

微孢子虫糖蛋白的研究进展

吴海晶¹, 耿莉娜², 周泽扬^{3*}

(1. 重庆理工大学, 重庆 400054; 2. 重庆烟草科学研究所, 重庆 400715; 3. 西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715)

摘要 随着蛋白质组学和糖组学研究的迅速发展, 糖蛋白已成为众多研究的中心。糖蛋白的糖链结构直接影响其功能, 因此糖蛋白中糖链的结构研究成为糖生物学研究的重点之一。就糖蛋白研究的基本策略方法作了简要介绍, 并且简要概括了近年来微孢子虫糖蛋白的研究进展。

关键词 糖蛋白; 糖链; 分离鉴定; 结构分析; 质谱; 核磁共振

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)34-12017-03

Research Progress of Glycoprotein in Microsporidia

WU Hai-jing¹, GENG Li-na², ZHOU Ze-yang^{3*} (1. Chongqing University of Technology, Chongqing 400054; 2. Chongqing Tobacco Science Research Institute, Chongqing 400715; 3. The State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715)

Abstract With the rapid development of proteomics and glycomics research, glycoprotein has become the center of many studies. And the complex function of glycoprotein attribute to its diverse structure which was one of the important content of glycobiology. The recent research on global methods for protein glycosylation analysis were introduced. Finally this review covers aspects of the progress of glycoprotein in microsporidia.

Key words Glycoprotein; Sugar chain; Isolation and identification; Structure analysis; Mass spectrometry; NMR spectroscopy

蛋白质糖基化修饰是真核生物蛋白质最常见的翻译后修饰。研究发现, 有近一半以上的蛋白质都有可能存在着糖基化的修饰。正在合成的蛋白质或合成后的蛋白质在糖基转移酶作用下, 可以将活化的单糖或多糖加到该肽链上^[1]。糖链的形成往往改变蛋白质的构象, 进而改变蛋白质的功能。蛋白质的糖基化作用对该蛋白质的功能产生重要的影响, 例如在蛋白质的构象稳定、折叠、运输及定位等方面起着重要作用; 多数蛋白质表面的糖链都能够诱发特定的免疫反应, 且与免疫相关的关键分子几乎都是糖蛋白; 大多数微生物依靠糖链为介导, 进而黏附到宿主细胞表面, 如许多革兰氏阴性菌的黏附就是由细菌黏附素、宿主糖链相互作用介导的, 并由此决定病原微生物的宿主范围和组织趋向; 糖蛋白还参与受体激活, 信号转导, 细胞分化、增殖、凋亡及衰老, 精卵识别等众多重要的生物进程^[2]。自 20 世纪末提出“糖组学”(Glycomics) 概念以来, 人们就将研究对象锁定为糖蛋白, 主要研究蛋白质糖基化的基因信息、糖基化的位点信息、糖基化的结构信息及功能信息。而糖链结构的复杂性极大地制约了糖蛋白的研究速度。

1 糖蛋白的类型

糖蛋白是由长度较短、带分支的寡糖同多肽链经过共价连接形成的蛋白。通常, 糖蛋白中的糖链可分为直链和分支链, 糖基数一般有 1~15 个不等, 当然也有 20 个糖基的巨寡糖存在。不同的糖蛋白分子糖链的数目是不相同的, 而且分布也很不均匀。糖蛋白中的糖链可根据糖肽键的类型分为 N-连接的糖链、O-连接的糖链两大类, 分别简称为 N-糖链和 O-糖链。这两类糖链可单独或同时出现在同一糖蛋白中。

它们在结构上各自有自己的特点。

1.1 N-连接的糖链 N-连接糖蛋白是由寡糖中的 N-乙酰葡萄糖与多肽链中天冬酰胺残基的酰胺氮连接而形成的。通常, 含有潜在的糖基化位点 Asn-X-Ser/Thr (X 是脯氨酸以外的任何氨基酸) 3 个氨基酸残基组成的一个序列段; N-糖链由五糖核心结构(N-连接的糖蛋白链均含此结构)连接其他糖的情况, 通常可分为 3 类: 高甘露糖型, 是由 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 和甘露糖组成, 在五糖核心上再连接上 2~9 个甘露糖, 如卵蛋白; 复杂型, 除 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 和甘露糖外, 还有半乳糖、果糖、唾液酸与五糖核心相连; 杂合型(混合型)是既有高甘露糖链又有 N-乙酰氨基半乳糖链共同连接在五糖核心结构上。

1.2 O-连接的糖链 O-连接糖蛋白是由寡糖中 N-乙酰半乳糖与多肽链的丝氨酸或苏氨酸残基的羟基相连而形成的。O-糖链的结构比 N-糖链的结构相对简单一些, 但是 O-连接的糖链也存在多种连接形式。这些结构具有一个共同点, 即由一个或少数几种单糖与某些含羟基氨基酸相连接, 大体分为岩藻糖 Fuc 和 Ser/Thr 的 OH 连接、N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 和 Ser/Thr 的 OH 连接、N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 和 Ser/Thr 的 OH 连接。不存在共有的核心结构, 但在 GalNAc-Ser (Thr) 形式糖链中至少已发现 6 种核心结构。

2 糖蛋白的研究方法

蛋白质的糖基化修饰分析是糖蛋白研究的重要部分, 目前国内外许多学者已开展了糖蛋白质组学的研究。据文献报道, 现在研究糖蛋白的技术一般是使用凝集素亲和层析的方法分离得到糖蛋白, 经电泳染色分析糖蛋白, 释放糖链, 最后使用质谱等方法分析其结构。

2.1 糖蛋白/糖肽分离纯化 常用凝集素亲和层析法来进行糖蛋白和糖肽的分离纯化。不同来源的植物凝集素对不同结构的糖链具有特异的亲和性。许多凝集素已被分离出来, 并应用于商品化, 如菜豆凝集素 (Phaseolus vulgaris agglu-

基金项目 国家自然科学基金 (NO. 30930067, 31270138, 31101770)。
作者简介 吴海晶 (1986-), 女, 河北邯郸人, 助教, 硕士, 从事微生物基因组与次生代谢方面的研究。* 通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事家蚕分子生物学、家蚕病原生物学方面的研究。

收稿日期 2014-10-27

tinin,PHA) 能够与 N-乙酰半乳糖胺进行结合;麦芽凝集素(Wheat germ agglutinin,WGA)可以同 N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺和 N-乙酰神经氨酸进行结合;刀豆蛋白 A(Concanavalin A,Con A)可以特异性地结合 D-甘露糖、D-半乳糖和 N-乙酰葡萄糖单糖,识别 N-聚糖糖蛋白,在结合糖蛋白的同时结合单糖和糖脂;大豆凝集素(Soybean agglutinin,SBA)特异性结合 D-半乳糖和 N-乙酰半乳糖胺^[3]。这几种凝集素可以配合使用。2008 年 Cosima 等^[4]研究血清中糖蛋白的性质,先使用刀豆蛋白 A(Con A)、麦芽凝集素(WGA)和黑接木骨凝集素(SNA)3 种凝集素分别进行亲和层析,然后组合进行亲和层析,得到糖蛋白,成功地鉴定得到 45 种蛋白质中 86 个 N-糖基化位点。糖蛋白也可以经凝胶电泳后染色来鉴定。常用的染色方法有 PAS(过碘酸-Schiff)法、银染法、荧光染色法,也可以使用凝集素印迹(lectin blot)特异地对不同糖蛋白进行显色识别^[5]。

2.2 糖链的释放 糖链的释放一般存在化学释放和酶释放 2 种方法。我们分别称之为化学法和酶法。

N-连接聚糖常使用肽 N-糖苷酶 F(PNGase F)对其进行水解。它是一种酰氨酶,能在 N-糖蛋白的高甘露糖、杂合或复合寡糖部分的最内侧 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)和天冬酰胺残基之间进行切割。与此同时,令天冬酰胺转变为天冬氨酸,进而造成其相对分子质量增加 0.98,起到质量标记 N-糖基化位点的作用。而对 O-连接聚糖目前只有一种酶,内切- α -N-乙酰半乳糖胺酶即 O-糖苷酶,断裂 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)和 Ser/Thr 连接。化学法有肼解法和 β -消除法。肼解法用于释放含 N-乙酰氨基葡萄糖胺(GlcNAc)和 Asn 连接的糖蛋白。 β -消除反应被广泛应用于含 N-乙酰半乳糖胺和丝氨酸或苏氨酸(GalNAc-Ser/Thr)连接的糖蛋白。

2.3 糖链的结构分析 质谱(MS)技术和核磁共振(NMR)技术是糖链结构解析方面应用最广泛的 2 种技术。这 2 种技术各有其利弊,在实际的使用中经常互补。近几年来,对糖蛋白中糖链部分的分析方法有相关报道,但是没有一些突破性的进展。在当前研究环境下,不具备规模化直接分析糖链组成、结构的相关技术条件。这也成为糖蛋白的研究长期以来滞后于核酸、蛋白研究的一个主要原因。

2.3.1 生物质谱法。质谱是目前应用比较广泛的一项技术。它可以对糖链进行结构分析,进而解析糖链的结构^[6]。电喷雾质谱(ESI-MS)和基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)具有独特的“软电离”方式,能够很好地对难挥发、高极性、热不稳定的糖等生物大分子进行结构分析,进而被称为生物质谱。在糖链结构的研究中,ESI-MS 无需衍生化就可以确定出糖链的组成结构,但是易受到样品和溶剂中干扰物的影响;MALDI-TOF-MS 因其对干扰物忍受力强、产生的碎片离子少以及图谱没有 ESI-MS 中的多电荷特性而更易解析等优点而成为目前研究糖链结构解析的常用工具^[6]。

随着质谱技术的不断发展以及多级串联质谱技术的应用,对糖蛋白的研究尤其是对寡糖链结构的研究更加准确、

简便。一般,ESI-MS 和 MALDI-MS 可借助碰撞诱导解吸(CID)、源后衰变(PSD)等相关技术尽可能获得详尽的糖链结构信息^[7]。2008 年 Cosima 等^[4]使用 MALDI-TOF MS 和 LC-ESI-MS/MS 质谱分析了由凝集素亲和层析和亲水色谱柱富集到的血清中糖蛋白,结合 2 种方法,共得到 38 种蛋白中的 63 个糖基化位点,证明 2 种方法存在的差异可以互为补充。另外,傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(FT-ICR)也具有高灵敏度和分辨率,其质量精确度高达 1×10^{-6} ,可与 2-DE 一起使用来分析糖蛋白。2004 年 Froesch 等^[8]结合全自动芯片电喷雾和傅里叶转换离子回旋共振(FT-ICR)质谱这两项技术,用于糖组学的研究。2006 年 Vakhruhev 等^[9]利用傅里叶转换离子回旋共振(FT-ICR)质谱分析尿液,诊断先天性糖蛋白糖基化缺陷(Congenital disorders of glycosylation,CDG)和其他疾病。

MS 的灵敏度非常高,能够精确地测定质量,在某种情况下可以得到糖链序列相关的信息。但是,与普通蛋白不同的是,糖蛋白的分子结构通常是不均一的,包括糖链的微不均一以及糖基化位点的不均一。这些不均一性给糖蛋白的质谱测定带来很大困难,严重影响质谱分析的灵敏度,而且 MS 不能区分参与糖链构造中各种单糖的同分异构体,也不能提供出糖链的连接位置、差向异构等结构方面的相关信息。

2.3.2 核磁共振法(NMR)。目前,NMR 技术是糖链立体化学结构分析中一种最重要的技术方法,可以确定出糖链的构型、连接位置、分支和微观多样性。

早在 1983 年 Vliegthart 等^[10]就利用高分辨率的¹H-NMR 技术对与天冬酰胺连接的糖肽进行研究。由于 NMR 测定讯号峰重叠严重,解析较难,灵敏度不高,且对样品纯度要求极高,多维 NMR 需要样品为毫克级,对大多数糖复合物中的微量糖链来讲是很难达到的,因此在蛋白质糖基化分析中的应用并不广泛。但是,NMR 在糖链结构的检测特别是糖链的连接方式以及分支结构分析的优点,促进 NMR 在糖基化分析中的发展^[11]。Shaw 等^[12]使用二维¹H-NMR 技术对维持花生过氧化物酶稳定的 3 个糖链进行了结构分析。Yamaguchi 等^[13]使用核磁共振二维核欧沃豪斯增益谱(¹³C-¹³C NOESY)、核磁共振总相关谱(¹³C-¹³C TOCSY)和¹H-NMR 技术相结合来进行较大糖蛋白的糖链分析。目前已经出现了纳米 NMR 用于组织细胞复杂糖链的分析^[14]。

最近有科学家将微阵列技术(Microarray)引入糖蛋白组学研究,可广泛用于糖蛋白的糖链分析,以对生物个体产生的全部蛋白聚糖结构进行系统鉴定与表征^[15]。Pilobello 等^[16]将凝集素固定在芯片上,建立了凝集素微阵列技术,以快速分析糖基化蛋白质。虽然目前糖芯片技术尚未成熟,不能够大规模地应用到生物学研究中,但是随着糖基数据库的完善同质谱技术的发展结合使用,必将逐步成为能够广泛应用的生物芯片技术。

3 微孢子虫糖蛋白研究进展

微孢子虫的孢壁作为最先与宿主细胞接触的部分在孢子侵染宿主过程中扮演着重要角色。而孢壁蛋白对微孢子

虫的侵染有着直接的关系,但其作用机理还不明确,微孢子虫孢子壁、极帽、极膜层以及极管上存在一些糖蛋白、糖结合物。2005 年, Hayman 等^[17]发现肠道微孢子虫(*E. intestinalis*)利用宿主细胞表面的硫酸化的 GAGs(糖胺聚糖)特异性地黏附到宿主细胞表面,而且微孢子虫利用这种机制增加了对宿主细胞的感染,并且发现添加外源性的硫酸聚糖可以降低孢子的感染率。2007 年 Southern 等^[18]得到了肠道微孢子虫孢壁蛋白 EiEnP1,可以使孢子黏附并感染宿主细胞。EnP1 含有 3 个肝素结合基序。该基序可能识别并结合宿主细胞表面的葡聚糖,从而介导孢子黏附和宿主细胞感染,进一步证实在孢子与宿主细胞的黏附过程中主要是利用宿主细胞表面的糖胺聚糖(GAGs)起作用。

在微孢子虫研究中关于糖蛋白的研究还很少。目前微孢子虫糖蛋白的生化信息主要来自于凝集素结合试验。2001 年 Hayman 等^[19]得到肠道微孢子虫(*Encephalitozoon intestinalis*)的 2 个外孢壁蛋白(SWP1, SWP2)。根据感染细胞的裂解物与 ConA(伴刀豆蛋白)或 WGA(麦芽凝集素)-包被的磁珠结合后与特异性的抗体反应检测结果,推测含有 N-糖基化。2003 年 Xu 等^[20]通过 Con A 亲和层析的方法得到 PTP1, 2004 年分析了 PTP1 的糖基化位点,发现 PTP1 的 O-甘露糖化影响脑炎微孢子虫(*E. hellem*)对宿主细胞的感染,加入外源性的甘露糖可以降低孢子的感染率。极丝蛋白 1(PTP1)被认为含有 O-甘露糖基化(O-mannosylated),只是因为其与 O-乙酰葡萄糖氨(O-GlcNAc)的抗体不发生反应,而在 10 种凝集素中只与 ConA 结合,并且这种结合可以被 NaOH 处理去除。这种 O-甘露糖基化作用(O-mannosylation)与相近的物种兔脑炎微孢子虫(*E. cuniculi*)的基因组序列分析结果一致^[21]。随后,2006 年 Xu 等^[22]通过蛋白质组学技术,成功鉴定了 20 kDa 的 SWP3。它定位在孢子内壁上。SWP3 可能含有糖基磷脂酰肌醇锚定位点(GPI anchor),通过免疫电泳技术发现在孢子繁殖(Sporogony)时处于细胞表面,在成熟孢子中是定位在孢子内壁上,还含有一些 O-糖基化位点,很可能是一种糖基化蛋白。2007 年 Taupin 等^[23]利用电子显微镜技术、质谱技术和核磁共振技术研究兔脑炎微孢子虫和蝗虫微孢子虫(*A. locustae*)的甘露糖基结合物(Mannoconjugates)的定位、结构,在电子显微镜水平用甘露糖特异性结合的凝集素标记试验表明极帽和极膜层是富含甘露糖的糖蛋白的主要区域,利用质谱及核磁共振技术分析葡聚糖片段确定了联接在微孢子虫蛋白质上的寡糖结构为 O-糖苷键连接的线性的甘露糖基化的低聚糖,并且兔脑炎微孢子虫和蝗虫微孢子虫不存在 N-糖苷或存在的量很少而达不到可检测的水平。在家蚕微孢子虫中,2008 年吴正理^[24]通过质谱方法得到 14 种孢壁蛋白,对其序列进行糖基化位点在线预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>),得到其中有 10 个假定的孢壁蛋白存在 N-糖基化位点而无 O-糖基化位点。这一预测结果是否正确,还需要进一步的研究。

4 展望

糖蛋白结构复杂,主要是由于糖链的结构复杂,不单表现

糖链序列的多样,还在于其合成没有模板,而是经过酶促反应在细胞内质网和高尔基体中生成的。近些来,随着蛋白质组学技术的发展,糖蛋白质组学的研究也得到很大的进步。从现阶段来看,对于糖蛋白质组的研究还主要集中在方法学的开发和利用方面。对糖基化位点的研究方法也不断得到改进,但主要问题的解决还要依赖于质谱的进一步发展。该实验室对家蚕微孢子虫孢壁蛋白中糖蛋白的研究才刚刚开始。根据家蚕微孢子虫孢壁蛋白的预测信息来验证孢壁蛋白中糖蛋白的类型,寻找其可能发挥的作用,以期能揭示其侵染宿主的奥秘。

参考文献

- [1] MARCHAL I, GOLFIER G, DUGAS O, et al. Bioinformatics in glycobiology [J]. *Biochimie*, 2003, 85(1/2): 75-81.
- [2] 郭慧, 邓文星, 张映. 糖蛋白的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2009(3): 16-19.
- [3] SHARON N, LIS H. History of lectins; from hemagglutinins to biological recognition molecules [J]. *Glycobiology*, 2004, 14(11): 53-62.
- [4] COSIMA D C, ZAMBONIN C G, JENSEN O N. Assessment of lectin and HILIC based enrichment protocols for characterization of serum glycoproteins by mass spectrometry [J]. *J Proteomics*, 2008, 71(3): 304-317.
- [5] 张英, 黄琳娟, 王仲孚. 糖蛋白的凝胶电泳和电泳迹染色鉴定技术 [J]. *化学进展*, 2008, 20(7): 1158-1164.
- [6] BUDNIK B A, LEE R S, STEEN J A. Global methods for protein glycosylation analysis by mass spectrometry [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1764(12): 1870-1880.
- [7] WUHRER M, CATALINA M I, DEELDER A M, et al. Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2007, 849(1/2): 115-128.
- [8] FROESCH M, BINDILA L M, BAYKUT G, et al. Coupling of fully automated chip electrospray to Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for high-performance glycoscreening and sequencing [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18(24): 3084-3092.
- [9] VAKHRUSHEV S Y, MORMANN M, PETER-KATALINIC J. Identification of glycoconjugates in the urine of a patient with congenital disorder of glycosylation by high-resolution mass spectrometry [J]. *Proteomics*, 2006, 6(3): 983-992.
- [10] VLEGENTHART J. High-resolution, 1 H-nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins [J]. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 1983, 41: 209-374.
- [11] KATO K, SASAKAWA H, KAMIYA Y, et al. 920 MHz ultra-high field NMR approaches to structural glycobiology [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780(3): 619-625.
- [12] SHAW G S, SUN Y, BARBER K R, et al. Sequence specific analysis of the heterogeneous glycan chain from peanut peroxidase by ¹H-NMR spectroscopy [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53(1): 135-144.
- [13] YAMAGUCHI Y, WALCHLI M, NAGANO M, et al. A (13) C-detection NMR approach for large glycoproteins [J]. *Carbohydr Res*, 2009, 344(4): 535-538.
- [14] MANZI A E, NORGARD-SUMNICHT K, ARGADE S, et al. Exploring the glycan repertoire of genetically modified mice by isolation and profiling of the major glycan classes and nano-NMR analysis of glycan mixtures [J]. *Glycobiology*, 2000, 10(7): 669-689.
- [15] OYELARAN O, GILDERSLEEVE J C. Glycan arrays: recent advances and future challenges [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, 13(4): 406-413.
- [16] PILOBELLO K T, KRISHNAMOORTHY L, SLAWEK D, et al. Development of a lectin microarray for the rapid analysis of protein glycopatterns [J]. *Chembiochem*, 2005, 6(6): 985-989.
- [17] HAYMAN J R, SOUTHERN T R, NASH T E. Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(2): 841-848.
- [18] SOUTHERN T R, JOLLY C E, LESTER M E, et al. EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro [J]. *Eukaryot Cell*, 2007, 6(8): 1354-1362.
- [19] HAYMAN J R, HAYES S F, AMON J, et al. Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* [J]. *Infect Immun*, 2001, 69(11): 7057-7066.

(下转第 12095 页)

上午 8:30、中午 11:30 和下午 17:00 记录室内温度、湿度。

1.2.4.2 株高。抽穗前,从分蘖节量至最长叶尖;抽穗后,由分蘖节量至穗顶部(不计芒)。

1.2.4.3 分蘖。分别记载大、中、小分蘖各占的比例,以掌握小麦的生长势,预计小麦的成穗数。划分大、中、小分蘖的标准是:前期 3 个叶片以上的分蘖为大分蘖,2 个叶片的分蘖为中分蘖,1 个叶片的分蘖为小分蘖(叶片长 1 cm 以下的不算做分蘖数);在后期,长势长相与主茎相似的为大分蘖,高度、粗壮程度相当主茎 1/2 以上者为中分蘖,以下者为小分蘖。不再生长心叶的分蘖为空心蘖;叶片枯黄的分蘖为死分蘖;能成穗的分蘖为有效分蘖;不能成穗的分蘖为无效分蘖。

1.2.4.4 叶片叶绿素测定。测定叶绿素时,用最上部完全展开叶(倒数第二叶)和第二完全展开叶(倒数第三叶)中部、叶缘和叶脉之间的中间部位测定。测定时,注意避开叶脉和有损伤的叶片。具体点位于叶片中部距离基部 55% 的位置偏差最小,一般在 40% ~80% 区域内测定即可。

1.2.4.5 叶片情况。通过对叶片的调查,可以了解小麦个体长势。调查项目为总叶片数(伸出 1 cm 以上的叶计算在叶片数内)、绿叶数、黄叶数(黄的部分占全叶面只的 1/2 以上)。随机选择每瓷罐中 3 株小麦,计数叶片数。

2 结论与讨论

2.1 大量元素液体水溶肥检测结果 大量元素液体水溶肥中氮(N) 105. 2 g/L, 磷(P₂O₅) 300. 9 g/L, 钾(K₂O) 102. 7 g/L, pH(1:250) 6. 90, 锌(Zn)2. 0 g/L, 硼(B)3. 4 g/L。

2.2 肥效验证结果 利用工艺生产的高磷型产品,进行小麦苗期水培肥效试验。由表 1 可知,该肥料稀释浓度3 000 ~ 5 000 倍,小麦的各项生理指标明显优于其他浓度,稀释浓度 5 000 倍左右生长最优,试验重复 3 组植株均有分蘖现象。

由表 2 可知,在小麦苗期施用所述大量元素液体水溶肥可以明显促进小麦生长,其效果较常规磷钾肥料(以磷酸二氢钾为例)有明显优势。

表 1 不同浓度水溶肥生长施用下小麦生长情况

处理	株高 cm	根长 cm	茎粗 cm	总叶数	叶绿素测定 (SPAD)	备注
缺素	14. 9	13. 0	1. 7	4	39	
400	22. 4	14. 4	1. 8	4	38	老叶叶尖
1 000	20. 6	10. 3	1. 8	4	43	发黄(每株)
3 000	23. 3	19. 5	2. 1	4	48	
5 000	25. 4	15. 2	2. 3	5	54	分蘖
7 000	21. 3	13. 8	2. 1	4	44	

表 2 肥效试验对比试验

样品	株高 cm	根长 cm	茎粗 cm	总叶数	是否分蘖
本文提供肥料	25. 4	14. 2	2. 3	5	是
磷酸二氢钾	21. 5	10. 1	1. 9	4	否
清水	14. 9	13. 0	1. 7	4	否

3 结论

研究表明,关于高磷型液体肥,所述配制大量元素液体水溶肥料的方法简便可行,生产条件温和(常压、接近常温);生产原料无毒、无强腐蚀性,原料、生产成本低,具有良好的市场前景;经检测,该方法所生产肥料的各项指标符合国家大量元素液体水溶肥料标准;肥效试验表明,小麦苗期在水培中的最佳稀释倍数为 5 000 倍;从肥效对比试验中可以看出,液体肥较常规肥料(以磷酸二氢钾为例)肥效有明显优势。

参考文献

[1] 汪家铭. 水溶肥发展现状及市场前景[J]. 上海化工,2011,36(12):27 - 31.
[2] 李代红,傅送保,操斌,等. 水溶性肥料的应用与发展[J]. 现代化工,2012,32(7):12 - 15.
[3] 周鹏,鲁剑巍,李小坤,等. 我国大量元素水溶肥料产业发展现状[J]. 现代化工,2013,33(4):9 - 12.
[4] 傅送保,李代红,王洪波,等. 水溶性肥料生产技术发展[J]. 磷肥与复肥,2013,28(5):46 - 49.

(上接第 12019 页)

[20] XU Y,TAKVORIAN P,CALI A,et al. Lectin binding of the major polar tube protein (PTP1) and its role in invasion [J]. J Eukaryot Microbiol, 2003,50(6):600 - 601.
[21] XU Y,TAKVORIAN P M,CALI A,et al. Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite that infects humans [J]. Infect Immun,2004,72(11):6341 - 6350.
[22] XU Y,TAKVORIAN P,CALI A,et al. Identification of a new spore wall

protein from *Encephalitozoon cuniculi*[J]. Infect Immun,2006,74(1):239 - 247.
[23] TAUPIN V,GARENAUX E,MAZET M,et al. Major O-glycans in the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing alpha-1,2 linkages [J]. Glycobiology, 2007,17(1):56 - 67.
[24] 吴正理. 家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)孢壁蛋白的研究 - 三种主要蛋白质成分的鉴定与克隆分析 [D]. 重庆:西南大学,2008.