

植物重金属转运蛋白及其在植物修复中的应用

鲁家米 刘延盛 周晓阳*

(北京林业大学生物学院 北京 100083)

摘要 植物修复技术已成为解决土壤重金属污染的一个绿色环保方法。利用基因工程和分子生物学技术,已经鉴定出一系列与重金属转运相关的蛋白及基因,包括 ZIP 家族、ABC 载体、有机汞裂解酶基因 *merB*、Hg 离子还原酶基因 *merA* 和金属 S 蛋白基因 *MT* 等。本文着重从细胞、亚细胞水平上综述了一系列重金属转运蛋白的相关分子生物学研究进展及其在植物修复上的应用。

关键词 吸收 植物修复 重金属 转运蛋白

Heavy metal transporters and their applications in phytoremediation. LU Jia-Mi, LIU Yan-Sheng, ZHOU Xiao-Yang (College of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China), *CJEA*, 2007, 15(1): 195~200

Abstract Phytoremediation has nowadays become one of the cost-effective and environmental friendly solutions to the heavy metal pollution problems of soil system. A range of gene families and proteins that are likely to be involved in heavy metal transport have been identified by using the genetic and molecular technologies. These include ZIP genes family, ABC transporters, organomercurial lyses gene *merB*, mercury reductase gene *merA* and metathionin *MT*. With an emphasis on the sub-cellular level, this paper summarizes progresses in the researches on heavy metal transporters related to molecular biology and its application on phytoremediation.

Key words Uptake, Phytoremediation, Heavy metal, Transporter

(Received March 6, 2006; revised June 24, 2006)

由于重金属污染范围广、持续时间长、不易在生物物质循环和能量交换中分解,重金属在环境中易蓄积,且性质稳定。环境中痕量重金属如 Pd、Cr、Cd 等可通过食物链最终在生物体内累积,破坏正常的生理代谢活动;又能抑制植物生长发育,促进早衰,降低产量并通过根系进入植物体,再通过食物链的传递和富集最终危害人体健康。重金属污染已经成为目前亟待解决的世界性难题。进入 20 世纪 30 年代以来,随着工农业迅速发展,大量的污染物尤其是重金属进入环境,引起环境质量严重恶化。1988 年 Nriagu 等^[4]统计全球每年释放到环境中的有毒重金属高达数百万 t,其中 Hg 为 1.2 万 t, Cu 为 14.7 万 t, Pb 为 34.6 万 t, Ni 为 38.1 万 t, As 为 12.5 万 t, Cd 为 3.9 万 t; 而到 2002 年全球重金属排放量已达数千万 t, Hg 约 1.5 万 t, Cu 约 340 万 t, Pb 约 500 万 t, Ni 约 100 万 t, Mn 约 1500 万 t^[1], 在不到 15 年的时间内重金属的排放量增长数十倍。目前我国一些金属冶炼厂周围和长期污染的农地,形成了十几个典型的重金属污染地区,如江西大余矿区、株洲冶炼厂和沈阳冶炼厂附近,东北的沈抚灌区以及北京东南郊灌区^[2]等。

重金属污染的环境问题因其具有隐蔽性、长期性和不可逆性等特点,正受到广泛关注。土壤中重金属的污染与治理一直是国际上研究的难点与热点。目前采用的修复方法如物理化学常规方法,不仅昂贵,难以大规模应用,而且常导致土壤结构破坏、肥力下降,降低土地的使用功能和应用价值。20 世纪 80 年代利用绿色植物修复重金属污染的土壤和水体(即植物修复)的提出,使绿色植物应用超越了过去只是作为金属矿藏指示植物或重金属超富集植物(Hyperaccumulator)的使用范围。植物修复(Phytoremediation)技术通常包括植物提取(Phytoextraction)、植物挥发(Phytovolatilization)、植物稳定(Phytostabilization)、根际过滤(Rhizofiltration)、植物转化(Phytotransformation)^[3]。相对于污染土壤治理的常规方法(如客土法、淋溶法、吸附固定法等),植物修复技术以其成本低、不破坏土壤和河流生态环境、不引起二次污染等优势,受到国内外学术界和产业界的日益密切的关注,表现出广阔的市场前景。目前美国已开始采用芥菜(*Brassica juncea*)吸

* 通讯作者

收 Pb,利用杂交白杨和草类修复重金属污染的土壤等。2000 年中国科学院南京土壤研究所成功举办了第一届土壤污染和修复国际会议(SOILREM 2000),标志着我国重金属污染土壤植物修复的开始并初步进入田间示范阶段。

1 植物对重金属污染修复的概念

植物修复是利用绿色植物转移、容纳或转化污染物使其对环境无害的技术。植物修复的对象是重金属、有机物或放射性元素污染的土壤及水体。为达到改善环境的目的,用于环境修复的植物应有以下特征之一:能富集环境中有害金属元素,并将其储存在植物组织中;能产生降解周围某些有毒有机物的酶;或能刺激根际周围具有降解化学物质能力的细菌的生长。

2 植物对重金属污染修复的分子基础

近年来随着分子生物学等现代技术手段的引入,人们对植物修复过程中金属离子如何进入细胞有了新的认识。越来越多的修复性蛋白的基因正从植物、微生物和动物中陆续克隆得到。其中存在于生物膜上的各种阳离子转运蛋白在植物修复中起尤为关键的作用。在超富集植物中已经克隆出多个家族的金属运载蛋白基因,这些基因表达出的金属阳离子跨膜运载蛋白可能决定性地参与了重金属在根部的吸收、木质部的装载以及液泡的区室化^[5],在细胞中重金属运输、分布和富集及提高植物抗性方面发挥了极其重要作用。另一方面,一些重金属离子还原酶基因如 Hg 离子还原酶基因 *merA*、有机汞裂解酶基因 *merB*、Hg 转运蛋白基因 *merT*、金属 S 蛋白基因 *MTs*、植物络合素合成酶基因 *PCs* 的发现和克隆为准确了解植物修复的生化及分子机制准备了最基本的条件。

2.1 细胞水平重金属转运相关蛋白

通常,重金属在植物体内与重金属 S 蛋白、植物络合素等结合蛋白络合为复合物后,随着这些蛋白一起被转运,最终在植物体内某些器官如叶片中沉积下来,并通过这些组织细胞内液泡膜上转运蛋白的跨液泡膜转运作用而进一步在液泡中富集(见表 1)。

表 1 重金属转运蛋白的细胞定位及其作用方式

Tab.1 Locations of transporters and their modes of action

转运蛋白 Transporters	相关金属 Related metal ions	细胞定位 Locations	作用方式 Modes of action
PCs	Cd, Pb, Cu, Zn	细胞质	络合物储存于液泡
MTs	Cu, Zn, Cd	细胞质	形成无毒或低毒络合物
<i>merA</i> , <i>merB</i> , <i>merT</i>	Hg ²⁺	细胞质膜	将有机汞转化为单质汞挥发到空气中
COPT1	Cu	液泡	具有转运 Cu ²⁺ 的能力
Nramps	Fe, Cd, Mn	液泡	参与 Fe 和 Cd 的吸收
ZIP	Fe, Zn, Mn, Cd	质膜	将无机阳离子转运进入根部
CNGC channel	Ni, Pb	质膜	具有非选择性,可使细胞质膜通过单价和二价阳离子
P-type ATPases	Cu	叶绿体	将无机阳离子传输进入
ABC transporters	GS-Cd, PC-Cd, Fe	高尔基体 液泡膜	或排出细胞 以重金属螯合物的形式
Cation/H ⁺ antiporters	Mn, Cd	液泡膜	吸收无机阳离子 参与细胞液中 Ca ²⁺ 和 Na ⁺ 浓度调节

植物络合素(PCs, Cadystins in *Schizosaccharomyces pombe*)。植物络合素是一类非核糖体合成的多肽。结构通式为(γ -Glu-Cys) $_n$ X,其中 n 一般为 2~11。而 X 常为甘氨酸,也可以是丙氨酸或丝氨酸。自 PCs 被发现命名后,关于其作用的研究报道很多,概括起来主要有 2 方面:一是与毒性重金属络合形成配体复合物而保护植株免受毒害,另外调节并维持植物体内金属离子的平衡。在重金属如 Cd、Hg、Cu、Ni、Pb 和 Zn 诱导下,植物和酵母都可以迅速产生 PCs。研究表明 PCs 的产生是高等植物解 Cd 毒的普遍机制^[6],还原型谷胱甘肽(GSH)或 PCs 的水平决定了植物对 Cd 的累积及抗 Cd 的能力^[7],PCs-Cd 复合物是 Cd 由细胞质进入液泡的主要形式。另外,有研究发现,PCs 在解 Hg 毒方面也发挥一定的作用。Gisbert

等^[8]证明了 PCs 对 Pb 污染土壤的植物修复也发挥着重要作用。另外,PCs 对必需金属离子在植物体内的代谢起着调节作用。一方面植物螯合肽络合 Cu²⁺、Zn²⁺ 等离子,将过量的金属离子储存在液泡中;另一方面,将金属离子转运至新的合成酶^[9]。

金属 S 蛋白(MTs, Metallothioneins)。金属 S 蛋白是由 Margoshes 和 Vallee 首次在马肾中提取出的一种重金属结合蛋白。之后又陆续在高等植物中发现 MT-like 蛋白及其基因。MT 是一类低分子量的富含半胱

氨酸的多肽。可通过胱氨酸残基上的S基与重金属结合形成无毒或低毒络合物。MT主要用于伴随营养金属元素执行相应功能,如在蛋白质折叠过程中将相应金属离子插入到其活性中心等,也可以络合毒性重金属以保护植株免受毒害,从而促进有毒重金属在体内的积累,清除重金属毒害作用。它对于 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 解毒效果尤为明显。另外许多研究结果表明,番茄等植物引入MTs基因后,可以提高植物组织中金属S蛋白含量,能明显提高植物对Cd、Cu等的耐性或增加对它们的吸收^[10]。此外,Whitelaw等^[11]报道番茄MT-like蛋白基因(*LeMTB*)的5'端有一个金属调节元件(Metal regulatory element, *MRE*),该基因的转录可能受金属离子调节,因而推测MT-like蛋白对重金属可能也有一定的解毒作用。

2.2 亚细胞水平重金属转运相关蛋白

经过近十年的努力,分离并鉴定了一系列参与重金属在植物体内转运的基因和蛋白家族。其中,在细胞质膜上存在着多种与重金属在植物体内转运相关的蛋白,如LCT1与 Cd^{2+} 转运相关;ZIPs1-3与 Zn^{2+} 转运相关;IRT1,2与 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 相关;COPT1~5与 Cu^{2+} 相关;Nramps与 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 相关;CNGC与 Ni^{+} 相关。位于质体膜上的PAA1与 Cu^{2+} 转运相关及ZIP4与 Zn^{2+} 转运相关。位于液泡膜上的Nramp3与 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 转运有关,ABC-type蛋白家族则主要与 Cd^{2+} 转运相关,CAX2与转运 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 有关。高尔基体膜上的RAN1和内质网上的ECA1分别与 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 转运相关。

2.2.1 定位于细胞质膜的重金属转运蛋白家族

与Hg转运有关的*merA*、*merB*是从细菌中克隆的2种基因。其中*merB*基因编码的有机汞裂解酶(Organomercuriallyase)将有机汞还原为挥发性的毒性小的 Hg^{2+} ,*merA*基因编码Hg离子还原酶(Mercuric reductase)可以将 Hg^{2+} 进一步还原为Hg原子^[12]。单独表达*merB*基因的拟南芥耐受有机汞的能力和体内 Hg^{2+} 累积量增加^[12];单独表达*merA*基因的拟南芥对 Hg^{2+} 的耐受性增强^[13]。但*merA*或*merB*基因在植物体内的单独表达不能达到预期目的,当这2种基因同时表达时才能使甲基汞还原成单质汞挥发到空气中。同时在植物中导入*merA*和*merB*2个基因或者将*merA*转基因植株和*merB*转基因植株杂交后得到的后代植株均能有效地将有机汞转化为单质汞挥发到空气中^[14]。田吉林等^[15]采用人工改造的*merA*和*merB*基因分别转化烟草,获得了能够将离子汞挥发和对有机汞表现较强抗性的转基因烟草。

真核生物中的铜转运蛋白家族(Ctr, Copper transport)。拟南芥基因*COPT1*可以使酵母 Cu^{2+} 缺失突变体恢复吸收和转运 Cu^{2+} ,其cDNA编码了具有169个氨基酸残基的高疏水蛋白并可能具有3个横跨膜区域。在酵母中*COPT1*的表达与它对 Cu^{2+} 毒力的敏感性相关^[16]。此外,*COPT1*与可能的低亲和系统的Cu蛋白运输器CTR2具有很高的相似性。Sancenon等^[17,18]在拟南芥中鉴定出Cu转运蛋白中的5个成员,包括上述的*COPT1*,*COPT1*、2、3、5都具有转运 Cu^{2+} 的能力,用RT-PCR技术对其组织特异性表达发现除*COPT4*以外,其他4种在叶片和茎中的表达均高于根部。

Nramps家族(Natural resistance associated macrophage proteins)。Nramps是一个高度保守的膜主要组成蛋白的家族,参与大多数有机体的金属离子运输过程。该家族基因目前已在很多高等植物中发现,在拟南芥中表达纯化得到了6种蛋白^[19,20]。植物Nramp蛋白可分成2个亚族:一个亚族包括了AtNramp s1和AtNramp s6,另一个亚族包括了AtNramps2~5^[22,24]。和其他Nramps一样,植物Nramp蛋白也是高度进化保守的,据推测有12个跨膜域,并在TM-8和TM-9之间存在一个特有的“共有运输基序”。Thomine等^[21]研究表明,AtNramp3和4能够帮助有运输缺陷的酵母吸收 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} ,并增加了对Cd的积累和敏感性。在缺Fe条件下,AtNramp1、3、4在拟南芥根部起到向上调控作用,AtNramp3也与Fe和Cd的吸收及敏感性有着明显联系,AtNramp3在根维管束、茎、叶中表达,可能因此在长距离金属离子运输中起作用,在缺Fe条件下起到向上调控作用并定位于液泡膜上,可能因此将金属离子转运出液泡。总体来说,这些结果表明Nramp家族的不同成员起到了不同生理作用,至少一些Nramp参与了Fe和Cd的吸收。

ZIP家族(ZRT, IRT-like proteins)。通过对酵母突变株进行功能互补克隆到了多条编码微量元素转运蛋白的全长cDNA,其中研究最多的是ZIP家族。ZIP家族存在于多数真核细胞中,参与Fe、Zn、Mn和Cd的运输,但家族成员的作用底物范围和作用专一性不同^[19,22]。氨基酸序列测定结果表明,ZIP家族可分成4个亚族^[19]。据推测ZIP蛋白位于细胞质膜外表面,但ZIP4位于叶绿体膜上,拥有8个跨膜域及氨基末端、羧基末端^[22]。从植物中首次分离并鉴定的成员包括ZIP1、ZIP2、ZIP3、ZNT1和IRT1^[23]。IRT1为Fe离子转运蛋白,能够高效率地转运 Fe^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 离子。这2类转运蛋白及其他可诱导型转运蛋白为毒性金属离子进入根部提供了有效通路^[24,25]。拟南芥基因敲除突变体irt1-1,表现出严重生长缺陷,但外源施用

Fe 可以改善此症状;IRT1 蛋白质定位于细胞质膜上,在缺 Fe 条件下主要在根部外皮层表达。IRT1 突变体光合效率明显改变,表现出发育缺陷,与 Fe 运输受阻及动态平衡紊乱表现一致^[26,27]。当缺 Fe 时 *Thlaspi caerulescens* 对 Cd 的吸收明显增强,这可能和根上大量的 TcIRT1-GmRNA 表达有关^[28]。

CNGC 通道(CNGC channel)。已经在拟南芥和其他植物体内得到了公认,是与动物体内环核苷门控离子通道蛋白同源的阳离子运输体家族^[29~31]。在拟南芥基因组中发现了 20 个 CNGC 基因序列,CNGC 蛋白包含 6 个跨膜域和 1 个 Ca 结合位点,该结合位点覆盖了环核苷酸的结合位点^[19,32]。这些通道蛋白定位于细胞质膜上并具有非选择性,可通透过单价和二价阳离子^[29,31,32]。超表达烟草 *NtCBP4* 基因的转基因植株表现出对必需元素 Ni 更高耐受性和对 Pb 的超敏感性^[29]。观察表明,植物表达部分 *NtCBP4* 基因后,增强了对 Pb 的耐受性并且减少了体内金属离子积累^[33]。另外一个具有转运 Cd^{2+} 功能的蛋白是 LCT1(低亲和系统的阳离子转运蛋白),定位于细胞质膜上。当 LCT1 在酵母中表达时,发现酵母对 Cd^{2+} 显示出高度敏感并与高亲和系统的 Cd^{2+} 吸收相关联^[19]。

2.2.2 定位于细胞器膜上的转运蛋白

P 型 ATPases(P-type ATPases)。P 型 ATPases 是与 ATP 结合的蛋白质,其功能在于将无机阳离子传输进入或排出细胞。主要定位于叶绿体膜、高尔基体膜、质膜及内质网上,包括植物和真菌类中的 H^+ -ATPases 以及动物体中的 Na^+/K^+ -ATPases 和在许多有机体中发现的 Ca^{2+} -ATPases^[34]。P 型 ATPases 被划分为 5 类,每类再根据它们的传输功能划分为 2 个或更多个亚类^[34,35]。其中的 P1B 型 ATPases 与传输 1 价的 Cu^+ 、 Ag^+ 和 2 价的 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 关系密切^[34]。Mills 等发现在拟南芥属 (*Arabidopsis*) 存在 8 个 P1B-type ATPases,但迄今只有其中 2 种 HMAs 被认为与重金属传输有关,RAN1(AtHMA7)被认为是与 Cu^+ 、 Ag^+ 相关,且通过高尔基体膜创建乙烯受体^[36,37]。Salah E.等^[38]在拟南芥 (*A. thaliana*) 的叶绿体中发现了与铜转运密切相关的 2 种蛋白 PAA1 和 PAA2,PAA1 的结合体存在于拟南芥叶绿体的外围而 PAA2 则存在于叶绿体类囊体膜上,且相对独立地作用于 Cu^{2+} 转运。

ABC 载体(ATP-binding cassette transporters)。ABC 家族是一个具有很强转运功能的膜蛋白家族,主要定位于液泡膜上^[39,40]。所有 ABC 载体都包含 4 或 6 个跨膜跨度的高度疏水跨膜区域,以及外围细胞质的 ATP 结合区域或核苷结合区域^[40]。迄今为止,在植物中发现了该超家族的 2 个主要亚级 MRPs 和 MDRs^[40,41]。ABC 载体在吸收液泡中 Cd 过程中是以重金属螯合物的形式发挥作用的。MRPs 被认为可能是参与跨液泡膜转运 Cd^{2+} 螯合物或 GS-Cd 复合体^[41]。Bovet 等^[42]发现拟南芥经过 Cd 处理后根部 4 种 MRPs 在转录水平上有所增高,并且 *AtMRP3* 显著增加。最近,Miyong Lee 等^[43]在拟南芥中发现 ABC 载体家族中的 *AtPDR12* 表达的植株具有对 Pb^{2+} 更高的耐受力,剔除掉 *AtPDR12* 基因的植株比普通野生型植株长势弱但相对含有更高的 Pb^{2+} 浓度;相反 *AtPDR12* 完全表达的植株则具有更良好的长势且植株含 Pb 量较少,表明 *AtPDR12* 具有作为离子泵排除 Pb^{2+} 或者缓冲其毒性的功能。

阳离子反向运输器(Cation/ H^+ antiporters)。植物体液泡膜上存在很多阳离子反向运输器,它们参与细胞液中 Ca^{2+} 和 Na^{2+} 浓度调节。在拟南芥中,*CAX1*、*CAX2* 基因被克隆出,并被预测有 11 个横跨膜区域且在 TM-6 和 TM-7 之间存在一个富氨基的中央亲水基团^[44,45]。早期对运输器的研究认为 Cd^{2+}/H^+ 离子反向运输器可能参与了 Cd^{2+} 在液泡中的积累过程^[46]。Hirschi 等^[51]的实验则为 *CAX2* 在此过程中起重要作用提供了证据。此外,*CAX2* 表达后的烟草更能积累 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Mn^{2+} ,并提高了 Cd^{2+} 和 Mn^{2+} 在根液泡膜囊传送能力^[47]。此外,Cheng 等^[48]已经从拟南芥中克隆得到 *CAX* 基因。Maèser 等^[22]认为拟南芥完整基因组中有大量同族运输器存在。

3 展 望

目前国内关于超富集重金属离子研究虽已取得一定进展,但植物的重金属毒害及其抗性的关键因子至今还不明确,使植物修复技术发展面临瓶颈。今后工作重点应集中在植物耐受重金属关键基因研究上。通过对植物重金属伤害和抗性生理关键因子的进一步研究,确定更多的重金属转运蛋白及其信号通路,加强其中的耐性或敏感性基因的鉴定、分离、克隆、组织结构研究,设计合适的基因激活或敲除策略以便利用基因工程方法改良植物的耐重金属能力。在此基础上,植物修复技术的市场化应用及其巨大潜力才能得以实现。将基因技术和现代分子生物学应用于植物修复,增加植物体内起降解作用的酶(例如过氧化物酶、漆酶等)数量和活性;过量表达金属 S 蛋白、植物络合素、液泡转运蛋白等金属结合蛋白,以提高植物超富集能

力,培养生物量高、生长速率快、体内重金属含量高的超级超富集植物。此外不仅要研究某个转运蛋白的基因及相应功能,而且也要在整体水平上研究不同转运蛋白之间的相互关系及其调控途径。从农业应用的角度,需要一方面筛选低重金属含量的农作物,另一方面克隆超积累植物的重金属离子转运体基因和耐性相关基因及其在非超积累植物中的表达,从而为重金属污染土壤的修复提供理想植物材料。

参 考 文 献

- 1 郑喜坤,鲁安怀,高翔,等.土壤重金属污染现状与防治方法.土壤与环境,2002,11(1):79~84
- 2 陈怀满,郑春荣,涂从,等.中国土壤重金属污染现状与防治对策.人类环境杂志,1999,28(2):130~134
- 3 骆永明.重金属污染土壤的植物修复.土壤,1999,950:261~265
- 4 Nriagu J.O., Pacyna J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soil by trace metals. Nature, 1988, 333: 134~139
- 5 Heath S.M., Southworth D., Dallura J.A. Localization of nickel in epidermal subsidiary cells of leaves of *Thlaspi montanum* var *siskiyouense* (*Brassicaceae*) using energy-dispersive x-ray microanalysis. International Journal of Plant Science, 1997, 158: 184~188
- 6 Rauser W.E. Phytochelatin and related peptides. Plant Physiology, 1995, 109: 1141~1149
- 7 Zhu Y.L., Pilon-Smiths E.A.H., Tarun A.S., et al. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. Plant Physiol., 1999, 119: 73~79
- 8 Gisbert C., Ros R., De Haro A., et al. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003, 303: 440~445
- 9 Sanita di Toppi L., Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants. Environmental and Experimental Botany, 1999, 41 (2): 105~130
- 10 Karenlampi S., Schat H., Vangronsveld J., et al. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soil. Environment Pollution, 2000, 107: 225~231
- 11 Whitelaw C.A., Le Huquer J.A., Thurman D.A., et al. The isolation and characterization of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Plant Mol. Biol., 1997, 33: 503~511
- 12 Bizily S.P., Rugh C.L., Summers A.O., et al. Phytoremediation of methylmercury pollution: *merB* expression in *Abutilon thaliana* confers resistance to organic mercurials. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96: 6808~6813
- 13 Clayton L., Rugh C.L., Dayton Wilde, Nicole M., Stack, et al. Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93: 3182~3187
- 14 Bizily S.P., Rugh C.L., Meagher R.B. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. Nature Biotechnology, 2000, 18: 213~217
- 15 Tian J.L., Shen R.J., He Y.K. The decoration of *merB* gene and high resistance of transgenic tobacco to organomercurials. Chinese Science Bulletin, 2002, 47: 1815~1819
- 16 Kampfenkel K., Kushnir S., Babiychuk E., et al. Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270: 28479~28486
- 17 Sancanon V., Puig S., Mira H., et al. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology, 2003, 51: 577~587
- 18 Sancanon V., Puig S., Mateu-Andres I., et al. The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. J. Biol. Chem., 2004, 279(15): 15348~15355
- 19 Mäser P., Thomine S., Schroeder J.I., et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. Plant Physiology, 2001, 126: 1646~1667
- 20 Williams L.E., Pittman J.K., Hall J.L. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1465: 104~126
- 21 Thomine S., Wang R., Ward J.M., et al. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97: 4991~4996
- 22 Guerinot M.L. The ZIP family of metal transporters. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1465: 190~198
- 23 Pence N.S., Larsen P.B., Ebbs D.S., et al. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Proceeding of the National Academy of Sciences, 2000, 97: 4956~4960
- 24 Connolly E.L., Fett J.P., Guerinot M.L. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. The Plant Cell, 2002, 14: 1347~1357
- 25 Vert G., Grotz N., Dédaldéchamp F., et al. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. The Plant Cell, 2002, 14: 1223~1233
- 26 Henriques R., Jásik J., Klein M., et al. Knock-out of *Arabidopsis* metal transporter gene *IRT1* results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. Plant Molecular Biology, 2002, 50: 587~597
- 27 Varotto C., Maiwald D., Pesaresi P., et al. The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis

- in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2002, 31: 589~599
- 28 Lombi E., Tearall K.L., Howarth J.R., *et al.* Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 2002, 128: 1359~1367
- 29 Arazi T., Sunkar R., Kaplan B., *et al.* A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *The Plant Journal*, 1999, 20 (2): 171~182
- 30 Kohler C., Merkle T., Neuhaus G. Characterization of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1999, 18: 97~104
- 31 Schuurink R.C., Shartzter S.F., Fath A., *et al.* Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95: 1944~1949
- 32 White P.J., Bowen H.C., Demidchik V., *et al.* Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1564: 299~309
- 33 Sunkar R., Kaplan B., Bouche N., *et al.* Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis CNGC1* gene confer Pb²⁺ tolerance. *The Plant Journal*, 2000, 24: 533~542
- 34 Axelsen K.B., Palmgren, *et al.* Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2001, 126: 696~706
- 35 Palmgren M.G., Axelsen K.B. Evolution of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1365: 37~45
- 36 Hirayama T., Kieber J.J., Hirayama N., *et al.* Responsive-to-antagonist 1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signalling in *Arabidopsis*. *Cell*, 1999, 97: 383~393
- 37 Woeste K.E., Kieber J.J. A strong loss-of-function mutation in *RAN1* results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *The Plant Cell*, 2000, 12: 443~455
- 38 Abdel-Ghany S.E., Müller-Moulé P., Niyogi K., *et al.* Two P-Type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *The Plant Cell*, 2005, 17: 1233~1251
- 39 Martinoia E., Klein M., Geisler M., *et al.* Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers. *Planta*, 2002, 214: 345~355
- 40 Theodoulou F.L. Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1465: 79~103
- 41 Rea P.A., Li Z.S., Lu Y.P., *et al.* From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, 49: 727~760
- 42 Bove L., Eggmann T., Meylan-Bettex M., *et al.* Transcript levels of AtMRPs after cadmium treatment; induction of AtMRP3. *Plant, Cell and Environment*, 2003, 26: 371~381
- 43 Miyoung Lee, Kiyoul Lee, Joohyun Lee, *et al.* ArPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2005, 138: 827
- 44 Hirschi K. Vacuolar H⁺/Ca²⁺ transport; who's directing the traffic. *Trends in Plant Science*, 2001, 6 (3): 100~104
- 45 Maeshima M. Tonoplast transporters: organization and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2001, 52: 469~497
- 46 Salt D.E., Wagner G.J. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots, Evidence for a Cd²⁺/H⁺ antiporter activity. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268: 12297~12302
- 47 Hirschi K.D., Korenkov V.D., Wilgaowski N.L., *et al.* Expression of *Arabidopsis CAX2* in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiology*, 2000, 124: 125~134
- 48 Cheng N.H., Pittman J.K., Shigaki T., *et al.* Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* H⁺/cation antiporter. *Plant Physiology*, 2002, 128: 1245~1254