

## 两个箭舌豌豆品种根响应镉胁迫的蛋白质组学分析

芮海云<sup>1,2</sup>, 庄凯<sup>2</sup>, 沈振国<sup>2</sup>, 张芬琴<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>泰州学院医药与化学化工学院, 江苏泰州225300; <sup>2</sup>南京农业大学生命科学学院, 南京210095; <sup>3</sup>河西学院农业与生物技术学院, 甘肃张掖734000

**摘要:** 为探讨箭舌豌豆根响应镉胁迫的分子机理, 以两个镉耐性差异的箭舌豌豆品种(镉耐性品种‘L3’, 镉敏感品种‘ZM’)为材料, 通过双向电泳和基质辅助激光解析/电离时间飞行质谱技术以及NCBI数据库搜索, 分析25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CdCl}_2$ 处理5 d后两个品种根蛋白质的差异表达。结果表明, 镉胁迫下‘L3’和‘ZM’根共有56个蛋白点的表达量发生显著变化, 其中5个蛋白点在两个品种根中共同上调, 1个蛋白点共同下调, 4个蛋白点为镉处理后两个品种中共同新出现。28个差异表达蛋白点得到鉴定, 这些蛋白质的功能可分为七类: (1)抗氧化与解毒相关蛋白; (2)呼吸与能量代谢相关蛋白; (3)胁迫响应相关蛋白; (4)信号转导相关蛋白; (5)细胞壁合成相关蛋白; (6)细胞增殖相关蛋白; (7)未知功能蛋白。镉胁迫下耐性品种‘L3’较敏感品种‘ZM’鉴定到更多抗氧化解毒、胁迫响应和细胞增殖蛋白的上调表达, 这可能是耐性品种‘L3’较敏感品种‘ZM’具有更强镉耐性的重要原因; 生长素、水杨酸和乙烯诱导的信号转导途径可能参与箭舌豌豆对镉胁迫的响应。

**关键词:** 箭舌豌豆; 镉; 根; 蛋白质组学

土壤重金属污染影响农作物产量并通过食物链威胁人类健康, 已成为世界性的环境问题, 受到人们越来越广泛的关注。有关植物重金属耐性机理的研究也逐渐成为国内外的研究热点。镉是毒性最强的重金属之一, 植物体内镉吸收、转运、胁迫和解毒的过程已被广泛研究, 但其机理尚未完全清楚。植物可以通过基因表达和蛋白质合成的快速变化对生物和非生物胁迫作出响应。鉴定参与植物重金属胁迫响应的功能基因或蛋白质是理解植物响应重金属胁迫机制的重要途径(Ahsan等2009)。利用DNA芯片和微阵列分析及高通量测序等技术的转录组分析, 已用于植物在重金属胁迫下基因表达模式的研究(Lin等2013; Ogawa等2009; Xu等2015)。蛋白质组学分析结合双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)和质谱(mass spectrometry, MS)技术, 辅以不断发展的数据库, 已成为比较植物在各种胁迫条件下蛋白质差异表达的有力工具。近年来, 已有报道用蛋白质组学技术对模式植物水稻(*Oryza sativa*) (Aina等2007; Hajduch等2001; Lee等2010)、大豆(*Glycine max*) (Ahsan等2012; Hossain等2012)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Roth等2006; Sarry等2006)、镉超积累植物遏蓝菜(*Thlaspi caerulescens*) (Tuomainen等2006)以及衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) (Gillet等2006)、山杨(*Populus tremula*) (Kieffer等2009)等响应镉胁迫机制进行的研究。Tuomainen等(2006)对遏蓝菜3个种质的比较蛋白质组学研

究发现, 镉胁迫下耐性种质中抗氧化相关蛋白显著增加; Kieffer等(2009)对山杨叶片和根响应镉胁迫的蛋白质组学研究发现, 热休克蛋白和病程相关蛋白等典型的胁迫响应蛋白上调。Sarry等(2006)对拟南芥悬浮细胞的蛋白质组学研究表明, 拟南芥细胞通过激活碳、氮和硫代谢, 启动有关螯合物如谷胱甘肽(glutathione, GSH)和植物螯合肽的合成响应镉胁迫, 同时几种抗氧化酶, 如过氧化氢酶、单脱氢抗坏血酸还原酶, 以及几种谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferase, GST)同工酶和热休克蛋白(heat shock protein, HSP)表达上调。Aina等(2007)对高镉(100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )条件下水稻蛋白质组的研究表明, 高浓度镉诱导水稻根中木质素合成相关的肉桂醇脱氢酶活性升高, 细胞色素P450和细胞周期蛋白的表达被抑制, 细胞分裂素氧化酶的合成被诱导。Elobeid等(2012)报道镉处理降低植物生长素含量, 还有报道植物镉暴露会诱导茉莉酸、脱落酸、乙烯和水杨酸等植物激素含量的增加(DalCorso等2008)。

箭舌豌豆(*Vicia sativa*)是豆科野豌豆属植物, 具有较高的营养价值和较强的抗寒旱特性以及固氮和改善土壤结构的能力, 是适宜在高寒高海拔地区栽培的优良牧草。本研究拟通过对我们前期筛

收稿 2016-05-09 修定 2016-06-14

资助 国家自然科学基金(31160053和31560072)和泰州学院博士基金(TZXY2015JB005)。

\* 通讯作者(E-mail: fenqinzh@163.com)。

选得到的两个镉耐性差异的箭舌豌豆品种(镉耐性品种‘L3’, 镉敏感品种‘ZM’)响应镉胁迫的差异蛋白质组学分析, 鉴定箭舌豌豆镉胁迫响应蛋白, 进一步研究植物响应镉胁迫的分子机制。

## 材料与方 法

### 1 实验材料与处理

以箭舌豌豆(*Vicia sativa* L.) Cd耐性差异的两个品种(镉耐性品种‘L3’, 镉敏感品种‘ZM’)为实验材料。种子经3%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消毒15 min, 去离子水彻底冲洗后, 浸种16 h, 转移至蛭石中20~25°C萌发。3 d后, 挑选长势良好且一致的幼苗转移至含2.5 L Hoagland营养液的培养钵中培养, 昼夜温度25°C/20°C, 相对湿度60%~80%, 光照时间12 h, 光照强度400 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。营养液pH控制在5.5左右, 每3 d换一次。移苗7 d后, 营养液中添加25 μmol·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub>处理(不添加为对照), 每个处理设3个重复。处理5 d后收获, 在距离根和地上部过渡区2 cm处将根切下, 用去离子水清洗3遍, 吸水纸吸干后立即保存在液氮中。

### 2 蛋白质提取与含量测定

根样品在液氮中充分研磨, 加入10倍体积含10%三氯乙酸(TCA)和0.07% β-巯基乙醇(DTT) (W/V)的冰丙酮, 充分涡旋混匀, -20°C沉淀过夜。4°C、10 000×g离心30 min, 收集沉淀, 在含0.07% DTT和10% TCA的丙酮中重悬混匀, -20°C放置1 h, 4°C、10 000×g离心15 min, 收集沉淀。重复重悬与沉淀过程3次, 沉淀经低温真空干燥得到粉末状蛋白质。称取适量蛋白质干粉, 每mg加入20~30 μL裂解液[7 mol·L<sup>-1</sup>尿素、2 mol·L<sup>-1</sup>硫脲、4% (W/V) CHAPS、0.2% (W/V) Bio-lytes (pH 3~10)、65 mmol·L<sup>-1</sup> DTT], 于30°C摇床中振荡裂解1 h, 室温12 000×g离心15 min; 取上清液, 加入4倍体积-20°C冰丙酮, 悬浮混匀, -20°C沉淀2 h, 4°C、12 000×g离心15 min, 收集沉淀, 低温真空干燥; 再加入适量裂解液, 充分溶解后, 4°C、10 000×g离心15 min。取上清液, Bradford法进行蛋白质定量, 然后分装至Eppendorf管, 液氮速冻后-80°C保存。

### 3 双向电泳

#### 3.1 第一向等点聚焦

双向电泳第一向采用长度17 cm、pH 4~7的

线性干胶条, 取适量蛋白提取液与水化缓冲液[7 mol·L<sup>-1</sup>尿素、2 mol·L<sup>-1</sup>硫脲、4% (W/V) CHAPS、0.001%溴酚蓝, 用前加入65 mmol·L<sup>-1</sup> DTT和0.2% (W/V) Bio-Lyte]混合至总体积300 μL (含蛋白质约100 μg), 然后将混合液沿等电聚焦盘从左至右线性加入, 覆盖上干胶条, 胶面向下, 沿每根胶条均匀滴加1~2 mL矿物油, 以防蒸发。将等电聚焦盘放在等电聚焦仪上, 对准正负极, 设定等电聚焦程序如下: 50 V 聚焦12 h; 250 V聚焦30 min; 1 000 V聚焦1 h; 10 000 V线性聚焦5 h; 10 000 V快速聚焦至总V·h为60 000。第一向电泳结束后, 将胶条放在含2% (W/V) DTT的胶条平衡缓冲液[6 mol·L<sup>-1</sup>尿素、2% (W/V)十二烷基硫酸钠(SDS)、20% (V/V)甘油、0.375 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液(PBS) pH 8.8]中平衡15 min, 再将胶条放在含2.5% (W/V)碘乙酰胺的胶条平衡缓冲液中平衡15 min。

#### 3.2 第二向SDS-PAGE电泳

SDS-PAGE电泳参照Laemmli (1970)的方法, 在Protean Plus Dodeca cell apparatus (Bio-Rad, USA)垂直板电泳槽中进行, 采用12%的SDS-PAGE凝胶。将平衡好的胶条在电极缓冲液中浸洗后, 小心放置于PAGE凝胶上, 用0.5% (W/V)低熔点琼脂糖封胶液(含0.001%溴酚蓝)封固胶条, 接通电源。50 V持续1 h, 然后调整为200 V, 至溴酚蓝跑至凝胶前沿约0.5 cm时, 停止电泳。双向电泳结束后, 将SDS-PAGE凝胶置于固定液(10%冰醋酸、40%甲醇、50%超纯水)中固定1 h, 重复1次后, 敏化剂(0.2%硫代硫酸钠、6.8%无水醋酸钠、30%甲醇)敏化30 min, 超纯水洗4次; 银染液[0.1% (W/V) AgNO<sub>3</sub>、0.02% (V/V)甲醛]银染30 min, 超纯水洗3次; 显色液[2.5% (W/V) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、0.04% (V/V)甲醛]显色至小的蛋白点清晰为止, 终止液[1.46% (W/V) EDTA-Na<sub>2</sub>]终止30 min, 超纯水洗3次。

### 4 图像获取和分析

银染后的胶用UMAX Powerlook III (UMAX Technologies, USA)扫描仪进行透射扫描, 分辨率为300 dpi。使用PDQuest软件(Version 8.0; Bio-Rad)对得到的2-DE图像上的点进行自动探测和匹配, 再用手重新检查检测到的点和匹配情况, 进行修正。蛋白斑点的量被定义为构成这个点的所有像素强度值的总和。以一个蛋白点的量占该胶

内所有蛋白点总量的百分数, 作为该点的相对含量(% Vol), 以比较不同样品胶内蛋白斑点量的变化。每个处理设3个重复, 蛋白质点在3个重复内被发现才被认为是真实的蛋白质点, 蛋白点表达量差异显著性用Student's *t*检验(95%显著水平)。表达丰度超过2倍差异, 且Student's *t*检验( $P < 0.05$ )存在显著性差异的点被作为差异表达的点。

### 5 质谱鉴定和数据库分析

差异蛋白质点使用基质辅助激光解析/电离时间飞行质谱仪(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer, MAL-DL-TOF MS) (Reflex III; Bruker-Daltonics)进行分

析, 所得的肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprints, PMF)数据用MASCOT软件(<http://www.matrixscience.com>; London, UK)进行在线检索, NCBI nr 20130519 (25779625序列)作为检索数据库。根据MASCOT显著性分析, 存在显著性差异( $P < 0.05$ )的结果鉴定为有效。

## 实验结果

### 1 两个箭舌豌豆品种根总蛋白双向电泳分析

对照和 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd处理的两个箭舌豌豆品种根的总蛋白, 提取后进行双向电泳, 3个重复, 均能获得较好的重现性, 其代表性图谱如图1所示。

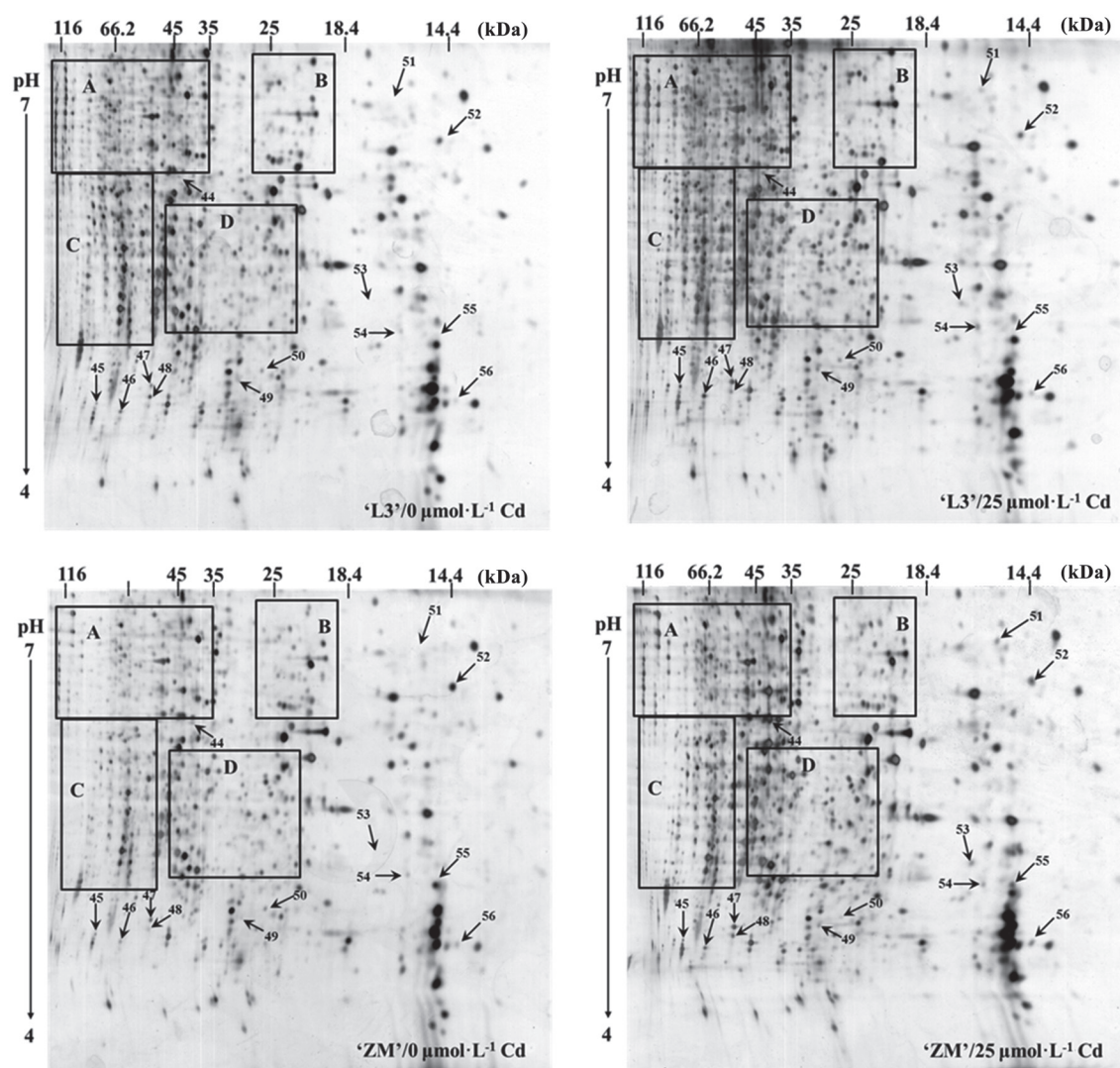


图1 两个箭舌豌豆品种‘L3’和‘ZM’根总蛋白的代表性2-DE图谱

Fig. 1 Representative 2-DE maps of the total protein from the roots of two *V. sativa* varieties ‘L3’ and ‘ZM’  
方框区域在图2中被放大。箭头所指是在‘L3’或‘ZM’根中响应镉胁迫的差异表达蛋白点。

2-DE图谱数字化后利用PDQuest 8.0软件(Bio-Rad)对所获得的图谱进行点匹配、量化分析和数据统计,发现 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd处理5 d后,两个箭舌豌豆品种根系共有56个蛋白点在表达量上有显著变化( $P<0.05$ 且上调或下调表达大于2倍)(图1、2),其中‘L3’根系中20个蛋白点上调表达,‘ZM’根系中16个

蛋白点上调表达,5个蛋白点为两个箭舌豌豆品种中共同上调(‘L3’的相对丰度率显著高于‘ZM’的有2个(点2、37),有1个点相反(点48),其他2个点品种间差异不显著(点5、56)。(‘L3’根系中10个蛋白点下调表达,‘ZM’根系中9个蛋白点下调表达,1个蛋白点为两个箭舌豌豆品种中共同下调(点24,相对

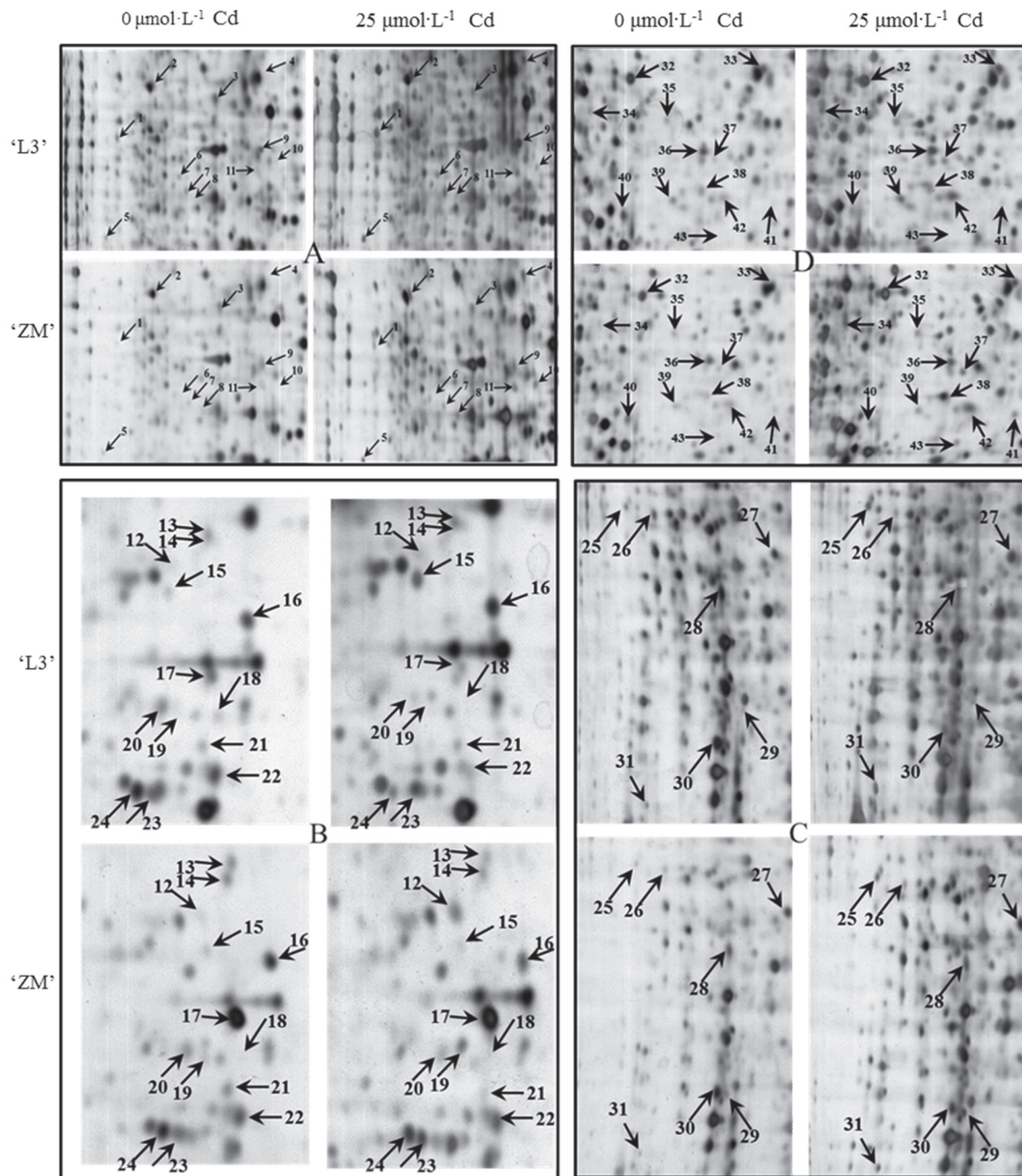


图2 图1方框区域的放大

Fig.2 Enlargements of the framed areas shown in Fig.1  
箭头所指是在‘L3’或‘ZM’根中响应镉胁迫的差异表达蛋白点。

丰度率两个品种间没有显著差异); ‘L3’根系中有6个蛋白点为镉处理后新出现(点4、10、29、44、51、53), ‘ZM’根系中有5个蛋白点为镉处理后新出现(点4、10、51、53、55), 其中4个蛋白点在‘L3’和‘ZM’中为共同新出现(点4、10、51、53)。

## 2 两个箭舌豌豆品种根响应镉胁迫差异表达蛋白点的质谱鉴定

利用MALDI-TOF MS对差异表达蛋白点进行质谱分析, 28个蛋白质点成功鉴定, 其中22个可确定其生物学功能(79%) (表1)。鉴定出的28个蛋白质点中14个上调, 4个新出现, 10个下调。这些蛋白质可分为7个功能类别(图3), 抗氧化与解毒相关(6个蛋白质点, 21%)、呼吸与能量代谢相关(6个蛋白质点, 21%)、胁迫响应相关(4个蛋白质点, 14%)、细胞壁合成相关(3个蛋白质点, 11%)、信号转导相关(2个蛋白质点, 7%)、细胞增殖相关(1个蛋白质点, 4%)和未知功能(6个蛋白质点, 21%)。

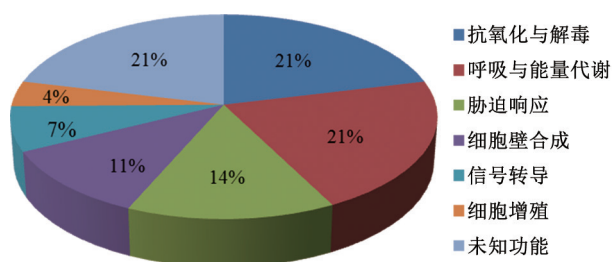


图3 两个箭舌豌豆品种‘L3’和‘ZM’根响应镉胁迫的差异表达蛋白质功能分类

Fig.3 Primary function classification of differential proteins in response to Cd stress in the roots of two *V. sativa* varieties ‘L3’ or ‘ZM’

## 讨 论

### 1 抗氧化与解毒相关蛋白

镉胁迫常导致氧化胁迫。我们前期的研究已发现相同镉处理浓度下‘ZM’较‘L3’受到更严重的氧化胁迫(Rui等2016)。在鉴定到的差异表达蛋白质中, 抗氧化与解毒相关蛋白占25%。两个箭舌豌豆品种中各有一个GST同工酶上调表达(‘L3’, 点15; ‘ZM’, 点12)。GSTs可以催化GSH与各种疏水、亲电子的内源和外源化合物结合或以GSH为还原剂使它们被还原而起到解毒作用。GST表达的增强已经被认为是植物对胁迫响应的重要标志

之一(Edwards等2000)。镉胁迫下, GST可以通过催化GSH清除活性氧或与膜脂过氧化产物结合, 而减轻镉胁迫诱导的氧化胁迫损伤。Kieffer等(2009)研究发现, 镉胁迫下山杨根多种GST同工酶上调表达。镉处理的拟南芥培养细胞也鉴定到GST的上调表达(Sarry等2006)。Kumar等(2013)研究发现, 过表达GST的转基因拟南芥对重金属的耐性提高。

S-腺苷甲硫氨酸合成酶(*S*-adenosylmethionine synthetase, SAMS)在耐性品种‘L3’中上调2倍(点27)。SAMS在所有生物中普遍存在, 它催化L-甲硫氨酸和ATP合成*S*-腺苷甲硫氨酸(*S*-adenosylmethionine, SAM) (Chiang等1996)。SAM是植物体内多种甲基转移酶催化反应的甲基供体, 其含量变化可能对细胞的生长、分化及代谢产生巨大影响(Vanbreusegem等1994)。SAMS催化由甲硫氨酸合成半胱氨酸的第一步反应, 促进GSH的合成。SAM也是乙烯生物合成路径关键的前体物质(Rodriguez-Serrano等2006)。在重金属胁迫下SAM丰度增加(Fukuda等2007; Sarry等2006; Yang等2007)可能导致乙烯的产生(Yakimova等2006)。另外SAM也是果胶和木质素合成的甲基供体(Moffatt等2002), 涉及细胞壁物理化学性质的改变。蛋白质组学研究鉴定到铬(Zeng等2014)、砷(Ahsan等2008)处理的水稻根和铝处理的番茄(*Solanum lycopersicum*)根(Zhou等2009)中SAMS的表达显著上调。SAMS表达的上调已经被认为是缓解重金属毒性的重要方面(Hossain等2012)。

苹果酸酶能与氧化型辅酶NAD(P)<sup>+</sup>结合, 催化苹果酸氧化脱羧生成丙酮酸盐和二氧化碳, NAD(P)<sup>+</sup>则被还原为NAD(P)H。在盐、干旱、温度、紫外辐射和机械损伤等胁迫下, 植物体内的苹果酸酶活性增大(Casati等1997; Zhou等2011)。本实验中, 耐性品种‘L3’苹果酸酶的表达上调了3.26倍(点1), 提示苹果酸酶在耐性品种‘L3’对镉胁迫的响应中起着重要作用。苹果酸酶参与防卫应答的机制可能是其产生NAD(P)H, 增强植物的还原力(Casati等1999)。

T-细胞质雄性不育恢复因子2(点2)属于醛脱氢酶家族, 除了能清除体内的醛类物质, 还具有抗氧化作用。该蛋白在两个品种根中均显著上调, ‘L3’显著大于‘ZM’。

表1 两个箭舌豌豆品种根响应镉胁迫差异表达蛋白点的质谱鉴定

Table 1 Identification of the differentially expressed proteins in the roots of two *V. sativa* varieties in response to cadmium stress by PMF

蛋白编号 <sup>a</sup>	倍率变化 <sup>b</sup>		序列覆盖率/%	匹配肽段数	得分	分子量/等电点		蛋白质名称	NCBI登录号
	'L3'	'ZM'				理论值	观察值		
抗氧化与解毒相关蛋白点									
1	3.26↑	-	18	9	478	65.6/6.0	76.2/6.0	苹果酸酶[蒺藜苜蓿]	gi 357520877
2	3.94↑	2.40↑	4	2	82	59.7/6.9	62.2/6.3	T-细胞质雄性不育恢复因子2 [玉米]	gi 14276718
4	出现	出现	10	4	172	55.1/6.0	33.5/6.3	醛酮还原酶[蒺藜苜蓿]	gi 357502821
12	-	3.52↑	12	2	78	25.8/6.0	21.4/6.2	推测的谷胱甘肽硫转移酶[鹰嘴豆]	gi 502088028
15	3.85↑	-	9	2	106	26.8/5.0	21.8/6.1	谷胱甘肽硫转移酶[豌豆]	gi 37051105
27	2.00↑	-	25	5	335	37.8/6.3	42.1/5.4	硫腺苷甲硫氨酸合成酶2 [豌豆]	gi 37051117
呼吸与能量代谢相关蛋白点									
3	0.42↓	-	15	5	219	46.9/6.5	44.6/6.2	NADP依赖的异柠檬酸脱氢酶[桃树]	gi 15982950
22	0.24↓	-	13	3	61	21.7/6.1	18.8/5.7	苯醌还原酶[棉花]	gi 124488474
26	0.46↓	-	11	4	201	60.7/5.4	67.8/5.4	2,3-二磷酸甘油酸依赖的磷酸甘油酸变位酶[蒺藜苜蓿]	gi 357506803
28	0.48↓	-	19	6	434	47.7/5.4	54.4/5.2	推测的烯醇化酶[鹰嘴豆]	gi 502111700
30	0.47↓	-	15	6	520	60.2/6.6	62.2/4.8	F <sub>1</sub> ATP酶[豌豆]	gi 2116558
40	0.38↓	-	20	5	282	35.4/5.2	32.5/4.7	果糖激酶[蒺藜苜蓿]	gi 357454485
胁迫响应相关蛋白点									
5	2.37↑	2.69↑	12	5	287	65.8/5.9	71.2/5.6	推测的热休克蛋白STI [鹰嘴豆]	gi 502160177
25	2.13↑	-	7	1	92	51.6/5.5	76.2/5.5	胁迫诱导蛋白STI [四翅滨藜]	gi 379319193
45	3.43↑	-	14	6	191	62.0/5.2	67.0/4.2	60 kDa分子伴侣α亚单位[豌豆]	gi 1710807
53	出现	出现	7	1	42	15.9/8.9	16.4/4.7	推测的17.5 kDa类I热休克蛋白[大豆]	gi 356508927
细胞壁合成相关蛋白点									
9	4.37↑	-	3	1	64	37.0/5.6	31.4/6.0	NAD-依赖的表异构酶/脱水酶[蒺藜苜蓿]	gi 124360303
32	-	3.14↑	3	2	56	37.0/5.6	39.0/5.2	NAD-依赖的表异构酶/脱水酶[蒺藜苜蓿]	gi 124360303
50	-	0.40↓	15	2	121	27.8/5.7	26.9/5.5	咖啡酰辅酶A 3-O-甲基转移酶[紫花苜蓿]	gi 351723011
信号转导相关蛋白点									
10	出现	出现	8	2	117	34.3/7.1	32.3/5.8	生长素诱导蛋白PCNT115 [烟草]	gi 728744
47	-	2.26↑	2	1	49	41.1/5.3	44.5/4.2	水杨酸羧甲基转移酶[微甘菊]	gi 227278441
细胞增殖相关蛋白点									
7	2.45↑	-	7	2	80	36.4/6.8	47.6/5.8	ERBB-3结合蛋白1 X3型[鹰嘴豆]	gi 828292653
未知功能蛋白点									
14	-	0.40↓	13	2	89	24.9/6.2	19.2/6.4	未知[百脉根]	gi 388498922
17	0.44↓	-	8	1	53	23.4/5.9	18.0/5.8	未知[蒺藜苜蓿]	gi 217072212
20	0.13↓	-	5	1	75	27.5/7.6	20.1/5.8	推测的蛋白SELMODRAFT_73442 [江南卷柏]	gi 302753924
29	出现	-	4	2	75	60.0/5.9	53.2/4.8	未知[蒺藜苜蓿]	gi 217075747
49	-	2.22↑	6	1	72	23.2/6.9	25.6/4.2	未知[毛果杨]	gi 118484404
54	2.41↑	-	15	2	49	21.2/5.4	15.0/4.6	F16A14.17 [拟南芥]	gi 8778393

a: 对应于2-DE凝胶的编号; b: 镉处理样品与对照样品蛋白点相对含量(% Vol)的比值, 蛋白表达显著上调(↑)或下调(↓); “-”表示未显著上调或下调。

镉处理后两个箭舌豌豆品种根中都新鉴定到一个醛酮还原酶(点4)。醛酮还原酶通过提高细胞醛酮清除能力、降低醛酮引起的氧化应激, 参与细胞的解毒过程(Zhang和Riechers 2004)。小麦(*Triticum tauschii*)的蛋白质组学研究中, 鉴定到三个醛酮还原酶同工酶响应杀虫剂胁迫上调(Zhang和Riechers

2004)。Bona等(2007)研究发现铜胁迫的大麻(*Cannabis sativa*)根中两个醛酮还原酶分别上调5.5倍和2倍。

从鉴定到的抗氧化和解毒相关蛋白点分析, 镉胁迫下耐性品种‘L3’较敏感品种‘ZM’有更多的抗氧化和解毒蛋白点上调或上调更显著, 显示镉胁迫下‘L3’较‘ZM’更强的抗氧化和解毒能力。

## 2 呼吸和能量代谢相关蛋白

在耐性品种‘L3’中鉴定到两个与糖酵解相关蛋白点: 推测的烯醇化酶(点28)下调表达0.48倍; 2,3-二磷酸甘油酸依赖的磷酸甘油酸变位酶(点26)下调表达0.46倍; 一个与三羧酸循环相关的蛋白点: NADP依赖的异柠檬酸脱氢酶(点3)下调表达0.42倍。烯醇化酶催化糖酵解过程中2-磷酸甘油酸到磷酸烯醇式丙酮酸的反应; 2,3-二磷酸甘油酸依赖的磷酸甘油酸变位酶以甘油酸-2,3-二磷酸为辅酶催化甘油酸-3-磷酸与甘油酸-2-磷酸的相互转变; NADP依赖的异柠檬酸脱氢酶是三羧酸循环中催化异柠檬酸氧化脱羧生成 $\alpha$ -酮戊二酸的酶, 是三羧酸循环中的限速酶, 反应脱下的氢由NADP<sup>+</sup>接受生成NADPH和H<sup>+</sup>。蔗糖是大多数高等植物的糖类物质从源到库运输的主要形式, 进入库器官的蔗糖进一步被分解为果糖和葡萄糖, 果糖激酶催化果糖磷酸化, 进一步在库组织中代谢。同时果糖激酶还可作为糖感受器和信号分子调控植物的代谢和生长发育(崔娜等2010)。本实验中, 鉴定到耐性品种‘L3’中果糖激酶在镉处理后显著下调0.38倍(点40)。苯醌还原酶参与呼吸链电子传递, 耐性品种‘L3’中鉴定到苯醌还原酶(点22)下调0.24倍, 苯醌还原酶的下调表达会降低呼吸链的电子传递。F<sub>1</sub>ATP酶存在于真核生物线粒体内膜和类囊体膜, 能利用质子梯度驱动ATP的合成, 耐性品种‘L3’中鉴定到一个F<sub>1</sub>ATP酶蛋白(点30)下调0.47倍。F<sub>1</sub>ATP酶表达下调, 会降低ATP的合成。

一般认为镉胁迫下, 植物糖酵解、三羧酸循环相关酶和呼吸链电子传递酶的上调表达, 可以满足植物细胞应对镉胁迫一系列反应的能量需求(Hossain等2012)。如Daud等(2015)报道镉胁迫下陆地棉(*Gossypium hirsutum*)叶中3-磷酸甘油醛脱氢酶表达上调; Gillet等(2006)报道镉胁迫下衣藻ATP酶表达上调。当植物受伤害严重时, 相关酶活性会降低, 能量产生减少。如山杨根在镉胁迫下, 从糖酵解到三羧酸循环相关蛋白都受到强烈影响, 表达丰度显著下调(Kieffer等2009)。

本实验中共鉴定到耐性品种‘L3’根中6个糖酵解、三羧酸循环和呼吸链电子传递相关的蛋白点下调, 而‘ZM’根中这些蛋白点的相对丰度率未见显著变化。可能两个箭舌豌豆品种响应镉胁迫的

机制存在较大差异(这一点从镉胁迫下两个品种根中共同上调和下调的蛋白质较少可以推测)。Hossain等(2012)也报道烯醇化酶在大豆镉高积累品种‘Harosoy’中升高, 而在镉低积累品种‘Fukuyutaka’中降低。镉胁迫下耐性品种‘L3’的呼吸和能量代谢过程较敏感品种‘ZM’受到更复杂系统的调节, 其机制还需要进一步的深入研究。

## 3 胁迫响应相关蛋白

蛋白变性是非生物胁迫的普遍结果。镉因其与钙、铁、锌等必需元素的化学相似性和易与含巯基的蛋白质结合而导致蛋白质中必需元素被取代和蛋白变性, 使重要的酶或蛋白质失活, 干扰细胞代谢。分子伴侣如HSP负责蛋白的正确折叠、组装和转运(Wang等2004)。胁迫条件下, HSP能帮助错误折叠的蛋白重新折叠, 因此在抵御胁迫重新建立正常的蛋白构象因而维持细胞的平衡中发挥重要作用。在各种非生物胁迫下, 植物体内的HSP蛋白表达上调(Ahsan等2007; Hall 2002; Kieffer等2009; Sarry等2006)。本研究在镉耐性品种‘L3’中, 鉴定到一个60 kDa分子伴侣的 $\alpha$ 亚单位上调3.43倍(点45)。两个箭舌豌豆品种同时鉴定到一个推测的17.5 kDa HSP(点53)新出现。STI1 (stress-inducible protein-1)是真核生物普遍存在的胁迫诱导蛋白, 是一类进化保守的、调节细胞胁迫应答的分子伴侣。STI1通过TPR (tetratricopeptide repeat)结构与HSP70和HSP90作用, 调节其与配体蛋白的作用(Flom等2007; Richter等2003)。本实验中, 耐性品种‘L3’鉴定到两个STI1蛋白(点5、25)显著上调, 敏感品种鉴定到一个STI1蛋白(点5)显著上调。

从鉴定到的胁迫相关蛋白分析, 镉胁迫下耐性品种‘L3’根中有较‘ZM’更多的胁迫相关蛋白受到诱导。

## 4 信号转导相关蛋白

水杨酸羧甲基转移酶(salicylic acid carboxyl methyltransferase, SAMT)是亚单位分子量为40.3 kDa的二聚体, 利用SAM作为甲基供体, 催化水杨酸(salicylic acid, SA)生成水杨酸甲酯(methyl salicylate, MeSA)。SA和MeSA是植物应对胁迫反应的信号分子, 可以强化植物抗逆性, 处于逆境中的植物SA浓度增大(苗进等2007)。镉胁迫下, 敏感品种‘ZM’根中鉴定到一个信号转导相关蛋白SAMT(点

47)上调2.26倍,提示SA和MeSA作为生长调节剂介导了箭舌豌豆镉胁迫响应的过程。

两个箭舌豌豆品种根在镉处理后均新出现一个生长素诱导蛋白PCNT115(点10)蛋白点,也提示生长素作为生长调节剂介导了箭舌豌豆镉胁迫响应过程。Bona等(2007)通过蛋白质组学研究发现,铜胁迫下大麻根中一个生长素诱导蛋白上调2倍。

### 5 细胞壁合成相关蛋白

NAD依赖的表异构酶/脱水酶(NAD-dependent epimerase/dehydratase, NED)在碳代谢和胞外多糖合成中发挥重要作用(Seifert 2004)。实验中两个箭舌豌豆品种根中各鉴定到一个NED,在‘L3’中镉处理后上调4.37倍(点9),在‘ZM’中镉处理后上调3.14倍(点32)。该蛋白可能参与箭舌豌豆细胞壁对镉胁迫的响应过程。

许多研究表明植物根的木质化过程与重金属对植物的胁迫正相关,木质素可能在阻止镉从根到地上部的转运中发挥保护作用(Ahsan等2012)。我们前期的生理实验中测定到镉胁迫下两个箭舌豌豆品种根中木质素含量升高(Rui等2016)。咖啡酰辅酶A 3-O-甲基转移酶(caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase, CCoAOMT)是参与木质素生物合成的关键酶之一,调控木质素的含量和组成。CCoAOMT可能主要参与G型木质素前体的生物合成(Humphrey等1999; Osakabe等1999)。反义抑制CCoAOMT表达的转基因烟草与杨树中S型木质素和G型木质素的比值(S/G)升高(Zhong等1998, 2000)。本实验中鉴定到镉处理后敏感品种‘ZM’根中一个CCoAOMT蛋白点(点50)下调表达。

由鉴定到的细胞壁合成相关蛋白分析,两个箭舌豌豆品种可能通过细胞壁成分的改变积极响应镉胁迫。

### 6 细胞增殖相关蛋白

ERBB3结合蛋白1(EBP1)是增殖调节蛋白2G4(proliferation regulated proteins 2G4)家族成员,为ERBB3细胞质区域的结合蛋白,是植物细胞生长和增殖的重要调控因子。EBP1蛋白在耐性品种‘L3’中上调2.45倍(点7),该蛋白为生长素依赖型,在生长素诱导的信号转导途径中发挥作用,也提示在箭舌豌豆根中生长素作为生长调节剂介导了镉胁迫响应过程。沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)中克隆得到的EBP1基因在拟南芥中具有

促进器官增大的作用(Cao等2009)。EBP1蛋白在耐性品种‘L3’中显著上调,可能促进镉胁迫下‘L3’根细胞的分裂和生长,降低镉对根生长的抑制作用。

镉胁迫下,两个箭舌豌豆品种根中共同上调和下调的蛋白质较少,说明两个品种对镉胁迫的响应机制存在较大差异。两个品种根中鉴定到的镉胁迫响应蛋白涉及抗氧化解毒、呼吸和能量代谢、胁迫响应、信号转导、细胞壁合成和细胞增殖等。与敏感品种‘ZM’相比,镉胁迫下耐性品种‘L3’鉴定到更多参与抗氧化解毒、胁迫响应和细胞增殖的蛋白质的上调表达,这可能是耐性品种‘L3’较敏感品种‘ZM’具有更强镉耐性的原因之一。两个箭舌豌豆品种根细胞壁的合成积极响应镉胁迫。生长素、水杨酸和乙烯等激素诱导的信号转导途径可能在箭舌豌豆对镉胁迫的响应中发挥作用。

### 参考文献

- Ahsan N, Lee DG, Lee SH, Kang KY, Lee JJ, Kim PJ, Yoon HS, Kim JS, Lee BH (2007). Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere*, 67: 1182–1193
- Ahsan N, Lee DG, Alam I, Kim PJ, Lee JJ, Ahn YO, Kwak SS, Lee IJ, Bahk JD, Kang KY, et al (2008). Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics*, 8: 3561–3576
- Ahsan N, Renaut J, Komatsu S (2009). Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics*, 9: 2602–2621
- Ahsan N, Nakamura T, Komatsu S (2012). Differential responses of microsomal proteins and metabolites in two contrasting cadmium (Cd)-accumulating soybean cultivars under Cd stress. *Amino Acids*, 42: 317–327
- Aina R, Labra M, Fumagalli P, Vannini C, Marsoni M, Cucchi U, Bracale M, Sgorbati S, Citterio S (2007). Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environ Exp Bot*, 59: 381–392
- Bona E, Marsano F, Cavaletto M, Berta G (2007). Proteomic characterization of copper stress response in *Cannabis sativa* roots. *Proteomics*, 7: 1121–1130
- Cao P, Song J, Zhou C, Weng M, Liu J, Wang F, Zhao F, Feng D, Wang B (2009). Characterization of multiple cold induced genes from *Ammopiptanthus mongolicus* and functional analyses of gene *AmEBP1*. *Plant Mol Biol*, 69 (5): 529–539
- Casati P, Drincovich MF, Edwards GE, Andreo CS (1999). Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. *Photosynth Res*, 61: 99–105
- Casati P, Spampinato CP, Andreo CS (1997). Characteristics and physiological function of NADP-malic enzyme from wheat. *Plant Cell Physiol*, 38 (8): 928–934



- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996). S-adenosylmethionine and methylation. *Faseb J*, 10: 471–480
- Cui N, Wang WP, Lin F, Bai LP, Zhang YL (2010). Update on fructokinase in higher plants. *Chin Agric Sci Bull*, 26 (14): 41–47 (in Chinese with English abstract) [崔娜, 王卫平, 林凤, 白丽萍, 张玉龙(2010). 植物果糖激酶的研究进展. *中国农学通报*, 26 (14): 41–47]
- DalCorso G, Farinati S, Maistri S, Furini A (2008). How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J Integr Plant Biol*, 50 (10): 1268–1280
- Daud MK, Quiling H, Lei M, Ali B, Zhu SJ (2015). Ultrastructural, metabolic and proteomic changes in leaves of upland cotton in response to cadmium stress. *Chemosphere*, 120: 309–320
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci*, 5: 193–198
- Elobeid M, Göebel C, Feussner I, Polle A (2012). Cadmium interferes with auxin physiology and lignification in poplar. *J Exp Bot*, 63 (3): 1413–1421
- Flom G, Behal RH, Rosen L, Cole DG, Johnson JL (2007). Definition of the minimal fragments of Stt1 required for dimerization, interaction with Hsp70 and Hsp90 and *in vivo* functions. *Biochem J*, 404: 159–167
- Fukuda T, Saito A, Wasaki J, Shinano T, Osaki M (2007). Metabolic alterations proposed by proteome in rice roots grown under low P and high Al concentration under low pH. *Plant Sci*, 172: 1157–1165
- Gillet S, Decottignies P, Chardonnet S, Le Maréchal P (2006). Cadmium response and redoxin targets in *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic approach. *Photosynth Res*, 89: 201–211
- Hajdúch M, Rakwal R, Agrawal GK, Yonekura M, Pretova A (2001). High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: Drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins. *Electrophoresis*, 22: 2824–2831
- Hall JL (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot*, 53: 1–11
- Hossain Z, Hajika M, Komatsu S (2012). Comparative proteome analysis of high and low cadmium accumulating soybeans under cadmium stress. *Amino Acids*, 43: 2393–2416
- Humphreys JM, Hemm MR, Chapple C (1999). New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 10045–10050
- Kieffer P, Schröder P, Dommes J, Hoffmann L, Renaut J, Hausman JF (2009). Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *J Proteomics*, 72: 379–396
- Kumar S, Asif MH, Chakrabarty D, Tripathi RD, Dubey RS, Trivedi PK (2013). Expression of a rice Lambda class of glutathione S-transferase, *OsGSTL2*, in *Arabidopsis* provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses. *J Hazard Mater*, 248: 228–237
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685
- Lee K, Bae DW, Kim SH, Han HJ, Liu X, Park HC, Lim CO, Lee SY, Chung WS (2010). Comparative proteomic analysis of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium. *J Plant Physiol*, 167: 161–168
- Lin CY, Trinh NN, Fu SF, Hsiung YC, Chia LC, Lin CW, Huang HJ (2013). Comparison of early transcriptome responses to copper and cadmium in rice roots. *Plant Mol Biol*, 81: 507–522
- Miao J, Li GP, Han BY (2007). Recent developments in effect and mechanism of salicylic acid and methyl salicylate on plant resistance to pests. *Chin J Trop Crops*, 28: 111–114 (in Chinese with English abstract) [苗进, 李国平, 韩宝瑜(2007). 水杨酸和水杨酸甲酯在植物抗虫中的作用及机制研究进展. *热带作物学报*, 28: 111–114]
- Moffatt BA, Stevens YY, Allen MS, Snider JD, Pereira LA, Todorova MI, Summers PS, Weretilnyk EA, Martin-McCaffrey L, Wagner C (2002). Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiol*, 128: 812–821
- Ogawa I, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2009). Time course analysis of gene regulation under cadmium stress in rice. *Plant Soil*, 325: 97–108
- Osakabe K, Tsao CC, Li L, Popko JL, Umezawa T, Carraway DT, Smeltzer RH, Joshi CP, Chiang VL (1999). Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 8955–8960
- Richter K, Muschler P, Hainzl O, Reinstein J, Buchner J (2003). Stt1 is a non-competitive inhibitor of the Hsp90 ATPase. *J Biol Chem*, 278: 10328–10333
- Rodriguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM (2006). Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant Cell Environ*, 29: 1532–1544
- Roth U, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S (2006). Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd<sup>2+</sup>. *J Exp Bot*, 57: 4003–4013
- Rui H, Chen C, Zhang X, Shen G, Zhang F (2016). Cd-induced oxidative stress and lignification in the roots of two *Vicia sativa* L. varieties with different Cd tolerances. *J Hazard Mater*, 301: 304–313
- Sarry JE, Kuhn L, Ducruix C, Lafaye A, Junot C, Hugouvieux V, Jourdain A, Bastien O, Fievet JB, Vailhen D, et al (2006). The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics*, 6: 2180–2198
- Seifert GJ (2004). Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 277–284
- Tuomainen MH, Nunan N, Lehesranta SJ, Tervahauta AI, Hassinen VH, Schat H, Koistinen KM, Auriola S, McNicol J, Kärenlampi SO (2006). Multivariate analysis of protein profiles of metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* accessions. *Proteomics*, 6: 3696–3706
- Van Breusegem F, Dekeyser R, Gielen J, Van Montagu M, Caplan A

- (1994). Characterization of a *S*-adenosylmethionine synthetase gene in rice. *Plant Physiol*, 105: 1463–1464
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci*, 9: 244–252
- Xu L, Wang Y, Liu W, Wang J, Zhu X, Zhang K, Yu R, Wang R, Xie Y, Zhang W, et al (2015). De novo sequencing of root transcriptome reveals complex cadmium-responsive regulatory networks in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Sci*, 236: 313–323
- Yakimova ET, Kapchina-Toteva VM, Laarhoven LJ, Harren FM, Woltering EJ (2006). Involvement of ethylene and lipid signalling in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Plant Physiol Biochem*, 44: 581–589
- Yang Q, Wang Y, Zhang J, Shi W, Qian C, Peng X (2007). Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. *Proteomics*, 7: 737–749
- Zeng F, Wu X, Qiu B, Wu F, Jiang L, Zhang G (2014). Physiological and proteomic alterations in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under hexavalent chromium stress. *Planta*, 240: 291–308
- Zhang Q, Riechers DE (2004). Proteomic characterization of herbicide safener-induced proteins in the coleoptile of *Triticum tauschii* seedlings. *Proteomics*, 4: 2058–2071
- Zhong R, Morrison WH, Himmelsbach DS, Poole FL, Ye ZH (2000). Essential role of caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. *Plant Physiol*, 124: 563–577
- Zhong R, Morrison WH, Negrel J, Ye ZH (1998). Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *Plant Cell*, 10: 2033–2045
- Zhou H, Liu S, Yang C (2011). Expression, purification and characterization of *Oryza sativa* L. NAD-malic enzyme in *Escherichia coli*. *Afr J Biotechnol*, 10: 13943–13950
- Zhou S, Sauvé R, Thannhauser TW (2009). Proteome changes induced by aluminium stress in tomato roots. *J Exp Bot*, 60: 1849–1857

## Proteomics analysis of cadmium stress responses in the roots of two *Vicia sativa* varieties differing in Cd tolerance

RUI Hai-Yun<sup>1,2</sup>, ZHUANG Kai<sup>2</sup>, SHEN Zhen-Guo<sup>2</sup>, ZHANG Fen-Qin<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy and Chemistry & Chemical Engineering, Taizhou University, Taizhou, Jiangsu 225300, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; <sup>3</sup>College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China

**Abstract:** In order to understand the molecular mechanisms involved in cadmium stress response, the differentially expressed proteins in the roots of a Cd-tolerant variety ‘L3’ and a Cd-sensitive variety ‘ZM’ of *Vicia sativa* in response to Cd were analyzed by 2-DE, and the functions of these differentially expressed proteins were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis and NCBI database searching. Seedlings were exposed to 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CdCl<sub>2</sub> for 5 days with 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CdCl<sub>2</sub> as the control. The results showed that 56 protein spots were differentially expressed in the roots in at least one variety. Five spots were up-regulated and one spot was down-regulated in both varieties. Four spots were newly appeared in both varieties after Cd treatment. Twenty-eight protein spots were identified. The biological functions of these identified proteins were involved in seven metabolic pathways: (1) antioxidative defense and detoxification; (2) respiration and energy metabolism; (3) stress response; (4) cell wall synthesis; (5) signal transduction; (6) cell proliferation; and (7) unknown. Compared with ‘ZM’, ‘L3’ had more up-regulated proteins involved in antioxidative defense and detoxification, stress response and cell proliferation, and this may be an important cause of more tolerance of ‘L3’ than ‘ZM’. Auxin, salicylic acid and ethylene-induced signal transduction pathway may be involved in *V. sativa* responses to cadmium stress.

**Key words:** *Vicia sativa*; cadmium; root; proteomics

Received 2016-05-09 Accepted 2016-06-14

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31160053, 31560072) and the Doctor Foundation of Taizhou University (Grant No. TZXY2015JB005).

\*Corresponding author (E-mail: fenqinzh@163.com).