J]. *The Plant Cell*,1995,**7**(7):859—868.
- [4] CRAWFORD N,CLASS A. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants[J]. *Trends in Plant Science*,1998,**3**(10):389—395.
- [5] FORDE B G. Nitrate transporters in plants:Structure, function and regulation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*,2000,**1465**(1—2):219—235.
- [6] MILLER A G,SMIH S J. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells[J]. *Journal of Experimental Botany*,1996,**47**(7):843—854.
- [7] SERRANO R. Structure and function of plasma membrane ATPase[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*,1989,**40**:61—94.
- [8] SUSSMAN M R. Molecular analysis of proteins in plant plasma membrane[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*,1994,**45**:211—234.
- [9] MICHELET B,BOUTRY M. The plasma membrane  $H^+$ -ATPase:A highly regulated enzyme with multiple physiological functions[J]. *Plant Physiology*,1995,**108**(1):1—6.
- [10] PALMGREN M G. Proton gradients and plant growth:Role of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase[J]. *Advances in Botanical Research*,1998,**28**:1—70.
- [11] SANTI S,LOCCI G,MONTE R,*et al.* Induction of nitrate uptake in maize root:Expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane  $H^+$ -ATPase isoforms[J]. *Journal of Experimental Botany*,2003,**54**(389):1 851—1 864.
- [12] ALVES G,AMEGLIO T,GUILLIOT A,*et al.* Winter variation in xylem sap pH of walnut trees:involvement of plasma membrane  $H^+$ -ATPase of vesicle associated cells[J]. *Tree Physiology*,2004,**24**(1):99—105.
- [13] PAREST-SOLER A,PARDO J M,SERRANO R. Immunocytolocalization of plasma membrane  $H^+$ -ATPase[J]. *Plant Physiology*,

- 1990, **93**(4):1 654—1 658.
- [14] LIU N G(刘尼哥), WANG ZH Y(王占义), YANG C Y(杨存义), *et al.* Plasma membrane  $H^+$ -ATPase and environmental stress[J]. *Journal of Tropical and Subtropical*(热带亚热带植物学报), 2006, **14**(3):263—268(in Chinese).
- [15] YANG Y L(杨颖丽), YANG N(杨 宁), AN L ZH(安黎哲), *et al.* Research advances about plasmalemma  $H^+$ -ATPase in plants[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2006, **16**(11):2 388—2 396(in Chinese).
- [16] GEVAUDANT F, DUBY G, STEDINGK E, *et al.* Expression of a constitutively activated plasma membrane  $H^+$ -ATPase alters plant development and increases salt tolerance[J]. *Plant Physiology*, 2007, **144**(4):1 763—1 776.
- [17] ALSTERJORD M, SEHNKE P C, ARKELL A, *et al.* Plasma membrane  $H^+$ -ATPase and 14-3-3 isoforms of *Arabidopsis* leaves: evidence for isoform specificity in the 14-3-3/ $H^+$ -ATPase interaction[J]. *Plant Cell Physiol.*, 2004, **45**(9):1 202—1 210.
- [18] BOSE J, BABOURINA O, RENGEL Z. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plant[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, **62**(7):2 251—2 264.
- [19] ATHWAL G S, HUBER S C, HUBER J L. Biological significance of divalent metal ion binding to 14-3-3 proteins in relationship to nitrate reductase inactivation[J]. *Plant Cell Physiol.*, 1998, **39**(10):1 065—1 072.
- [20] HANSTEIN S, Wang X, QIAN X, *et al.* Changes in cytosolic  $Mg^{2+}$  levels can regulate the activity of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase in maize[J]. *The Biochemical Journal*, 2011, **435**(1):93—101.
- [21] GARUFI A, VISCONTI S, CAMONI L, *et al.* Polyamines as physiological regulators of 14-3-3 interaction with the plant plasma membrane  $H^+$ -ATPase[J]. *Plant Cell Physiol.*, 2007, **48**(3):434—440.
- [22] CAO Y M(曹优明). Canna Artificial for urban wastewater treatment[J]. *Environmental Science and Technology*(环境科学技术), 2009, **32**(7):120—124(in Chinese).
- [23] ZHANG CH X(张呈祥), CHEN W F(陈为峰). Stress responses of *Canna indica* to Cd and its accumulation of Cd[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*(植物生态学报), 2012, **36**(7):692—696(in Chinese).
- [24] SHEN H, HE L F, SASAKI T, *et al.* Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane  $H^+$ -ATPase[J]. *Plant Physiology*, 2005, **138**(1):287—296.
- [25] GUO C L, CHEN Q, ZHAO X L, *et al.* Al-enhanced expression and interaction of 14-3-3 protein and plasma membrane  $H^+$ -ATPase is related to Al-induced citrate secretion in an Al-resistant black soybean[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, **31**:1 012—1 024.
- [26] YAN F, ZHU Y, MULLER C, *et al.* Adaption of  $H^+$ -pumping and plasma membrane  $H^+$ -ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency[J]. *Plant Physiology*, 2002, **129**(1):50—63.
- [27] MCCLURE P R, KOCHIAN L V, SPANSWICK R M, *et al.* Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. II. Measurement of  $NO_3^-$  and  $H^+$  fluxes with ion-selective microelectrodes[J]. *Plant Physiology*, 1990, **93**(1):290—294.
- [28] LIU Q L(刘群录), ZHANG J X(张家旭), LI Y(李 义), *et al.* Studies on the proton pumping activity of  $H^+$ -ATPase in tonoplast vesicles of *Populus euphratica*[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 2001, **43**(5):495—500(in Chinese).
- [29] WEN B(文 彬), BIN J H(宾金华), PAN R ZH(潘瑞炽), *et al.* Isolation of mung bean plasma membrane vesicle and the analyses of hydrolysis activity of PM  $H^+$ -ATPase[J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 2004, **21**(3):319—325(in Chinese).
- [30] YIN H(尹 辉), MOU SH Y(牟书勇), LI G(李 冠), *et al.* Function and regulation of nitrate transporters in plants[J]. *Journal of Southern Agriculture*(南方农业学报), 2012, **43**(4):425—430(in Chinese).
- [31] DURESSA D, SOLIMAN K M, CHEN D. Mechanisms of magnesium amelioration of aluminum toxicity in soybean at the gene expression level[J]. *Genome*, 2010, **53**(10):787—797.
- [32] SPERANDIO M V, SANTOS L A, BUCHER C A, *et al.* Isoforms of plasma membrane  $H^+$ -ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of  $NO_3^-$  and  $NH_4^+$ [J]. *Plant Science*, 2011, **180**(2):251—258.