

利用蛋白质组技术分析 Cd²⁺对萝卜幼苗生长的影响*

党晨¹ 高越² 阎晗² 彭永康^{2**}

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100193; 2. 天津师范大学生命科学学院 天津 300387)

摘要 以生长3 d的萝卜幼苗为材料,分析10~150 μmol·L⁻¹ Cd²⁺处理12 h后幼苗的生长及蛋白质组的变化。结果表明,不同浓度 Cd²⁺处理导致幼苗生长严重受抑,幼苗高度从对照组的3.80±0.68 cm降至3.41±0.64 cm (10 μmol·L⁻¹ Cd²⁺处理, P<0.01)、1.61±0.37 cm (50 μmol·L⁻¹ Cd²⁺处理, P<0.01)、1.26±0.11 cm (100 μmol·L⁻¹ Cd²⁺处理, P<0.01)和0.80±0.14 cm (150 μmol·L⁻¹ Cd²⁺处理, P<0.01); 胚根生长也明显受到影响,分生组织细胞有丝分裂受抑,幼苗鲜重下降; 叶绿素(a+b)含量[mg·g⁻¹(FW)]从对照组的6.72±0.05 分别下降至6.66±0.17、6.02±0.15、5.38±0.07和3.94±0.06。蛋白质组技术分析表明,叶片中有50多个蛋白质斑点产生差异表达现象,其中9个蛋白质斑点的归属得以鉴别,分别是斑点1 PWWP domain containing protein、斑点2 AAA-type ATPase family protein、斑点3 NB-ARC domain containing protein、斑点4 Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)、斑点5 Deoxycytidylate deaminase、斑点6 Maturase K、斑点7 GRAS family transcription factor、斑点8 Resistance protein 和斑点9 Puroindoline B (pin),其功能涉及DNA功能修饰(甲基化)、能量代谢、信号转导、蛋白质合成、基因转座与剪切和不良环境条件防御等。

关键词 萝卜 Cd²⁺胁迫 叶绿素(a+b)含量 蛋白质组技术 串联质谱 幼苗生长

中图分类号: Q89 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2012)02-0231-05

Effects of Cd²⁺ stress on radish (*Raphanus sativus*) seedling growth based on proteome technique

DANG Chen¹, GAO Yue², YAN Han², PENG Yong-Kang²

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract Three-day-old radish seedlings were treated with 10~150 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ for 12 h for determination of the effects of Cd²⁺ on seedling growth and proteome by using 2-DE technique and MALDI-TOF MS. The results showed an obvious inhibition of seedling growth. Seedling height decreased from 3.80±0.68 cm under the control to 3.41±0.64 cm under 10 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ treatment (P<0.01), 1.61±0.37 cm under 50 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ treatment (P<0.01), 1.26±0.11 cm under 100 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ treatment (P<0.01) and to 0.80±0.14 cm under 150 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ treatment (P<0.01). Root growth was also obviously inhibited. Cell mitotic inhibition was noted in root tip meristem. Seedling fresh weight decreased from 10.92±0.86 g under the control to 9.93±0.77 g under 10 μmol·L⁻¹, 4.52±0.13 g under 50 μmol·L⁻¹, 3.65±0.07 g under 100 μmol·L⁻¹ and to 1.03±0.01 g under 150 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ treatments. Similarly, chlorophyll (a+b) content [mg·g⁻¹(FW)] declined from 6.72±0.05 to 6.66±0.17, 6.02±0.15, 5.38±0.07 and 3.94±0.06, respectively. Proteomic techniques analyses showed that treating seedlings with 100 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ altered over 50 protein species. 9 protein spots were identified via the MS/MS approach. The identified protein spots included: spot-1 (PWWP domain containing protein), spot-2 (AAA-type ATPase family protein), spot-3 (NB-ARC domain containing protein), spot-4 [phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)], spot-5 (deoxycytidylate deaminase), spot-6 (maturase K), spot-7 (GRAS family transcription factor), spot-8 (resistance protein) and spot-9 [puroindoline B (pin)]. These identified Cd²⁺ responsive proteins were possibly involved in DNA function modification (DNA methylation), energy metabolism, cell signal transduction, protein biosynthesis, gene transposition, intron splicing and defense response. This suggested that several protein types were responsive to Cd²⁺ stress. Proteome technique was applicable in studying phy-

* 教育部科学技术研究重点项目(02010)资助

** 通讯作者: 彭永康, 教授, 博士生导师, 主要从事植物细胞蛋白质组学研究。E-mail: pykcell@yahoo.com.cn

党晨(1990—), 大学本科, 主要从事植物细胞遗传研究。E-mail: dangchen1990@163.com

收稿日期: 2011-06-17 接受日期: 2011-10-28

biological and biochemical mechanisms of adaptation and tolerance of plant to heavy metals.

Key words Radish, Cd^{2+} stress, Chlorophyll (a+b) content, Proteome, MS/MS method, Seedling growth

(Received Jun. 17, 2011; accepted Oct. 28, 2011)

Cd^{2+} 是一种严重污染土壤的重金属,由于杀虫剂、有机磷农药、去污剂的过量使用^[1],使土壤中的 Cd^{2+} 污染日益严重。由于 Cd^{2+} 可以抑制作物正常的光合作用^[2-3],使许多参与光合作用的蛋白质失活^[4],导致作物处于亚致死状态^[5],作物干物质积累减少,叶面积和光合色素含量降低,严重影响作物产量。已有大量文献表明, Cd^{2+} 可以通过农产品进入人类食物链,严重影响人类健康,因此 Cd^{2+} 污染对农作物产量损失和人体健康的影响早已引起研究者的高度重视。如 Cd^{2+} 污染对水稻^[6-7]、拟南芥^[8-9]、油菜^[10]、杨树^[11]等作物蛋白质组的影响相关研究发现, Cd^{2+} 胁迫后水稻和拟南芥中多种酶系统如光合作用、氧化还原、脱氢及防御相关蛋白产生变化。油菜根系中多种氧化还原酶、脱氢酶在氧化还原调控、细胞离子通道连接、高浓度 Cd^{2+} 体内积累的忍耐与适应等起了重要作用;杨属植物中则发现与多种调控胁迫相关的蛋白质。 Cd^{2+} 诱导人体肾脏损伤、肿瘤诱发^[12-14]的相关研究也有较多报道。天津是一个重金属 Cd^{2+} 污染较为严重的城市^[15],由于城市工业废水的排放,使近郊农田 Cd^{2+} 污染严重。天津的沙窝萝卜是一种蔬菜和水果兼用型地方优势作物品种,但近10多年来,品质和产量下降,虽然这与化肥的使用和种性退化有重要关系,但农田中的 Cd^{2+} 污染也是一个不可忽视的重要原因。

本工作以小沙窝萝卜(*Raphanus sativus*)为材料,利用蛋白质组分析技术,分析了不同浓度 Cd^{2+} 对萝卜幼苗期生长的有害影响,并从蛋白质组角度对有害影响的机理进行了探讨,为生产上早期检测蔬菜 Cd^{2+} 毒害及蔬菜的安全生产提供依据。

1 材料与方 法

1.1 植物材料与培养

小沙窝萝卜种子用0.1% HgCl_2 消毒5 min,自来水冲洗2次,铺于蒸馏水湿润的滤纸上,置培养皿中水培。培养条件:白天22 °C,晚上18 °C,16 h光照,8 h黑暗连续培养。3 d后根施10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 溶液,试验设3次重复。根施12 h后测定苗高、根长和鲜重,幼苗高度和胚根长度每个重复各取100株,鲜重取10株。收获叶片用于蛋白质分析。

1.2 叶片蛋白制备

按照Yan等^[16]的方法制备蛋白质,以液氮研磨

叶片组织成粉末,将粉末悬浮于含0.07%(w/v)DTT的10%冷丙酮,-20 °C下温育1 h,然后在3 500 ×g下离心5 min,弃上清,将沉淀重悬在含有0.07%(w/v)DTT的丙酮中,在-20 °C下温育1 h后,1 500 ×g离心30 min,这一步骤重复3次。弃掉上清,留沉淀并冻干,然后溶解于样品缓冲液[含8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素,35 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris,4%(w/v)CHAPS,1% pH 5~7两性离子,0.4% pH 3~10两性离子,1%(w/v) DTT],参考Bradford^[17]的方法测定蛋白质含量,并以牛血清白蛋白(BSA)作为标准。

1.3 2-DE 分析

参阅Castro等^[18]的方法进行蛋白质的2-DE分析。利用pH 3~10 IPG胶条,长度为13 cm,根据Bio-Rad产品说明书操作。取每个待分析样品各60 μg ,用样品缓冲液稀释至300 μL ,将干胶条在含待测样品的缓冲液中水化10 h(300 V),使待测蛋白质样品吸入胶条中。

第1向等电聚焦程序如下:分别在300 V和1 000 V电泳1 h,然后将电压调至8 000 V电泳2 h;电泳结束后胶条在平衡液(60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 6.8, 1% DDT, 1%甘氨酸, 2% SDS)中平衡20 min。电泳的第2向等电聚焦程序^[19]为12.5% SDS-PAGE;将经聚焦后的凝胶条放在垂直板胶条的上面,用1%的琼脂糖[含0.15 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Bis-Tris-HCl(0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和0.2%(w/v)SDS]封胶,并使其聚合;80 V电泳5 h。其结果经3次重复。采用银染法^[20]显色。对MS分析胶用GS-800考马斯亮蓝染色。用色谱扫描记录图像,用PDQuest软件进行凝胶斑点检测、匹配和差异斑点鉴别,确定对照和处理组之间有差异的蛋白质斑点,进行质谱分析。

1.4 凝胶消化和 MALDI-TOF MS 分析

从制备胶上切下经鉴别有差别的蛋白质斑点,用超纯水洗3次,50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 脱色2次,100%乙腈干燥,用0.1%TFA在50%乙腈溶液37 °C消化过夜,将制备物混匀、冻干,溶解在含有1%TFA和50%的5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CHCA中。利用ABI 4700型(USA)正离子生物质谱仪进行MALDI-TOF MS分析。以胰蛋白酶自动降解片段为内部标准校正。通过MASCOT软件(<http://www.matrixscience.com/>),在NCBI绿色植物数据库(Viridiplantae)进行查询,为了表明新鉴别的蛋白质的可靠性,除个别功能未确

定的推测蛋白质斑点外, 每个被鉴别的蛋白质序列覆盖率至少达15%, 得分在35以上, 肽质量数误差范围为±0.1 Da, 未水解酶切位点数为1。

1.5 统计分析方法

数据以平均数±标准差表示, 各数据间差异采用单因子方差分析(ANOVA)和t检测进行统计。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著^[21]。

2 结果与分析

2.1 Cd²⁺胁迫下小沙窝萝卜生长特性与叶绿素含量变化

从表1可以看出, 小沙窝萝卜是一种对Cd²⁺十分敏感的作物, 10 μmol·L⁻¹、50 μmol·L⁻¹、100 μmol·L⁻¹

和150 μmol·L⁻¹浓度Cd²⁺胁迫下, 萌发3 d的幼苗高度、根系长度、幼苗鲜重及叶绿素(a+b)含量都有明显变化。10 μmol·L⁻¹、50 μmol·L⁻¹、100 μmol·L⁻¹和150 μmol·L⁻¹ Cd²⁺处理12 h后, 幼苗胚根长度、幼苗高度及鲜重均极显著下降($P < 0.01$); 并明显存在随处理浓度的增加, 幼苗生长抑制严重的现象, 尤其是胚根呈膨大、弯曲状, 而细胞学检测表明, 凡经Cd²⁺溶液处理过的根分生组织内均未发现有丝分裂细胞存在, 而全部处于分裂间期。

叶绿素(a+b)含量变化也反映出小沙窝萝卜对Cd²⁺十分敏感, 50 μmol·L⁻¹ Cd²⁺处理下小沙窝萝卜幼苗叶绿素含量开始下降, 100 μmol·L⁻¹、150 μmol·L⁻¹ Cd²⁺溶液处理叶绿素含量下降明显(表1)。

表1 不同浓度 Cd²⁺处理对小沙窝萝卜幼苗生长和叶绿素含量的影响

Table 1 Effects of different Cd²⁺ concentrations on growth and chlorophyll contents of radish seedlings

Cd ²⁺ 浓度 Cd ²⁺ concentration (μmol·L ⁻¹)	胚根长度 Radicle length (cm)	幼苗高度 Seedling height (cm)	幼苗鲜重 Seedling fresh weight (g)	叶绿素(a+b)含量 Chlorophyll (a+b) content [g·g ⁻¹ (FW)]
0	4.15±0.042	3.80±0.68	10.92±0.86	6.72±0.05
10	3.90±0.095*	3.41±0.64*	9.93±0.77*	6.66±0.17*
50	2.13±0.290*	1.61±0.37*	4.52±0.13*	6.02±0.15*
100	1.96±0.100*	1.26±0.11*	3.65±0.07*	5.38±0.07*
150	0.89±0.010*	0.80±0.14*	1.03±0.01*	3.94±0.06*

胚根长度和幼苗高度为100株测定的平均值, 幼苗鲜重为10株测定的平均值; * 表示 $P < 0.01$ 水平差异显著。Data are the averages of at least 100 plants for radicle length and seedling height, and 10 plants for seedling fresh weight, respectively. “*” means significant difference at $P < 0.01$.

2.2 Cd²⁺胁迫下小沙窝萝卜幼苗叶片蛋白质的差异表达

图1a是未经Cd²⁺处理的2-DE图谱, 有多于1 000个蛋白质斑点被检测到; 图1b则是经100 μmol·L⁻¹ Cd²⁺处理后的2-DE图谱, 经Cd²⁺处理后消失的蛋白质斑点有5个(箭头1~4和9所指), 有明显含量变化的蛋白质斑点共4个(箭头5~8所指)。

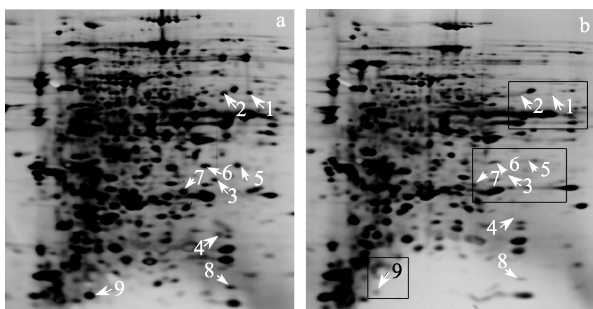


图1 小沙窝萝卜幼苗叶片对照(a)和100 μmol·L⁻¹ Cd²⁺处理(b)的蛋白质2-DE图谱

Fig. 1 Two-dimensional electrophoresis profiles of leaf protein of radish seedlings under treatments of control (a) and 100 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ (b)

应该说明的是, 本研究对不同Cd²⁺处理小沙窝萝卜蛋白质组变化做了比较分析, 但变化最为明显的是100 μmol·L⁻¹ Cd²⁺处理。因此, 本研究中所记录

的蛋白质组分析结果是在该浓度下得出的。

2.3 与Cd²⁺胁迫相关差异表达蛋白的质谱鉴别

表2为100 μmol·L⁻¹ Cd²⁺处理12 h后小沙窝萝卜叶片内经质谱(MALDI-TOF-MS)鉴别后的相关蛋白质, 共对18个蛋白质斑点进行了质谱鉴别, 其中鉴别出9个斑点的归属及部分氨基酸序列, 但其余9个斑点因序列匹配力偏低而没有被鉴别。

3 讨论

不同浓度Cd²⁺处理小沙窝萝卜幼苗后, 一个明显的现象是幼苗生长变缓, 鲜重下降, 叶片发黄, 最后整株枯死。根尖分生组织的检测结果表明, Cd²⁺完全抑制了胚根分生组织细胞分裂。在本试验所设计的不同浓度Cd²⁺处理下, 小沙窝萝卜根尖分生组织中均未检测到有分裂细胞存在。叶绿素(a+b)含量变化结果也表明Cd²⁺明显降低了叶片叶绿素含量。通过上述结果可以初步认定, Cd²⁺抑制胚根内细胞分裂和叶片内叶绿素的正常合成可能是影响小沙窝萝卜幼苗正常生长并最终导致死亡的原因之一。

为了从生物化学水平探讨作物幼苗的Cd²⁺损害机理, 本试验对经Cd²⁺处理12 h的小沙窝萝卜幼苗叶片蛋白质组进行了分析, 结果表明有多于50种的蛋白质呈现差异表达。仅从经质谱鉴别后得出归属的9个蛋白质的生化特性看, 其功能涉及DNA功能

表 2 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cd}^{2+}$ 处理下小沙窝萝卜幼苗叶片差异表达蛋白质斑点的质谱鉴别
Table 2 Differentially expressed protein spots identified by MALDI-TOF-MS method of radish seedling leaves under $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cd}^{2+}$ stress

斑点 Spot No.	登录号 Accession No.	分子量 Molecular weight (KD)	等电点 Isoelectric point (PI)	序列覆盖率 Sequence coverage (%)	得分 Score	蛋白质 名称 Protein name	序列 Sequence	物种 Species
1	gi/15232737	79.2	5.36	24	51	PWWP domain containing protein	EGCGNFASAGDNGMEKEVEPDMVCSHGADLSD VKVVKISDSDLVWAKSHPWWPGQVFDASAATD KIEEGLACSCISEEVYQKIKNDRKNNLSAGDKITP QKARKSFGIGASILKKEAPSTNLVEDPMLERDL KDSSKKEAANVADEKSIMDSNLTGEKISGLDLRE QPSNKNCSGSDSCK	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>
2	gi/18398708	71.1	8.99	29	43	AAA-type ATPase family protein	EINSSPHSKQVFDLMRKLAEAAEKEHNEAIQAS KEKARIATEEQIQAQRRMLDKINGERILGQPS LIRESSMGRSLTAAGAAASAEGEKPLENVILHRK SGLDYAMMTGGDVAPLGAQAVTKTGDQSRDIVL VLATNRPGLDLSAVTDRLYLNKYLMDGDDKKE KKSQKITIEGDLTDQVIK	拟南芥 <i>A. thaliana</i>
3	gi/110288575	75.1	7.98	19	46	NB-ARC domain containing protein	MLLDEARGKWCCVSDVFDVVTIANSICMSTERY LIVLDHVWNRKGGMGSVVLTTRNAEVARYLN TESLPIRPHLLHLRDMKYMTSLRHLYTNGCLRL KCMPELQGLTSIRTLLTYFVVGASSGCSTLR	水稻 <i>Oryza sativa</i>
4	gi/18073820	41.3	7.82	23	40	Phosphoenolpyruvate carboxylase	LSAAWQLYKAQEELIKVAKQFGIKQEWRELMDE MAVVATEEYRELLEGDPYLKDSYITLNGCQAYT LKRIRDPNFHGNLRPHLSK	银杏 <i>Ginkgo biloba</i>
5	gi/223507699	30.6	8.49	31	44	Deoxycytidylate deaminase	MYAAASAAGNSACLRRCCWNYGGKLRGLIEFSR AIHAEMHAILTALRIFVTTYPCHSCARHIVAAGIK KSLATKLHGDAMTESEQTSDK	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>
6	gi/212901996	61.5	9.44	20	44	Maturase K	MEKYQVYLEDRRLITRMYQOQTHLIISTNDSNK NKYFFNLRSIHSIFPLFEDKVSFFHLLRFFYYCN WNSLITSKKDPFIHYVRYQEKSLVSKIKYILRLSC ITK	马唐 <i>Digitaria radicata</i>
7	gi/224131944	31.4	6.01	35	41	GRAS family transcription factor	ITCVNGSKAILEKLGQRLVKEAESVGVFPQFNSIN ASLRSMSPDLLFVVEQEAHHLNRLVDRFVHSS GEDAKQIMDAFGKNGYKTVIERTGLMICWR	杨 <i>Populus trichocarpa</i>
8	gi/21950716	16.7	8.59	36	36	Resistance protein	QAIRMAGATCDQLMTKTELLPHLMDSIRGKSVF LVLLDDVWKMNNYDGLLELLMCK	狼尾草 <i>Pennisetum glaucum</i>
9	gi/6689387	16.7	8.95	56	39	Puroindoline B	LSSCKDYVMERCFTMKGGEHEVREKCCQQLS QIAPQRCNSIRGMIQKLGFFGIWRGDVFKQI QRAQSLPSKCNMGADCK	小麦 <i>Triticum monococcum</i>

修饰、能量代谢、信号转导、蛋白质合成、基因转座与剪切、不良环境条件防御等。如，斑点 1 PWWP domain containing protein 主要参与微卫星 DNA 甲基化^[22]；斑点 2 AAA-type ATPase family protein 是一类位于线粒体内膜上的蛋白质家族，与能量代谢有关^[23]；斑点 3 NB-ARC domain containing protein 参与抗性基因相关信号转导^[24]；斑点 4 Phosphoenolpyruvate carboxylase(PEPC)是植物初生代谢中的关键酶，位于细胞质和叶绿体内，其主要功能是参与氨基酸的合成^[25]；斑点 5 Deoxycytidylate deaminase 参与细胞增殖，而在植物叶绿体内主要与叶绿体 tRNA 的编辑加工有关^[26]；斑点 6 Maturase K 和斑点 7 GRAS family transcription factor 主要涉及基因内含子的剪切与基因转座；斑点 8 Resistance protein 是一类参与不良环境条件防御的蛋白质；斑点 9 Puroindoline B(pin)为小麦面粉中决定籽粒硬度的蛋白，但其同时为一种抗菌多肽，能抵御真菌对植物的感染和侵噬，转 *pin* 基因的水稻提高了对稻瘟病和纹枯病 2 种疾病的抵抗能力^[27]。

蛋白质组技术是近 10 多年来发展起来的一种高通量研究技术，可以研究植物某一特定组织或某一特定环境因子胁迫下体内蛋白质组的变化。由于 Cd^{2+} 可以干扰蛋白质的合成^[4]，因此，近几年来很多研究者利用转录组学(transcriptome)技术研究植物在 Cd^{2+} 胁迫下基因表达调控特性^[28-32]，观察 mRNA 变化与合成蛋白质间的相关性^[33]，虽然取得进展，但也有很多限制因素^[34]，如基因的表达调控不仅在转录水平上进行，而且也可以发生在转译和转译后修饰水平^[34]。因此，利用转录组方法，不能揭示转译和转译后发生变化的蛋白质，比较而言，蛋白质组分析技术能弥补这方面缺陷，并获得更大量更全面的试验结果。从本试验结果看，有多于 50 种蛋白质经 Cd^{2+} 胁迫后呈现差异表达，虽然仅 9 个蛋白质的归属得到鉴别，但其功能涉及面广，因此利用蛋白质组分析技术探讨萝卜苗期 Cd^{2+} 毒害机理是可行的。

参考文献

- [1] Alvarez S, Berla B M, Sheffield J, et al. Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to

- cadmium exposure by complementary proteomic approaches[J]. *Proteomics*, 2009, 9(9): 2419–2431
- [2] Krupa Z. Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex II in radish cotyledons[J]. *Physiol Plant*, 1988, 73(4): 518–524
- [3] Siedlecka A, Baszynsky T. Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplasts of cadmium-treated maize plants is due to cadmium-induced iron deficiency[J]. *Physiol Plant*, 1993, 87(2): 99–202
- [4] Stohs S J, Bagchi D, Hassoun E, et al. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2000, 19(3): 201–213
- [5] Gasic K, Korban S S. Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) plants expressing an *Arabidopsis phytochelatin synthase (AtPCS1)* exhibit enhanced as and Cd tolerance[J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 64(4): 361–369
- [6] Ueno D, Yamaji N, Kono I, et al. Gene limiting cadmium accumulation in rice[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2010, 107(38): 16500–16505
- [7] Ueno D, Koyama E, Yamaji N, et al. Physiological, genetic, and molecular characterization of a high-Cd-accumulating rice cultivar, Jarjan[J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(7): 2265–2272
- [8] Farinati S, DalCorso G, Bona E, et al. Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to the heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms[J]. *Proteomics*, 2009, 9(21): 4837–4850
- [9] Farinati S, DalCorso G, Panigati M, et al. Interaction between selected bacterial strains and *Arabidopsis halleri* modulates shoot proteome and cadmium and zinc accumulation[J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(10): 3433–3447
- [10] Alvarez S, Berla B M, Sheffield J, et al. Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches[J]. *Proteomics*, 2009, 9(9): 2419–2431
- [11] Kieffer P, Dommes J, Hoffmann L, et al. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants[J]. *Proteomics*, 2008, 8(12): 2514–2530
- [12] Kazemeini H R, Rahimi E, Kharrattaherdel A A, et al. Cadmium concentration in muscle, liver and kidney of sheep slaughtered in Falavarjan abattoir, Iran[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2010, 26(5): 259–263
- [13] Weaver V M, Kim N S, Jaar B D, et al. Associations of low-level urine cadmium with kidney function in lead workers[J]. *Occup Environ Med*, 2011, 68(4): 250–256
- [14] 周志衡, 雷毅雄, 王彩霞, 等. 氯化镉诱发 16HBE 细胞恶性转化中 hOGG1 基因表达和序列变化的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15(3): 161–164
- [15] 江帆, 黄海泉, 尹凤英, 等. 不同浓度镉对白菜幼苗生长受害与蛋白质组变化关系分析[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(6): 2345–2350
- [16] Yan S P, Tang Z C, Su W A, et al. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root[J]. *Proteomics*, 2005, 5(1): 235–244
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254
- [18] Castro A J, Carapito C, Zorn N, et al. Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress[J]. *J Exp Bot*, 2005, 56(421): 2783–2795
- [19] Laemmli U K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685
- [20] Wary W, Boulikas T, Wary V P, et al. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels[J]. *Anal Biochem*, 1981, 118(1): 197–203
- [21] Chen T P, Tsujimoto N, Li E. The PWWP domain of Dnmt3a and Dnmt3b is required for directing DNA methylation to the major satellite repeats at pericentric heterochromatin[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(20): 9048–9058
- [22] 陈丽, 王练, 王振英, 等. Cd²⁺对番茄幼苗生长和蛋白质组的影响[J]. *作物学报*, 2010, 36(12): 2154–2161
- [23] Graef M, Seewald G, Langer T. Substrate recognition by AAA⁺ ATPases: Distinct substrate binding modes in ATP-dependent protease Yme1 of the mitochondrial intermembrane space[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(7): 2476–2485
- [24] Ooijen G V, Mayr G, Kasiem M M A, et al. Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins[J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(6): 1383–1397
- [25] Masumoto C, Miyazawa S I, Ohkawa H, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2010, 107(11): 5226–5231
- [26] Delannoy E, Le Ret M, Faivre-Nitschke E, et al. *Arabidopsis* tRNA adenosine deaminase arginine edits the wobble nucleotide of chloroplast tRNA^{Arg} (ACG) and is essential for efficient chloroplast translation[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(7): 2058–2071
- [27] 王珏, 罗立廷, 陈明洁, 等. 小麦面粉 Puroindoline 蛋白的提取与纯化[J]. *武汉植物学研究*, 2005, 23(6): 568–571
- [28] Norton G J, Lou D E, Meharg A A, et al. Rice-arsenate interactions in hydroponics: Whole genome transcriptional analysis[J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(8): 2267–2276
- [29] van de Mortel J E, Schat H, Moerland P D, et al. Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*[J]. *Plant Cell Environ*, 2008, 31(3): 301–324
- [30] Gygi S P, Rochon Y, Franz B R, et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(3): 1720–1730
- [31] Ahsan N, Lee S H, Lee D G, et al. Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity[J]. *C R Biol*, 2007, 330(10): 735–746
- [32] Ainaa R, Labraa M, Fumagallia P, et al. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 59(3): 381–392
- [33] Roth U, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S. Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd²⁺[J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(15): 4003–4013
- [34] Sarry J E, Kuhn L, Ducruix C, et al. The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses[J]. *Proteomics*, 2006, 6(7): 2180–2198