

## 小麦幼苗对镉和 1,2,4-三氯苯污染的响应

丁艳<sup>1</sup> 葛才林<sup>2</sup> 王泽港<sup>2</sup> 杜庆才<sup>1</sup>

(1. 蚌埠学院 应用化学与环境工程系,安徽 蚌埠 233000;

2. 扬州大学 生物科学与技术学院,江苏 扬州 225009)

**摘要** 应用双向凝胶电泳技术,结合含水率及膜脂过氧化物测定等方法,研究镉(Cd)和 1,2,4-三氯苯(TCB)污染对扬麦 13 幼苗生长的影响。结果表明: Cd 和 TCB 污染造成扬麦 13 幼苗含水率降低,导致膜脂过氧化。Cd 和 TCB 污染对小麦叶片中的蛋白质组分也有较大影响: 与对照相比,污染处理后的叶片蛋白质组分中检测出 12 个 TCB 胁迫诱导蛋白和 10 个 Cd 胁迫诱导蛋白,其中有些蛋白是 TCB 特异性诱导蛋白,也有一些蛋白为 Cd<sup>2+</sup> 胁迫特异性诱导蛋白。这些诱导蛋白的产生可能是扬麦 13 对 Cd 或 TCB 污染的一种适应性响应。

**关键词** 小麦; 镉; 1,2,4-三氯苯; 蛋白质组; 污染

中图分类号 S 512.1

文章编号 1007-4333(2011)03-0048-05

文献标志码 A

## Response of Cd and 1,2,4-Trichlorobenzene pollutants on growth of wheat seedlings

DING Yan<sup>1</sup>, GE Cai-lin<sup>2</sup>, WANG Ze-gang<sup>2</sup>, DU Qing-cai<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry and Environmental Engineering, Bengbu College, Bengbu 233000, China;

2. College of Biological Sciences and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract** The effects of wheat seedlings to Cd and 1,2,4-trichlorobenzene (TCB) pollutants were investigated by methods of Two-dimensional Electrophoresis, combined with water content, and lipid peroxide determination. The results showed that Cd and TCB pollutants inhibited the growth of leaves and roots which leading to water deficit and causing lipid peroxidation in wheat s seedlings. Moreover, Cd and TCB stress had significant effect on global proteome in wheat leaves. Comparing with the contrast, we found that there were 12 stress inducible proteins of TCB, and 10 stress inducible proteins of Cd. The appearance of these induced proteins may be the important mechanism for Yangmai No. 13 adapting to Cd and TCB pollutants.

**Key words** wheat; Cd<sup>2+</sup>; TCB; proteome; pollutant

重金属镉(Cd)和有机物 1,2,4-三氯苯(TCB)是有毒化学物质,很容易被作物吸收进入食物链中,对人体造成严重的伤害<sup>[1]</sup>。其中,Cd 是植物非必需的有毒重金属,是农业环境和农产品的主要污染物质;而 TCB 属于长效持久的有机污染物,对人体而言,TCB 具有致癌、致畸和致突变的“三致”效应。

有关 Cd 和 TCB 对作物毒性机制的研究较多,如:导致细胞膨压丧失造成细胞壁弹性的降低<sup>[2]</sup>,进而抑制细胞的扩展,对光合器官产生伤害;与蛋白质中的巯基结合或取代蛋白或酶中的金属阳离子,进

而抑制酶活性和导致酶构型的改变<sup>[3]</sup>。进入作物体内的 TCB 能干扰细胞的有丝分裂,导致染色体的畸变,抑制重要酶的活性,并导致 DNA 加合物的形成。有关作物对重金属和 TCB 胁迫的应答过程和防御机制的研究刚刚起步,相关研究报道很少。

本试验以扬麦 13 为材料,探讨不同浓度 Cd<sup>2+</sup>和 TCB 污染对小麦幼苗含水率、膜脂过氧化作用以及蛋白质组的影响,旨在揭示小麦对不同污染胁迫的响应;用双向凝胶电泳技术,对叶片所产生的诱导蛋白进行双向电泳分析,以期为进一步从分子水平

收稿日期: 2010-09-26

基金项目: 蚌埠学院自然科学重点项目(2010ZR02zd); 江苏省作物栽培生理重点实验室开放课题(K09009)

第一作者: 丁艳,助教,硕士,主要从事环境胁迫下作物蛋白质组学研究,E-mail:dingyan586@163.com

阐明小麦对化学污染物的耐性和适应机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

扬麦 13 (*Triticum aestivum*, cv. Yangmai No. 13), 由扬州大学农学院提供。Cd<sup>2+</sup> (CdCl<sub>2</sub>) 和 1,2,4-三氯苯 (简称 TCB), 均为分析纯。

### 1.2 试验方法

试验于 2007—2009 年在扬州大学生物物理实验室进行。

1) 植株培养与处理。用 Hoagland 完全营养液在植物生长箱中 20 ℃ 培养 ‘扬麦 13’ 幼苗, 待幼苗长至 3 叶期左右分别移到含有 Cd<sup>2+</sup> 和 TCB ( $c(\text{Cd}^{2+}): 0.25, 0.50, 0.75$  和  $1.00$  mmol/L;  $\rho(\text{TCB}): 2.5, 5.0, 7.5$  和  $10.0$  mg/L) 的培养液中, 在自然光温条件下进行污染胁迫处理, 于处理后 7 天取小麦叶片, 分析化学污染物 Cd<sup>2+</sup>、TCB 对小麦幼苗生长的影响。

2) 含水率的测定。采用差减法, 计算公式如下:

$$\text{含水率} = \frac{(\text{幼苗鲜质量} - \text{幼苗干质量})}{\text{幼苗干质量}} \times 100\%$$

3) 丙二醛 (MDA) 质量摩尔浓度的测定。MDA 浓度 ( $c(\text{MDA})$ ) 采用波长为 532、450 和 600 nm 处的光密度值表示, 方法见文献 [4]。MDA 质量摩尔浓度  $b(\text{MDA})$  为:

$$b(\text{MDA}) = \frac{c(\text{MDA})V}{m}$$

式中:  $V$  为提取液体积, mL;  $m$  为植物组织鲜质量, g。

### 1.3 叶片可溶性蛋白的提取

本试验采用聚乙二醇 (PEG) 分步提取法, 其流程见图 1。具体步骤如下:

1) 称取 4 g 小麦叶片, 用研钵在液氮冷冻条件下将样品研成粉末, 加入 10 mL 蛋白质提取液 (包含: 0.5 mol/L Tris-HCl pH 8.8, 1% Triton X-100, 0.2 mol/L MgCl<sub>2</sub>, 体积分数为 2% 的  $\beta$ -巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L EDTA, 1% PVP)。研磨成匀浆, 放置 15 min, 4 ℃、10 000g 离心 15 min, 弃去沉淀 (本试验中命名为 F<sub>1</sub> 组分) 后, 上清液即为蛋白质粗提取液。逐级在上清液中加入 PEG, 分别使其体积分数为 8%、16% 和 24%, 摇匀、冰浴, 离心, 所得沉淀依次命名为 F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub> 和 F<sub>4</sub> 蛋白组分。

2) 蛋白质的清洗: 分别用 5 mL 三氯乙酸和冷

丙酮的混合溶液 ( $\varphi$  为 0.8 mL/m<sup>3</sup>) 溶解 F<sub>3</sub> 和 F<sub>4</sub> 蛋白组分, 并置于冰浴上 30 min 左右, 在 4 ℃、15 000g 离心 15 min, 弃去上清; 重复此操作 3~4 次。沉淀待丙酮挥发干净后, -20 ℃ 保存备用。

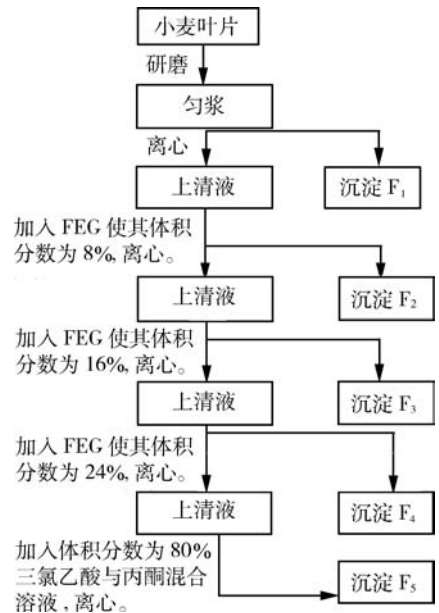


图 1 小麦叶片蛋白质 PEG 分步提取流程

Fig. 1 Schematic work flow of a differential PEG precipitation for the fractionation of proteome in wheat leaves

### 1.4 蛋白质双向电泳

蛋白质的双向电泳采用 PROTEAN (Bio-Rad 公司) 等电聚焦系统 (仪器) 及 BIO-RAD 垂直电泳系统。试验方法参照 Bio-Rad 双向电泳试验指南手册 (购仪器附赠)。电泳结束后采用考马斯亮蓝染色液染色并用超纯水脱色后, 用 Gel Doc XR system 扫描图像。PDQuest 二维分析软件对 2-DE 胶进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 Cd<sup>2+</sup> 和 TCB 污染对小麦幼苗含水率的影响

随 TCB 污染浓度的提高, 小麦幼苗中含水率呈下降趋势 (图 2(a))。当 TCB 质量浓度为 10 mg/L 时幼苗含水率降到最低 (89%), 是 CK 的 96.7%。这表明, TCB 污染阻碍小麦根系对于水分的吸收, 导致小麦幼苗水分缺乏。在 Cd<sup>2+</sup> 胁迫条件下, 小麦幼苗含水率与 TCB 污染有相同的变化趋势 (图 2(b)), 即随着 Cd<sup>2+</sup> 浓度的逐渐升高, 幼苗含水率逐渐下降。

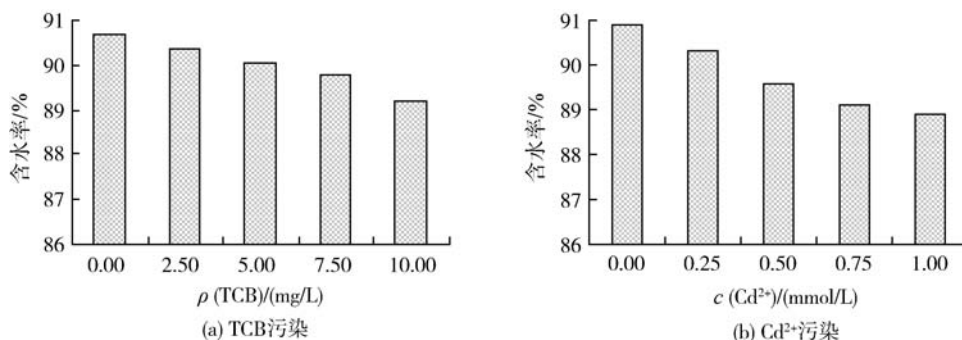


图2 TCB、Cd<sup>2+</sup>污染对小麦幼苗含水率的影响

Fig. 2 Effect of TCB、Cd<sup>2+</sup> stress on relative water content in wheat seedlings

## 2.2 TCB和Cd<sup>2+</sup>污染对叶片和根系中丙二醛含量的影响

随着TCB和Cd<sup>2+</sup>污染浓度的增高,小麦叶片和根系中的MDA质量摩尔浓度均持续增加(图3)。当Cd<sup>2+</sup>的浓度为1.0 mmol/L时,小麦叶片中MDA质量摩尔浓度达到0.78  $\mu\text{mol/g}$ ,相当于CK

的175%;相同浓度下,根系中MDA的质量摩尔浓度相当于CK的213%。这表明,随TCB和Cd<sup>2+</sup>污染浓度的不断升高,小麦幼苗膜脂质过氧化程度加剧,使幼苗因膜脂质过氧化而受到严重伤害,并且可以明显的看出随着污染物浓度的增大,根部的膜质化程度大于叶片。

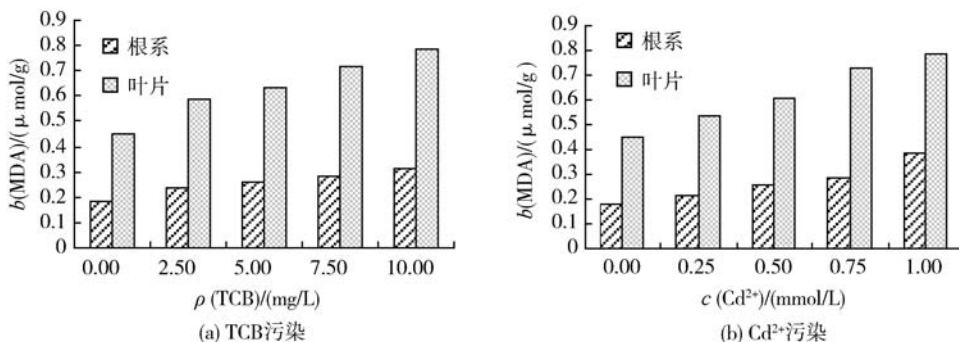


图3 TCB、Cd<sup>2+</sup>污染对小麦幼苗根系和叶片丙二醛质量摩尔浓度的影响

Fig. 3 Effect of TCB、Cd<sup>2+</sup> stress on MDA content in wheat roots and leaves

## 2.3 Cd<sup>2+</sup>和TCB污染对小麦叶片蛋白质组分的影响

Cd<sup>2+</sup>和TCB污染均能诱导小麦叶片中蛋白质的表达(图4(a))。其中在小麦叶片F<sub>3</sub>蛋白组分中,主要有F<sub>3</sub>T<sub>1</sub>~F<sub>3</sub>T<sub>12</sub>这12个TCB胁迫诱导蛋白,其中11个在对照中不能被检出或丰度极低,仅有F<sub>3</sub>T<sub>12</sub>在对照中明显可见,但其表达受到TCB污染的显著诱导。同时图4中还标出了10个Cd<sup>2+</sup>污染显著诱导蛋白(F<sub>3</sub>C<sub>1</sub>~F<sub>3</sub>C<sub>10</sub>)。这10个蛋白在对照中未被检出或表达水平极低。

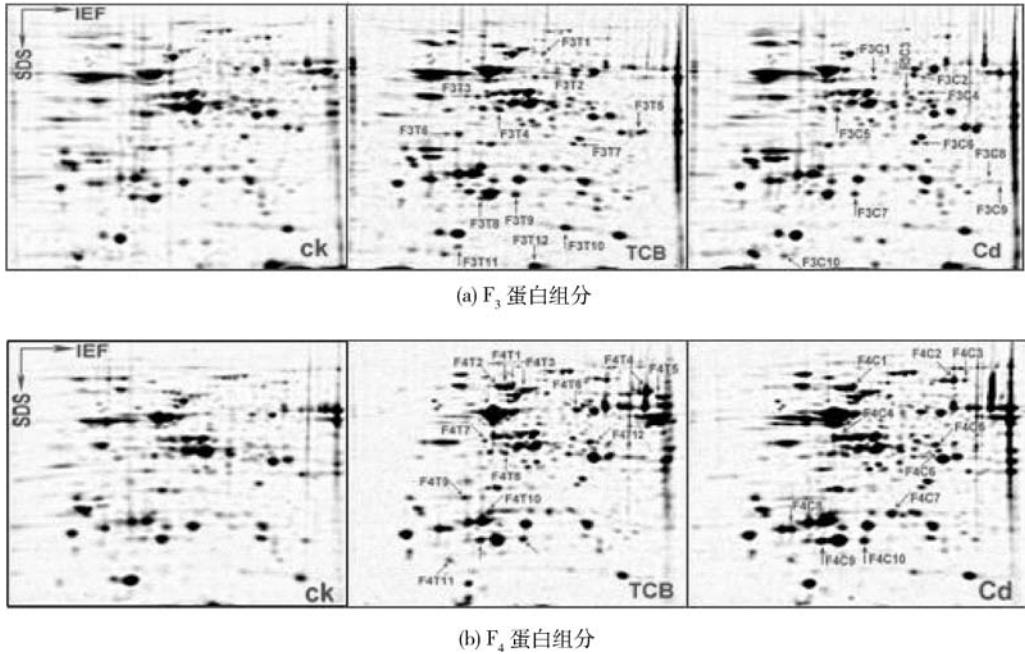
由图4(b)可知,除F<sub>3</sub>组分中的Cd<sup>2+</sup>和TCB诱

导蛋白在F<sub>4</sub>组分中得到进一步证实外,还发现相当数量的蛋白质在Cd<sup>2+</sup>和TCB污染下其表达水平显著上调。在F<sub>4</sub>组分中,可发现TCB诱导F<sub>4</sub>T<sub>4</sub>~F<sub>4</sub>T<sub>5</sub>、F<sub>4</sub>T<sub>11</sub>、F<sub>4</sub>T<sub>12</sub>这4个蛋白的表达受到TCB污染的诱导,它们在对照中未能检测到或其表达水平极低,其他蛋白的表达水平在TCB污染下显著上调。

比较小麦叶片中的Cd<sup>2+</sup>和TCB污染诱导蛋白可知,有的诱导蛋白为Cd<sup>2+</sup>和TCB污染的共同诱导蛋白,即这些蛋白质的表达既受到Cd<sup>2+</sup>污染的诱导,也受到TCB污染的诱导。有的为Cd<sup>2+</sup>或TCB特异性诱导蛋白,如F<sub>3</sub>组分中的F<sub>3</sub>T<sub>1</sub>、F<sub>3</sub>T<sub>6</sub>、F<sub>3</sub>T<sub>11</sub>

为 TCB 特异性诱导蛋白,而 F<sub>3</sub>C<sub>4</sub>、F<sub>3</sub>C<sub>8</sub> 和 F<sub>3</sub>C<sub>9</sub> 为 Cd<sup>2+</sup> 污染特异性诱导蛋白。F<sub>4</sub> 组分中的 F<sub>4</sub>T<sub>4</sub>、

F<sub>4</sub>T<sub>5</sub> 和 F<sub>4</sub>T<sub>12</sub> 为 TCB 特异性诱导蛋白,而 F<sub>4</sub>C<sub>3</sub>、F<sub>4</sub>C<sub>7</sub> 和 F<sub>4</sub>C<sub>8</sub> 为 Cd<sup>2+</sup> 胁迫特异性诱导蛋白。



IEF, 等电聚焦电泳; SDS, 十二烷基硫酸钠。

图 4 小麦叶片蛋白组分 F<sub>3</sub> 和 F<sub>4</sub> 中的主要化学污染诱导蛋白

Fig. 4 Cd<sup>2+</sup> and TCB stress induced proteins in fraction F<sub>3</sub> and F<sub>4</sub> of wheat leaf proteome proteins

### 3 讨论

#### 3.1 Cd<sup>2+</sup> 和 TCB 污染对小麦幼苗含水率的影响

化学污染物被幼苗根系吸收进入植物体后,可从地下部运转到地上部而使地上部污染物含量增加。有研究认为,植物地上部分的 Ca<sup>2+</sup> 浓度取决于其由根系向地上部的运输<sup>[5-6]</sup>。小麦幼苗地下部分的 Ca<sup>2+</sup> 浓度明显高于地上部分<sup>[7]</sup>。也就是说,TCB 和 Cd 进入植物体后大多数积累在根的生长部位,当根部积累的 TCB 和 Cd 超过一定浓度时,就会破坏根系细胞膜结构,从而抑制其正常的生长发育,也因此阻碍根系对水份的吸收,导致体内含水率下降<sup>[8-9]</sup>。本研究的结果也表明,随着 TCB 和 Ca<sup>2+</sup> 浓度的增加小麦幼苗含水率下降,与相关文献报道一致。

#### 3.2 Cd<sup>2+</sup> 和 TCB 污染对幼苗体内 MDA 含量的影响

植物体内产生的活性氧自由基可引发膜脂过氧化作用,MDA 作为植物体内膜脂类过氧化的最终产物,与膜上蛋白质结合会引起蛋白质分子间和分子内的交联,导致细胞膜系统受损,透性增强,因此,

MDA 含量水平可反映膜受损程度<sup>[10]</sup>。本试验中,小麦幼苗叶片和根系 MDA 含量在 Cd 和 TCB 污染处理下显著上升,这同前人的研究结果一致<sup>[11-12]</sup>。

#### 3.3 Cd<sup>2+</sup> 和 TCB 污染对小麦叶片蛋白质表达的影响

植物在逆境胁迫下,体内会被诱导出一些新的蛋白或原有蛋白质的含量会明显增加,以适应逆境胁迫<sup>[13]</sup>。本试验中,化学污染物(Cd、TCB)处理的小麦幼苗叶片,其可溶性蛋白的凝胶图谱与对照的不同,说明污染影响小麦幼苗可溶性蛋白质的含量与组分。本试验设定了 2 种不同污染物处理小麦幼苗。试验结果表明,Cd 和 TCB 污染抑制了一些蛋白质的表达,但同时也诱导 12 个 TCB 诱导蛋白和 10 个 Cd 诱导蛋白的蛋白质表达,其中,既有 Cd 和 TCB 污染的共同诱导蛋白,也有为 Cd 或 TCB 特异性诱导蛋白,这与已有研究结果基本一致<sup>[14]</sup>。其次,植物在由正常生长转到一个污染环境下生长后,体内的部分蛋白表达会受到抑制<sup>[15]</sup>,但随着时间的延长,植物本身的逆境应答机制就会做出反应,一些新的蛋白被诱导出,这些蛋白很有可能是

与抗逆密切相关的蛋白。这种随环境的变化小麦叶片蛋白质组成发生变化是事实存在的,但还要通过蛋白质组学的研究(蛋白质序列分析、相关基因的研究、蛋白质功能的分析等)进一步阐明小麦抗逆性的分子机制。

#### 4 结 论

1)本试验中,采用PEG分步提取法提取叶片的可溶性蛋白,与传统的冷丙酮/三氯乙酸沉淀蛋白质相比较,提高了蛋白质的纯度和电泳图谱的清晰度,同时一些低丰度蛋白得以体现。

2)TCB和Cd污染处理使小麦幼苗体内含水率减少,且造成膜脂过氧化程度加剧。

3)TCB和Cd污染诱导小麦体内产生相应的诱导蛋白,对这些诱导蛋白的类型和功能进行分析,再根据诱导蛋白的氨基酸序列可能确定与胁迫适应性密切相关的候选基因,进而为耐化学污染作物品种的选育提供基因资源。

#### 参 考 文 献

- [1] 葛才林,孙锦荷. 重金属胁迫引起的水稻和小麦幼苗DNA损伤[J]. 植物生理与分子生物学报,2002,28(6):419-424
- [2] Reddy G N, Prasad M N V. Cadmium-induced phosphorylation change in rice seedlings[J]. Plant Physiol,1995,145:67-70
- [3] Pnueli L, Hallak-Herr E, Rozenberg M, et al. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*[J]. Plant,2002,31:319-330
- [4] 张宪政. 作物生理研究法[M]. 北京:农业出版社,1992
- [5] Tanhan P, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, et al. Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson][J]. Chemosphere, 2007,68:323-329
- [6] Lindberg S, Landberg T, Greger M. Cadmium uptake and interaction with phytochelatins in wheat protoplasts[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2007,45:47-53
- [7] 慈敦伟,姜东,戴廷波,等. 镉胁迫对小麦幼苗膜脂过氧化作用及镉吸收转运的影响[J]. 麦类作物学报,2009,29(3):508-513
- [8] 葛才林,万定珍,王泽港,等. 水稻根系对1,2,4-三氯苯胁迫的应答[J]. 作物学报,2007,33(12):1991-2000
- [9] Wang Ze-gang, Wan Ding-zhen, Yang Yan-Chang, et al. Effects of 1,2,4-trichlorobenzene and naphthalene on grain yield and quality of rice[J]. Journal of Rice Science,2006,20(3):295-300
- [10] 汤春芳,刘云国,曾光明,等. 镉胁迫对萝卜幼苗活性氧产生、脂质过氧化和抗氧化酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2004,30(4):106-112
- [11] 王兴明,涂俊芳,李晶,等. 镉处理对油菜生长和抗氧化酶系统的影响[J]. 应用生态学报,2006,17(1):102-106
- [12] 江行玉,赵可夫. 植物重金属伤害及其机理[J]. 应用与环境生物学报,2001,7(1):92-99
- [13] 王泽港,葛才林,万定珍,等. 1,2,4-三氯苯和萘对水稻幼苗生长的影响[J]. 农业环境科学学报,2006,25(6):1402-1407
- [14] Ge Cai-lin, Wan Ding-zhen, Wang Ze-gang, et al. A proteomic analysis of rice seedlings responding to 1,2,4-trichlorobenzene stress[J]. Journal of Environmental Sciences,2008,20(3):309-319
- [15] 王小丽,裴玉贺,张恩盈,等. 低温胁迫下玉米叶片蛋白质的双向电泳分析[J]. 玉米科学,2009,17(1):96-98,101

(责任编辑:刘迎春)