

科技报告编号

400002574--YYWF201524/5

密级（公开）

公开日期：2017 年 12 月

铅锌矿区浮萍在水铅污染修复中的潜力及耐受机理研究

Potential and Tolerance Mechanism of Duckweed to
Remove Lead Pollution from Water in Lead-Zinc Mine

作 者：储彬彬

作者单位：国家地质实验测试中心

完成日期：2017 年 6 月

中国地质科学院中央级基本科研业务费专项

科技报告编号：400002574--YYWF201524/5

公开

科技报告类型：研究报告

科技报告

报 告 名 称：铅锌矿区浮萍在水铅污染修复中的潜力及耐受机理研究

支 持 渠 道：基本科研业务费

编 制 单 位：国家地质实验测试中心

编 制 时 间：2017 年 6 月

辑要页

1. 题名和副题名 铅锌矿区浮萍在水铅污染修复中的潜力及耐受机理研究 Potential and Tolerance Mechanism of Duckweed to Remove Lead Pollution from Water in Lead-Zinc Mine		
2. 作者及作者单位 储彬彬 Chu Binbin 国家地质实验测试中心		
3. 科技报告类型, 起止日期 研究报告, 2015 年-2016 年	4. 辑要页密级 公开	5. 科技报告密级 公开
6. 科技报告编号 400002574--YYWF201524/5	7. 完成日期 2016-12-31	8. 总页数 33
9. 备注(须注明的特殊事项, 如延期公开报告的查询权限、免责声明、报告与其它工作或成果的联系等) 无		
10. 摘要 中文摘要(一般 300-600 字, 要围绕正文的论题, 就研究工作的目的、方法、结果、结论等进行概括性介绍, 其重点是方法和结论等信息。避免出现描述任务执行情况的语句) 浮萍是一种繁殖快、富集并耐受铅的水生植物, 具有修复水铅污染的潜力。课题以铅锌矿区浮萍为研究对象, 通过铅抑制性实验、同步辐射 X 射线荧光光谱微区分析、细胞超显微结构分析和比较蛋白质组学分析, 开展了浮萍生长抑制率与铅浓度的关系以及铅耐受机制的研究。结果表明: 浮萍中铅的半数效应浓度 EC_{50} 可达 5.9mg/L, 是地表水 V 类水体铅限值 (0.1 mg/L) 的 59 倍, 说明浮萍修复水体铅污染的能力较强; 浮萍中铅主要被隔离在细胞壁和细胞间隙中, 极少数进入了细胞质, 并且浮萍中离子结合类蛋白和应激响应类蛋白大量表达, 这些防御措施有效减少了铅带来的细胞损伤, 提高了浮萍对铅的耐受性。 中文关键词 (3-8 个, 以分号隔开): 浮萍; 铅; 污染修复; 耐受机制 英文摘要 (英文, 一般为实词 300 个左右) Duckweeds are Pb-rich and tolerant aquatic plants with rapid propagation, and have a great potential to remove Pb from waste water. In this study, inhibition experiments of Pb, microanalysis of synchrotron radiation X-ray fluorescence spectroscopy, cell ultrastructural analysis and comparative proteomic analysis were used to investigate the relationship between growth inhibition rate and Pb concentration, and mechanism of Pb tolerance in duckweeds. The results showed that effect concentration EC_{50} of Pb was up to 5.9mg/L, which was 59 times as much as the Pb limit (0.1 mg/L) of class V surface water, confirming that duckweeds have strong ability in water remediation of Pb. Moreover, Pb was isolated in cell wall and intercellular space and very few in cytoplasm. Expressions of ion binding proteins and proteins involved in response to stimulus were enhanced. These defensive mechanisms might reduce the cell damage and improve the tolerance of duckweed to lead. 英文关键词 (3-8 个, 以分号隔开): Duckweed; Lead; Pollution remediation; Tolerance mechanism		

11. 支持 渠道	项目（课题）名称		铅锌矿区浮萍在水铅污染修复中的潜力及耐受机理研究	
	承担单位		国家地质实验测试中心	
	项目（课题）负责人		储彬彬	项目（课题）编号 YYWF201524
	立项部门			计划名称
12. 联系人	姓名	储彬彬	联系方式	chubinbin@126.com

目 录

引言.....	1
一、 研究区概况.....	2
1.1 地质概况.....	2
1.2 环境问题.....	2
二、 材料与方法.....	3
2.1 样品采集和处理.....	3
2.2 实验分析.....	3
2.2.1 铅抑制性培养实验.....	3
2.2.2 同步辐射 X 射线荧光光谱分析实验.....	5
2.2.3 透射电镜实验.....	5
2.2.4 比较蛋白质组学实验.....	6
三、 结果与讨论.....	10
3.1 铅抑制性实验与半数效应浓度分析.....	10
3.2 浮萍中铅等元素的微区分布特征.....	12
3.3 浮萍中铅在细胞中的分布特征.....	15
3.4 铅胁迫下浮萍的比较蛋白质组学研究.....	17
四、 结论.....	26
参考文献.....	27

引言

铅是一种有毒的重金属，不仅影响植物的生长和种子的萌发^[1]，还危害到人体健康，包括神经、造血、肾、生殖、内分泌系统和骨骼系统等多个方面^[2, 3]，被美国毒物与疾病登记署列入第二位有毒有害物质。铅的来源是多方面的，其中矿产资源的开发是铅污染的主要来源之一。据报道，全球范围内铅矿石的开采估计已造成 3 亿吨的铅进入环境^[4]。每年采矿和冶炼活动可造成约 2400~8800 吨的铅进入水中^[5]。我国已有多处铅锌矿区水铅污染的报道^[6, 7]。南京栖霞山铅锌矿区菜园地表水中铅的含量也超过了地表水环境质量标准（Ⅴ类）的 4.5 倍。因而，水铅污染的治理成为亟待解决的环境问题之一。

超富集植物是进行污染修复的一种有效途径。目前已发现的超富集植物约 500 种，其中铅的超富集植物约 16 种^[8]。但是，这些铅的超富集植物大都是在铅锌矿区土壤中发现的陆生植物，而富铅水生植物的发现和研究很少。因而，寻找和研究铅的水生超富集植物显得尤为重要。

水生植物浮萍具有修复水铅污染的潜力。（1）浮萍对铅的富集能力强。在含 Pb 100mg/L 的溶液中培养 5 天，浮萍可富集 490.5 $\mu\text{g/g}$ Pb^[9]，在 10mg/L Pb 溶液中培养 7 天，浮萍对铅的生物富集系数达到 1330^[10]，在 0.655mg/L 铅溶液中培养 7 天，浮萍对铅的去除率达到 84%^[11]。

（2）浮萍能够耐受铅，如重金属 Cu、Cd、Ni 和 Zn 分别在 0.2、0.8、5 和 10 μM 时就可使浮萍子叶片提前离开母叶片，显示毒害性，而浮萍在 80 μM Pb 胁迫下也未发生子叶片脱离现象^[12]。

（3）浮萍分布广、繁殖快、产量高、易于打捞，因此将浮萍应用于污水治理的可操作性较强。另外，浮萍已成功应用于生活污水和猪场废水中氮磷的吸收处理^[13]，这些经验也为浮萍应用于水铅污染治理提供了参考。

然而，浮萍应用于水铅治理的理论研究并不成熟。如浮萍应用于水铅污染修复的铅浓度上限、适应条件及耐受机理等并不清楚。因而，开展浮萍的铅耐受性研究及水铅污染修复的潜力评价，通过特异性蛋白质了解与细胞解毒和耐受性有关的代谢途径，对改良植物对铅的耐受性和开发水生超富集植物具有重要意义。

一、研究区概况

1.1 地质概况

南京栖霞山铅锌银矿的开采已持续 50 多年，已发展到有锰、铅锌、硫、银、金等可利用的主要金属元素的大型多金属矿床，预计铅锌金属储量达 200 万 t，目前，已有工程控制的矿化深度为-700m^[14]。矿床的形成经历了同生沉积期 I、后生热液成矿期 II 以及表生成矿期 III^[15]。铅锌成矿主要在 II-3 阶段，其次是 II-4 阶段^[16]。关于矿床的成因，有 3 种观点，即岩浆期后中低温热液矿床、沉积改造矿床、复生后成层控矿床^[17]。

铅锌矿体主要呈似层状、透镜状及脉状产出，局部有囊状及不规则状。矿石工业类型有铅锌硫锰混合型、铅锌硫型、单硫型和单锰型等四种，并以前二者为主^[18]。主要矿石矿物为闪锌矿、方铅矿、黄铁矿、菱锰矿（钙菱锰矿），其次是黝铜矿、黄铜矿、白铁矿。脉石主要为石英、锰方解石、方解石，其次为重晶石、玉髓和白云石等。有益组分为铅、锌、硫、锰，伴生组分为银、金、镉、镓、铟、硒、锑等。矿石主要为角砾状构造，其次为块状、脉状、浸染状、条带状、晶洞状、条纹状和残余状构造等。矿石以粒状结构为主，并有镶嵌结构、交代溶蚀结构、压碎结构、微包含结构及交代生物结构等^[19]。

1.2 环境问题

该区由矿山引发的环境问题在上个世纪 80 年代就已突出，如山体滑坡、地下水位下降、地面塌陷、地表水污染和空气污染等问题^[20]。上个世纪 90 年代，项长兴等^[21]应用模糊数学隶属度法对该区土壤中 Cu、Mn、Pb 和 Zn 等重金属进行环境质量综合评价，发现大部分土壤未受到污染，污染土壤主要集中在露采矿区及选矿厂附近。然而我们项目组的研究发现，矿区周边两公里内土壤污染严重^[22]，且污染程度随着远离矿区而逐渐减小。重金属污染也波及到了矿区周边的菜园，菜园中不仅土壤重金属含量高，植物中重金属含量亦较高^[23]。

矿区附近菜园水沟灌溉水中铅已受到污染。该灌溉水中 Pb 含量为 0.45mg/L，已超过地表水 V 类水体标准（0.1mg/L）（GB 3838-2002）。在污染的灌溉水中，水生植物浮萍长势良好，其 Pb 的含量为 39.4mg/kg。本次实验所用的浮萍采集于此区域。

二、 材料与方法

2.1 样品采集和处理

采集了南京栖霞山铅锌矿区附近菜园水沟中的浮萍 (*Lemna minor*) 及所在水样, 剔除杂物, 装于密封盒中, 带回实验室。用自来水清洗浮萍多次后, 用去离子水冲洗 3 次, 再置于 SIS 培养液中, 在人工气候箱中培养 1 个月以上, 再进行后面的实验。人工气候箱的条件设置如下: (1) 22:00-06:00 时间段: 温度 25℃、湿度 50%、光照 0; (2) 06:00-22:00 时间段: 温度 25℃、湿度 50%、光照 5。

2.2 实验分析

2.2.1 铅抑制性培养实验

(1) 配置改良的 SIS 培养液。由于 SIS 中 PO_4^{3-} 和 CO_3^{2-} 易与 Pb 离子形成沉淀, 影响后期铅的抑制性实验。通过多次尝试, 减少了 PO_4^{3-} 和 CO_3^{2-} 的浓度, 确定了用于实验的培养液配方, 具体如下:

表 2-1 改良的 SIS 培养液

组分	成分	浓度(mg/L)
I	NaNO_3	85
	KH_2PO_4	0.67
II	MgSO_4	36.6
III	CaCl_2	27.2
IV	Na_2CO_3	2
V	H_3BO_3	1
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.2
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005
	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.84
VI	$\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.4

(2) 配置不同浓度的 Pb 溶液。在改良的 SIS 培养液中, 加入不同体积的 Pb 溶液母液,

用容量瓶配置成不同浓度的铅溶液 0、0.05、0.1、0.2、0.5、0.6、1、2、5、6、8、10、15mg/L，并利用 5%HCl 或 1M NaOH 调节 pH 为 6.0。实验中，将不同铅浓度组分溶液 150ml 装入 250ml 烧杯中，每个浓度组分做平行样品 3 份。

(3) 制备滤水离心管：利用千枚通在 5ml 离心管的管底扎 5 个小孔，用 5 位数天平称量离心管空管重量。

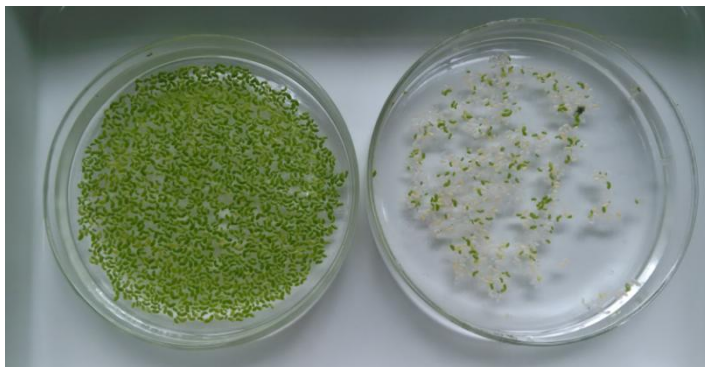


图 2-1 浮萍的筛选（左图为实验用长势良好的浮萍，右图为剔除的白色衰老浮萍）



图 2-2 浮萍的培养

(4) 实验中挑选涨势良好的浮萍，将白色衰老的浮萍去除（图 2-1）。将挑选好的浮萍置于 5ml 滤水离心管中，手动甩干水分后，在离心管外包裹纱布或吸水纸巾，放于离心机中（转

子为 50ml), 在 3000rpm 转速下离心 1 分钟, 擦干离心管外水分, 并称量。

(5) 将称好重量的浮萍倒入不同铅浓度组分溶液的烧杯中, 用保鲜膜覆盖烧杯口(图 2-2 上左), 并扎孔若干, 置于人工气候箱培养, 培养条件同 2.1。

(6) 浮萍培养 7 天后, 取出, 按照步骤(4)将浮萍样品称重。记录培养 0 天和 7 天时浮萍的重量, 以计算浮萍的半数效应浓度。

(7) 后续实验用浮萍的培养。为了保证样品的均匀性, 培养器皿换成了 1.5L 玻璃花盆(图 2-2 上右), 以确保每一个组分来自同一个容器, 其它培养条件同上。

2.2.2 同步辐射 X 射线荧光光谱分析实验

单片浮萍的同步辐射 X 射线荧光光谱(SRXRF)分析在上海同步辐射装置 BL15U1 光束线上的硬 X 射线微聚焦线站进行。浮萍样品为高浓度 Pb 培养的浮萍。利用 SIS 培养液(其中 KH_2PO_4 浓度减半), 加入 Pb 溶液直至达到饱和, 6 月 7 日开始培养, 6 月 12 日收获该浮萍样品进行测定。选择了两片浮萍样品, 一个为单叶浮萍, 一个为母子双叶浮萍, 用去离子水冲洗后吸干水分, 分离浮萍的根和叶, 将浮萍叶片放入无卤素胶带进行 SRXRF 分析。面扫描的光斑尺寸为 $50\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}$, 单点扫描时间为 3s, 步长 $50\mu\text{m}$, 能量范围 16keV。扫描单叶浮萍和母子双叶浮萍的光强分别为 $0.25\times 10^{-8}\text{V}$ 和 $0.38\times 10^{-8}\text{V}$ 。

数据处理: 利用 PyMCA 和 Origin 软件进行荧光数据解谱; 利用 Igor Pro 软件进行面扫描数据的处理。

2.2.3 透射电镜实验

透射电镜样品制备主要分为取材、醛类前固定、缓冲液漂洗、锇酸固定(后固定)、缓冲液漂洗、脱水剂梯度脱水、丙酮/环氧丙烷置换、浸透、加热聚合、修快、超薄切片和染色。浮萍样品一部分按照此步骤进行制备, 一部分未经过锇酸固定和染色, 按照免疫电镜制样方法处理。

透射电镜的观察实验分别在中国农业科学院原子能利用研究所和北京大学开展。原子能所是生物透射电子显微镜 New Bio-TEM H-7500 (HITACHI), 放大倍数较低, 适合观察植物细胞结构, 但该电镜没有配备能谱。北京大学的是材料透射电子显微镜 FEI Tecnai T20, 配备了牛津 6767 能谱仪, 可以进行关键部位的元素分析, 但由于放大倍数高, 看不见细胞全貌, 只能看见亚细胞局部。因而, 实验中先进行生物透射电镜的观察, 再进行材料透射电镜的能谱打点

分析。

2.2.4 比较蛋白质组学实验

(1) 植物蛋白的提取

基于 Plant total protein extraction kit 试剂盒 (PE0230), 进行植物蛋白的提取。首先进行蛋白提取试剂 A 和蛋白酶抑制剂 B 的制备。蛋白提取试剂 A: 将 15ml 高纯水加入 Protein Extraction Reagent 瓶中, 升温到 20-25℃ 至完全溶解, 最终溶液为 23ml。将溶液分装在 1ml 小瓶中, -20℃ 保存。蛋白酶抑制剂 B: 将蛋白酶抑制剂进行分装, 7ml 小瓶中, 加入 70μl 蛋白酶抑制剂, -20℃ 保存。使用当天, 将蛋白酶抑制剂用甲醇 methanol 稀释 100 倍后使用, 即 70μl 蛋白酶抑制剂 + 7ml 甲醇, 该混合溶液称为 B。 -20℃ 保存。称量 2ml 离心管 (或冻存管) 的皮重。具体提取步骤如下:

- 1) 液氮磨样: 在液氮中研磨 10-250mg 植物样品至粉末状。
- 2) 将样品转移至 2ml 冻存管 (或离心管) 中 -20℃ 保存, 并立即进行步骤 3, 以避免蛋白质降解。
- 3) 加入 1.5ml 稀释后的蛋白酶抑制剂 B, vortex 15-30s, 混合物在 -20℃ 孵化 5 分钟, 并间歇性 vortex。 (-20℃ 很重要, 可以保证蛋白质沉淀和阻止增容作用产生)
- 4) 在离心力 16000×g、4℃ 下离心 5 分钟, 吸取丢弃上清液, 不要搅动沉淀。
- 5) 重复步骤 3-4 两次。(大质量的植物组织 (200-250mg) 或组织中含有较高的酚醛树脂和单宁酸, 重复步骤 3-4 更多次)。
- 6) 最后一次弃掉上清液后, 倾斜离心管, 用滤纸吸取残存的溶液, 直至看不见明显的溶液。
- 7) 加入 1.5ml 预冷的 (-20℃) 丙酮 acetone 溶液, vortex 15-30s, 混合物在 -20℃ 孵化 5 分钟。
- 8) 在离心力 16000×g、4℃ 下离心 5 分钟, 吸取丢弃上清液, 不要搅动沉淀。(大质量的植物组织 (200-250mg) 或组织中含有较高的酚醛树脂和单宁酸, 需重复步骤 7-8 一次)
- 9) 沉淀在室温下干燥 5-10 分钟, 去除残存的丙酮。
- 10) 干燥后的样品, 和离心管一起称重, 并减去离心管皮重, 计算植物组织的质量。
- 11) 在每 mg 植物组织中加入 4μl 蛋白质提取剂 A。混合物在环境温度下孵化 15 分钟, 期

间可以间歇性的 vortexing 或温和的搅拌。(温度需控制在 15℃-30℃，否则尿素和硫脲将会沉淀)

12) 在离心力 $16000\times g$ (15℃-30℃) 离心 30 分钟。上清液即为总蛋白样品。

(2) 蛋白质定量

实验采用 Bradford 法测定蛋白浓度。主要原理是检测考马斯亮蓝染料与蛋白结合时的颜色变化。考马斯亮蓝在游离状态下呈红色，最大光吸收在 488nm；当它与蛋白质结合后变为青色，蛋白质与色素结合物在 595nm 波长下有最大光吸收。其光吸收值与蛋白质含量成正比，因此可用于蛋白质的定量测定。

本实验利用 Protein Quantification Kit-Rapid (51254) 进行蛋白的定量。首先用水将 BSA 蛋白标准品 4mg/ml 加水稀释成 2mg/ml，然后取不同的量，稀释成如下浓度 0.05,0.08,0.1,0.15,0.18,0.25,0.35,0.4,0.5 mg/ml。在 96 孔板中分别加入 6μl 的裂解液、水、各浓度的 BSA 标准品和待测样品，每个做三份平行，然后每个待测孔中分别加入 300μl 染色液 CBB Solution，放入水平摇床混匀 1 分钟，去除气泡后放入酶标仪，测定 595nm 波长下的吸收值，用 OD 表示。各浓度 BSA 蛋白标准品的浓度与 OD 作图，如图 2-3 所示，相关性很好($R^2=0.9999$)，利用该图得到的方程 $y = 0.6648x - 0.0068$ ，来计算待测浮萍样品的蛋白质浓度。此方法适合测定浓度范围在 0.05~0.4mg/ml 的蛋白，因此当样品中蛋白浓度较高时，需要先稀释后再进行测定。

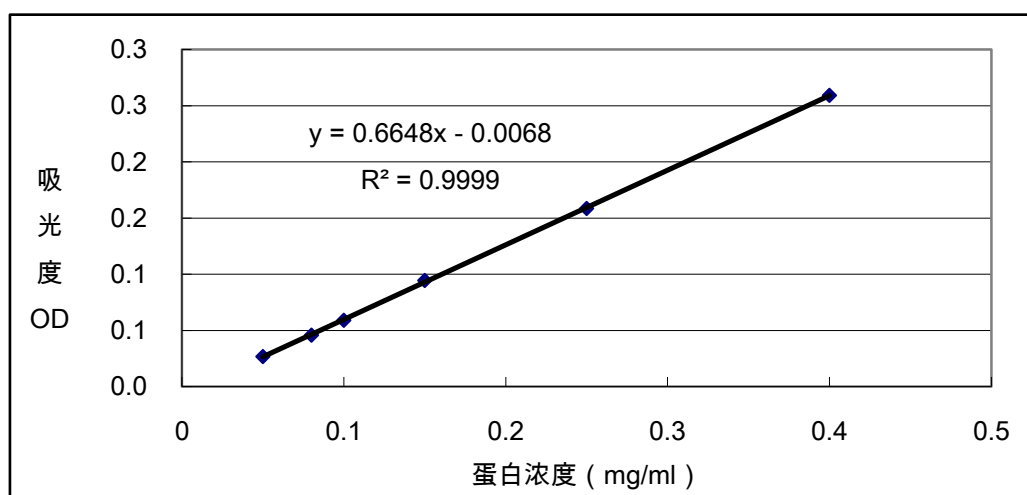


图 2-3 蛋白浓度与吸光度之间的关系图

(3) 蛋白质标记

本实验利用 iTRAQ® Reagent - 8PLEX One Assay Kit (4381662) 进行蛋白质标记。Pb 浓度分别为 0, 0.05, 0.6, 2 和 6mg/L 五个组分的浮萍样品分别编号为 1,2,3,4,5。每个组分重复三次实验, 三次分别记作 A, B 和 C。每个样品取 40μg 蛋白, 即蛋白总量为 40μg×15=600μg, 平分三份于 1.5ml 离心管中, 作为参考样, 记为 R1, R2 和 R3。一共得到 18 个样品, 利用 iTRAQ 进行同位素标记, 每 6 个样混合为一组, 共计三组, 具体信息如表 2-2 所示。

表 2-2 iTRAQ 同位素标记样品的信息表

第一组	同位素	113	114	115	116	117	118
	样品编号	1A	2A	3A	4A	5A	R1
第二组	同位素	115	116	117	119	121	118
	样品编号	1B	2B	3B	4B	5B	R2
第三组	同位素	115	116	117	119	121	118
	样品编号	1C	2C	3C	4C	5C	R3

主要的标记流程如下:

- 1) 蛋白定量后取 200 μg 蛋白溶液置于离心管中。iTRAQ®标记试剂一次可以标记 100μg 蛋白, 200μg 蛋白为标记两次的蛋白量, 一次性酶解 200μg 蛋白目的是便于进行实验重复性检测。
- 2) 加入 4 μl Reducing Reagent, 37 度反应 1 小时。
- 3) 加入 2 μl Cysteine-Blocking Reagent, 室温 10 分钟。
- 4) 将还原烷基化后的蛋白溶液加入 10K 的超滤管中, 12,000 转离心 20 分钟, 弃掉收集管底部溶液。
- 5) 加入 iTRAQ®试剂盒中的 Dissolution Buffer 100 μl, 12,000 转离心 20 分钟, 弃掉收集管底部溶液, 重复 3 次 (为节省试剂, 这步可以将 Dissolution Buffer 用水稀释 1 倍后使用)。
- 6) 更换新的收集管, 在超滤管中加入胰蛋白酶, 总量 2-4 μg (与蛋白质量比 1:50-100), 体积 50 μl, 37 摄氏度反应过夜。
- 7) 次日, 12,000 转离心 20 分钟, 酶解消化后的肽段溶液离心于收集管底部。

- 8) 在超滤管中加入 50 μ l Dissolution Buffer, 12,000 转再次离心 20 分钟, 与上步合并, 收集管底部共得到 100 μ l 酶解后的样品。
- 9) 从冰箱中取出 iTRAQ[®]试剂, 平衡到室温, 将 iTRAQ[®]试剂离心至管底。
- 10) 向每管 iTRAQ[®]试剂中加入 150 μ l 有机溶剂异丙醇, 涡旋振荡, 离心至管底。
- 11) 取 50 μ l 样品 (100 μ g 酶解产物) 转移到新的离心管中。
- 12) 将 iTRAQ[®]试剂添加到样品中, 涡旋振荡, 离心至管底, 室温反应 2 小时。
- 13) 加入 100 μ l 水终止反应。
- 14) 为了检测标记效率及定量准确性, 从 4 组样品中各取出 1 μ l 混合, 用 Ziptip 脱盐后进行 MALDI 鉴定, 确认标记反应良好。
- 15) 混合标记后的样品, 涡旋振荡, 离心至管底。
- 16) 真空冷冻离心干燥, 抽干后的样品冷冻保存待用。

(4) LC-MS/MS 分析

酶解的肽段用 Easy-NanoLC 毛细管高效液相色谱系统分析, 液相色谱条件为: 流动相 A, 0.1%甲酸水溶液, 流动相 B, 0.1%甲酸乙腈溶液, 洗脱条件: 0~70 min, 流动相比比例由 2% B 线性升至 40% B; 70-75min, 流动相比比例由 40% B 线性升至 95% B; 维持 95%B 5 min, 流动相流速为 300 nl/min。从反相柱流出的洗脱组分由纳升级电喷雾接口喷出进入 Orbitrap LTQ velos Pro 质谱仪, 电喷雾电压 2.2 kV, 离子传输毛细管温度为 300 $^{\circ}$ C。质谱采用全扫描(Mass range, m/z 350~2000)一级质谱数据依赖的二级质谱扫描模式(Data Dependent MS/MS Scan), 依次选取一级质谱中离子强度最强的 15 个离子进行 HCD 串联质谱, 归一化碰撞能量为 35%, 采用串联质谱扫描的动态排除功能(dynamic exclusion), 设置排除时间为 30s。

(5) 数据分析

所得的质谱数据用 PD2.1 软件针对 Uniprot plant 数据库进行搜索和定量。肽段以胰酶完全酶解条件搜索 (最多容许两个漏切位点), 允许的母离子误差为 10 ppm, 碎片离子质量偏差为 0.1 Da。搜库时半胱氨酸残基加烷基化固定修饰; 可变修饰为蛋氨酸残基加氧化修饰。控制用于定量的肽段和蛋白的 FDR 均小于 1%。

三、 结果与讨论

3.1 铅抑制性实验与半数效应浓度分析

(1) 获得了适合浮萍铅抑制性培养实验的营养液配方

由于 SIS 培养液中含有大量的 PO_4^{3-} 和 CO_3^{2-} ，这些离子易与 Pb 离子形成沉淀，影响后期铅的抑制性实验。通过多次尝试，减少了 PO_4^{3-} 和 CO_3^{2-} 的浓度，确定了用于实验的营养液配方（表 2-1），通过 ICP-AES 测定，确定设计浓度和测定浓度相当（表 3-1-1），可用于铅抑制性实验。

表 3-1-1 培养液中铅的设计浓度和测定浓度对比

培养液铅浓度 (mg/L)	
设计浓度	ICP-AES 测定浓度
0	0
0.05	0.052 ±0.004
0.1	0.11 ±0.002
0.2	0.17 ±0.006
0.5	0.53 ±0.02
0.6	0.63 ±0.004
1	0.97 ±0.003
2	1.95 ±0.04
5	5.03 ±0.01
6	6.09 ±0.04
8	8.27 ±0.04
10	10.04 ±0.03
15	15.33 ±0.14

(2) 确定了浮萍中铅的半数效应浓度

通过铅抑制性实验，获得了浮萍在培养前后的鲜重，计算了不同铅浓度下浮萍的相对生长率 $\text{RGR}=100 (\ln W_f - \ln W_0) / t$ ，其中 W_f 和 W_0 为浮萍在时间 t 和 0 时的鲜重。绘制了浮萍的相

对生长率随铅浓度的变化图（图 3-1-1）。以 6-8mg/L 数据做图，得公式 $Y=5.815X+15.631$ 计算了浮萍的半数效应浓度 EC_{50} 为 5.9mg/L，即在水铅浓度为 5.9mg/L 时，浮萍的生长受到 50% 的抑制。

另外，从图 3-1 还可看出，在水铅浓度为 0.05mg/L 和 0.1mg/L 时，浮萍的相对生长率比对照组高出 4.7%和 3.5%，说明低浓度铅有助于浮萍的生长。0.1mg/L 为地表水 V 类水体 Pb 浓度限值,该浓度下浮萍生长优于无 Pb 环境;在比 V 类水体限值高 10 倍的浓度下(即 Pb 浓度 1mg/L)，浮萍的生长良好，未出现黄叶和枯叶的状况，相对生长率比无 Pb 环境只低 17%。这说明浮萍能够耐受 Pb 污染环境。

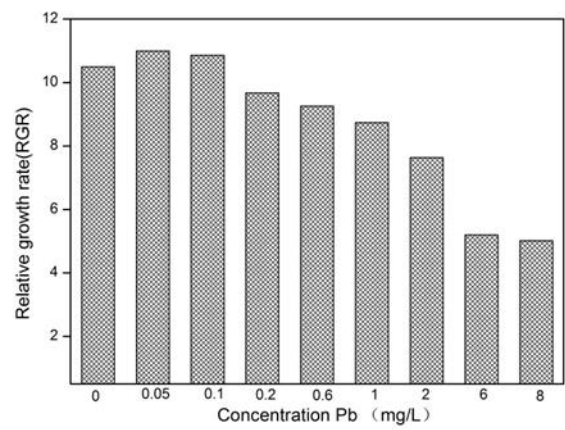


图 3-1-1 浮萍的相对生长率随铅浓度的变化

表 3-1-2 五个铅浓度组分下浮萍的相对生长率和抑制率

组分	1	2	3	4	5
铅浓度（mg/L）	0	0.05	0.6	2	6
相对生长率	10.5	11.0	9.3	7.6	5.2
抑制率	0.0	-4.8	11.8	27.3	50.5

选择 Pb 浓度分别为 0，0.05，0.6，2 和 6mg/L 五个组分进行浮萍的培养，用于后续浮萍中铅的细胞和比较蛋白质组学研究。这五个组分下浮萍的相对生长率和抑制率情况见表 3-1-2 所示。表中抑制率是以 Pb 浓度 0mg/L 为对照组，计算了其它四组的生长受限制情况。从中可以看出，第二组分 Pb 浓度为 0.05mg/L 时，浮萍的生长并未受到抑制，相反，生长情况优于对

照组；随着铅浓度增高，第三组、第四组和第五组浮萍的相对生长率降低，抑制率增加。这五个组分培养浮萍 7 天后，浮萍的生长情况如图 3-1-2 所示。与相对生长率情况相似，第二个组分的浮萍根最长，对照组次之，第三组、第四组和第五组浮萍根长逐渐减少，第四组浮萍叶开始发黄，第五组浮萍叶部分发白，显示出生长受限。

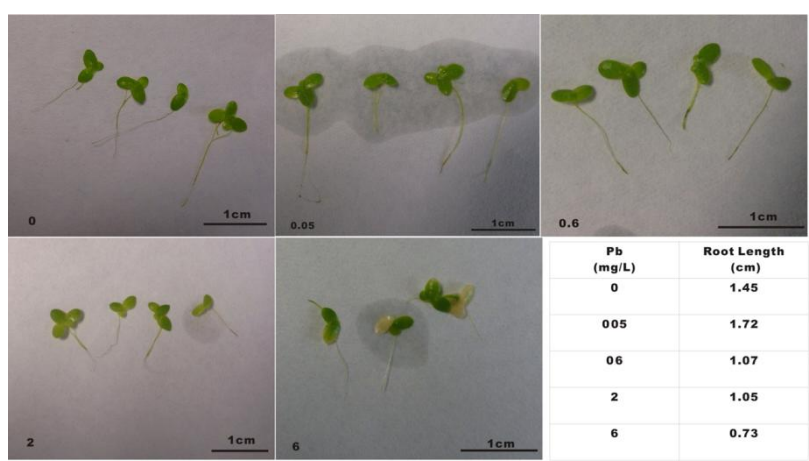


图 3-1-2 不同铅浓度培养 7 天后浮萍的生长情况

3.2 浮萍中铅等元素的微区分布特征

同步辐射 X 射线荧光光谱（SRXRF）微区分析是通过圈定元素感兴趣区，计算感兴趣区内电子计数之和来进行元素在不同点的面扫描分析。因而感兴趣区的选择是 SRXRF 微区分析中的重要部分。在 XRF 中，第 n 个元素的 k_{β} 谱线与第 $n+1$ 元素的 k_{α} 谱线存在重叠干扰，因此需要针对样品中的元素特征，选择无重叠干扰的谱线作为元素的感兴趣区。图 3-2-1 是单片单叶浮萍叶的 60s SRXRF 光谱图。从该图中可以看出，浮萍中主要含 K、Ca、Mn、Zn 和 Pb，可能含有少量的 Fe。图中红色划线部分是圈定的各元素感兴趣区。由于 $Mn_{k\beta}$ 对 $Fe_{k\alpha}$ 谱线重叠干扰，而图中 $Fe_{k\beta}$ 谱线峰很微弱，故未圈 Fe 元素的感兴趣区。由于 Pb 含量非常高，出现了铅的多条谱线峰 L_{α} (L_3M_5)、 L_{β} (L_2M_4)、 L_I (L_3M_1)、 L_{nu} (L_2M_1)。其中 Pb_{L_I} 的拖尾现象会影响 $Zn_{k\beta}$ 谱峰计数，故未圈 Zn 元素感兴趣区。浮萍中各元素的感兴趣区详情如下：K 3180~3460eV，Ca 3540~3840 eV，Mn 5750~6050 eV， $Pb_{L_{\beta}}$ 1245~1278 eV。

浮萍叶片部分的元素微区分布可指示元素在浮萍中的主要富集部位及存储特点。通过 SRXRF 微区分析了两个浮萍叶片的元素分布情况，分别为图 3-2-2 的单叶浮萍和图 3-2-3 的双叶浮萍（母子叶）。从图中可以看出，Pb 主要在浮萍的叶片边缘、根叶相交的节点处以及中间

叶脉中部富集，这与浮萍中另一个易富集元素 As 的分布特征不同，As 呈现典型的叶脉分布特征，即 As 主要沿浮萍的侧脉和中间叶脉分布，并在节点处含量达到最高^[24]。Mn 元素和 Pb 元素具有极其相似的分布特征，这与已报道的拟南芥中 Mn 和 Pb 形成竞争分布的特征不同^[25]。该文认为拟南芥中 Pb 分布对 Mn 等植物必需元素的吸收和分布的抑制，是拟南芥中毒凋亡的可能原因。这可能指示浮萍耐受 Pb，是由于 Pb 并未影响到 Mn 等有益元素的吸收。K 主要在叶基处富集，在单叶浮萍中显示了部分的叶脉分布特点，但 K 在浮萍中叶尖和边缘处缺乏。K 是植物所需的必须大量元素，以离子状态存在于植物中，能促进光合作用、糖代谢、脂肪代谢和蛋白质合成。一般 K 元素缺乏时，老叶尖端和边缘发黄，但叶脉两侧和中部仍为绿色。本浮萍的培养液中所用磷酸二氢钾浓度减半，K 元素含量少，浮萍可能已缺 K，这在浮萍 K 的微区分布特征中可得到证实。Ca 是植物所需的必须中量元素，维持了膜通透性与细胞完整性。浮萍中 Ca 呈现星点状在叶片中呈现较均匀分布。这与报道的拟南芥和白菜中 Ca 的分布特征不同。

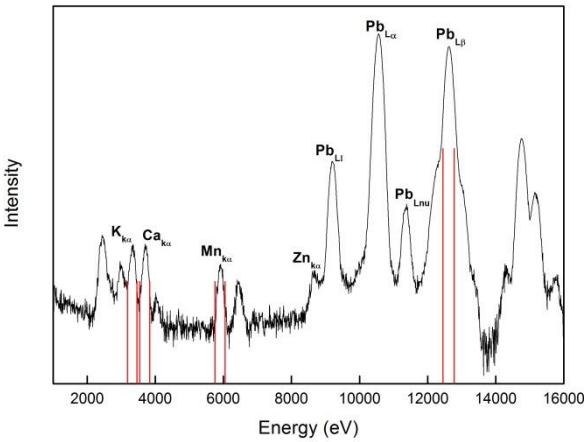


图 3-2-1 单叶浮萍 60s 的同步辐射 X 射线荧光光谱图及感兴趣区

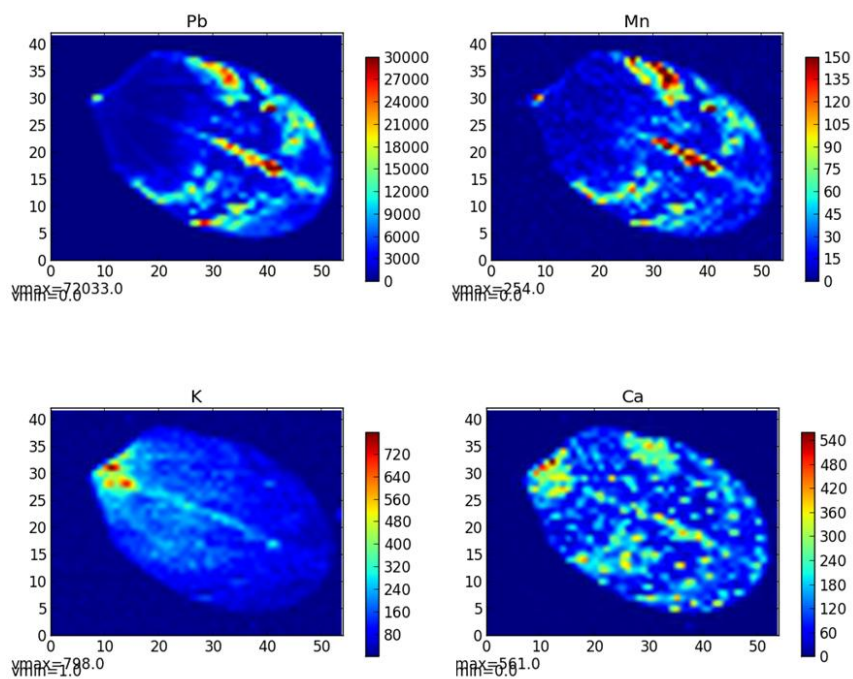


图 3-2-2 单叶浮萍中 Pb、Mn、K 和 Ca 元素分布图

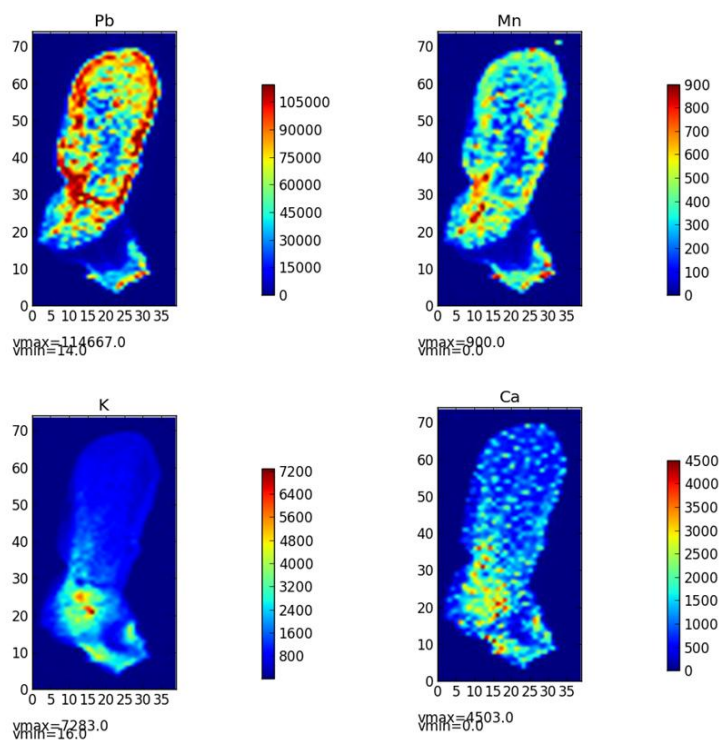


图 3-2-3 双叶浮萍中 Pb、Mn、K 和 Ca 元素分布图

3.3 浮萍中铅在细胞中的分布特征

为了研究 Pb 在浮萍亚细胞的分布情况及 Pb 对细胞的影响,开展了 Pb 浓度分别为 0, 0.05, 0.6, 2 和 6mg/L 五个组分浮萍的透射电子显微镜分析。其中锇酸染色制样方法能看见清晰的细胞结构,有助于观察 Pb 对细胞组织的影响,如图 3-3-1。未用锇酸染色的免疫电镜制样方法,虽然细胞结构不甚清晰,但可以观察到重元素 Pb 在细胞的沉积位置,如图 3-3-2。透射电镜配备的能量色散 X 射线光谱(EDS)可以针对局部的细胞位置,开展元素分析,以证实 Pb 元素在细胞的沉积,如图 3-3-3。

通过透射电子显微镜发现不同铅浓度培养的浮萍,其叶片的叶绿体结构有着明显的变化(图 3-3-1)。随着铅浓度增加,叶绿体中淀粉粒和质体小球数量增加,淀粉颗粒变大,类囊体结构逐渐变模糊。在 Pb 浓度为 6mg/L 组分下,叶绿体形状呈圆形,淀粉粒增大较多,影响了类囊体的稳定性,使其结构变模糊。类囊体上含有光合色素和电子传递链组分,可增大叶绿体的膜面积,增大光合作用率。在高浓度铅胁迫下,浮萍的叶绿体结构受到损伤,故 6mg/L 组分下,浮萍叶片部分发白。

通过免疫透射电镜发现(图 3-3-2),铅在浮萍的沉积部位主要在细胞间隙、细胞壁和液泡中。各组分的免疫电镜分析发现,前四个低浓度 Pb 组分(0, 0.05, 0.6 和 2mg/L)的电镜图片中并未观察到明显的黑色点状沉积,这说明低浓度 Pb 对细胞的影响很小。在高浓度组分 6mg/L 下,观察到黑色沉积,通过 EDS 能谱分析,发现该黑点中含铅(图 3-3-3 (c 和 d)),而非黑点的空白处能谱显示不含铅(图 3-3-3 (e))。因而,证实了铅在细胞的沉积。从图 3-3-2 和图 3-3-3 可以看出,6mg/L Pb 胁迫下,Pb 主要沉积在细胞壁和细胞间隙,一部分进入了液泡中,未见在其它细胞器中沉积。这说明,浮萍细胞可为 Pb 形成一个屏障,隔离 Pb 在细胞质外,从而减少了铅带来的细胞损伤。这从细胞的角度反映了浮萍具有抵御铅进入细胞质的能力。

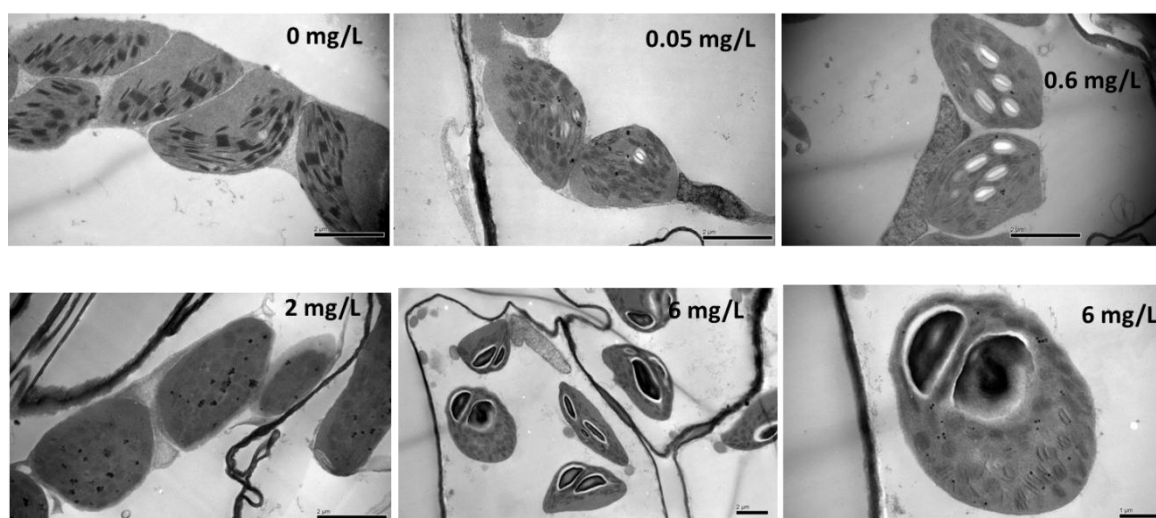


图 3-3-1 不同铅浓度下浮萍叶片的叶绿体结构变化

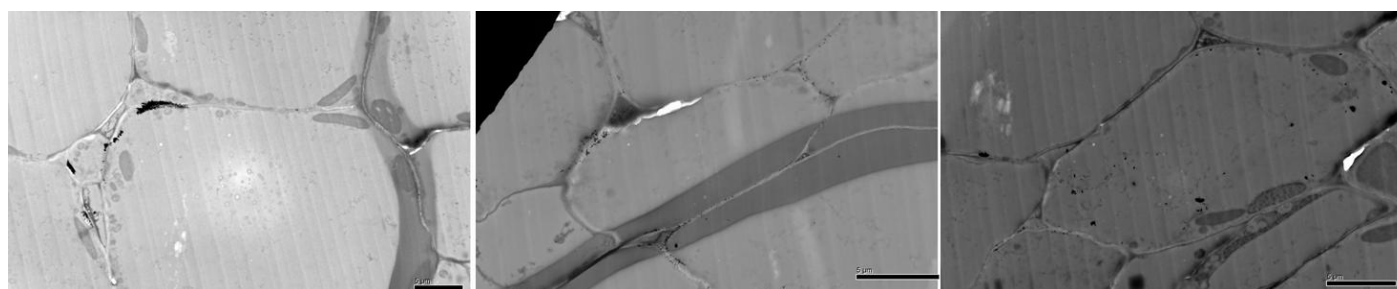


图 3-3-2 免疫电镜下观察到铅在浮萍细胞中的沉积（6mg/L 铅浓度组分）

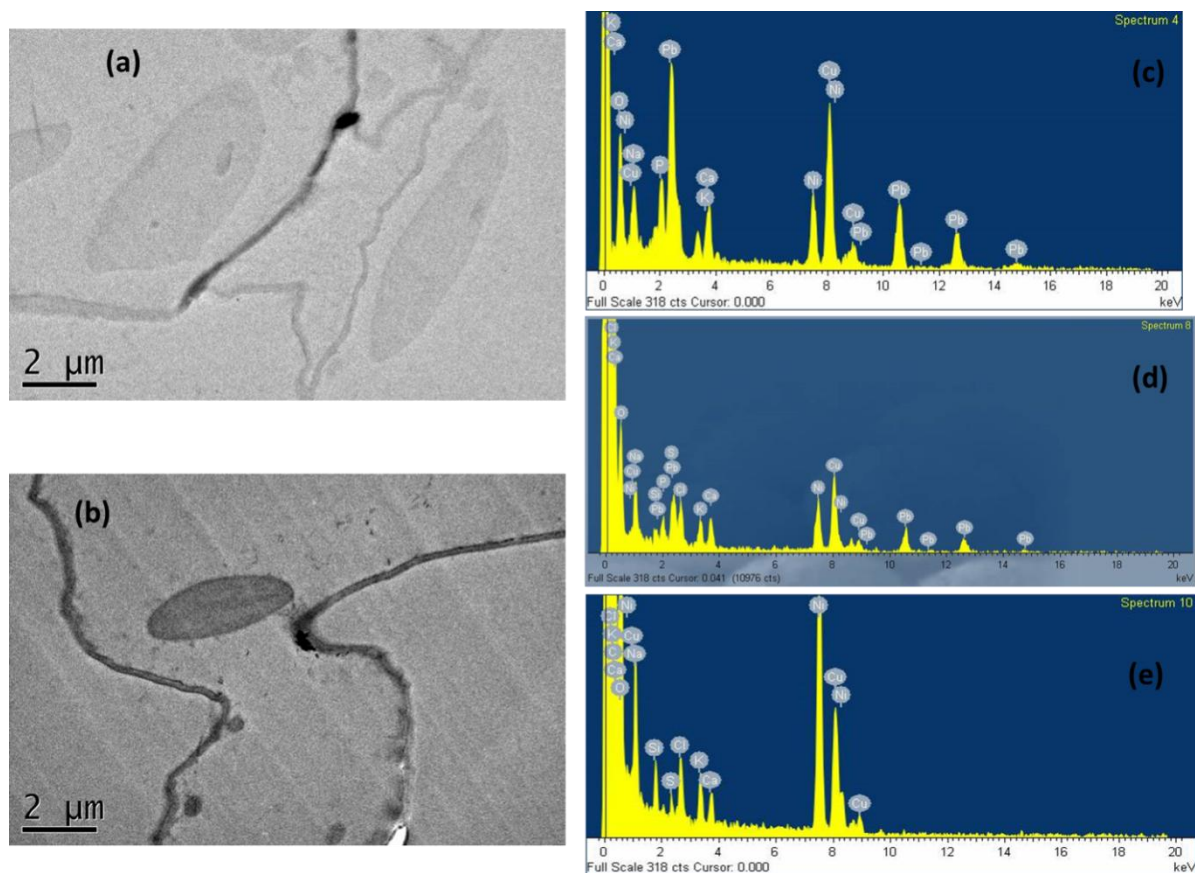


图 3-3-3 浮萍的透射电镜及能谱图，(a) 和 (b) 图黑点处的能谱图分别为 (c) 和 (d)，(e) 为空白处的能谱图。

3.4 铅胁迫下浮萍的比较蛋白质组学研究

比较蛋白质组学主要是分析比较不同条件下蛋白质组的变化和差异，发现和鉴定在不同生理条件下蛋白质组中的差异组分，从中揭示一定的生物学现象和规律。本研究是通过 iTRAQ 同位素标记技术开展比较蛋白质组学分析，同时联用液相色谱分离技术，弥补了胶分离的部分缺点，在蛋白质疏水性、相对分子质量和等电点方面的局限小，可并行处理和鉴定多组样品，提高了通量和缩小了批间误差。

重金属胁迫下植物的比较蛋白质组学研究一般针对有和无重金属两种状态下的差异蛋白质比较，忽略了重金属浓度对差异蛋白的影响。因而，本研究设置了五个不同 Pb 浓度梯度 0，0.05，0.6，2 和 6mg/L，开展比较蛋白质组学研究，以探寻 Pb 细胞解毒和耐受性相关的蛋白质。

为了提高数据分析的可靠性，每组样品开展了三次生物学重复实验，三次实验均有同一蛋白质检出，且蛋白质表达量 Abundance 三次的变异系数 CV%误差小于 20%的数据，予以统计。以两组表达量变化大于 1.20 或小于 0.83 作为差异蛋白的统计。

不同浓度铅胁迫下浮萍的差异表达蛋白情况,见表 3-4-1,表 3-4-2,表 3-4-3,表 3-4-4 和表 3-4-5。通过与对照组对比,发现随着铅浓度增高,下调表达蛋白的个数逐渐增多,上调表达的个数也有增加的趋势(表 3-4-1)。与对照组相比,四组明显上调表达的蛋白合计 104 个(去除重复蛋白),将这 104 个蛋白质按照功能(表 3-4-6)、生物作用过程(表 3-4-8)和亚细胞定位(表 3-4-7)分类统计,发现上调表达蛋白的主要功能为离子结合(ion binding)类的蛋白质(41 个);蛋白主要生物作用过程涉及应激响应(20 个)、有机酸代谢过程(20 个)、翻译(19 个)、光合作用(17 个)和碳水化合物代谢过程(16 个);蛋白的亚细胞定位主要在质体(48 个)中。离子结合类蛋白和应激响应类蛋白上调表达是植物抵御 Pb 胁迫的一个重要机制。

与对照组相比,四个铅胁迫组分均显著上调表达的蛋白质有两个,分别为作用于叶绿体类囊体中的过氧化物酶(Peroxiredoxin Q, chloroplastic)以及作用于质体中的核糖体蛋白(30S ribosomal protein S8, plastid)。过氧化物酶 Peroxiredoxin 是一种硫醇过氧化物酶,能够解毒过氧化物,并在酶活化和氧化还原感测中发挥着重要作用^[26, 27]。此蛋白酶在 Cd 富集大豆 Harosoy 中上调表达了 1.96 倍^[28]。核糖体蛋白是组成核糖体的主要成分,具有参与 DNA 修复、细胞发育调控和细胞分化等核糖体外功能,在细胞内蛋白质生物合成中发挥重要作用。目前铅胁迫下核糖体蛋白 30S ribosomal protein S8 上调表达还未见报道。上调表达的蛋白质 Peroxiredoxin Q 和 30S ribosomal protein S8 分别通过减小氧化性损伤和参与 DNA 修复,提高浮萍对 Pb 的耐受性。

另外,我们前期在浮萍中找到了一种铅结合蛋白 Luminal-binding protein,该蛋白质在四个铅胁迫组分中的表达量分别是对照组的 1.09 倍、1.08 倍、1.24 倍和 1.23 倍。该蛋白作用于内质网腔中,可纠正不正常形成的二硫键,在新合成蛋白质的成熟过程中起着重要作用^[29]。该蛋白在 100 μ M Cd 胁迫下的番茄根中上调表达了 2 倍^[30],在 Zn 超富集植物圆锥南芥亦上调表达^[31]。Solovyov 和 Gilbert^[32]认为该蛋白可以调节 Zn 的有效浓度,从而保护植物免受重金属的毒害。铅胁迫下, Luminal-binding protein 在浮萍中上调表达,亦有可能与铅离子结合,可能减少了铅对细胞器的损伤。

表 3-4-1 不同浓度铅胁迫下浮萍的差异表达蛋白统计

组分对比	下调表达蛋白个数	上调表达蛋白个数	总个数
0.05mg/L vs 0mg/L	1	18	19
0.6mg/L vs 0mg/L	7	44	51
2mg/L vs 0mg/L	20	27	47
6mg/L vs 0mg/L	21	65	86

表 3-4-2 Pb 浓度 0.05mg/L 胁迫下浮萍的差异表达蛋白

Accession	0.05mg/L vs 0mg/L		Protein Name
	Mean	CV%	
Q41739	0.82	14.93	Thiamine thiazole synthase 2, chloroplastic
Q9MB35	1.20	15.79	Peroxiredoxin Q, chloroplastic (Fragment)
Q6QPJ6	1.20	12.83	Peroxiredoxin Q, chloroplastic
A7M998	1.21	6.37	30S ribosomal protein S8, plastid
P41372	1.22	12.20	Profilin-1
P80607	1.22	6.97	Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming]
P00308	1.22	18.50	C-phycoerythrin-1 alpha chain
P00165	1.22	15.06	Cytochrome b6
P46488	1.23	17.79	Malate dehydrogenase, glyoxysomal
O04130	1.24	17.50	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 2, chloroplastic
Q9C8P0	1.25	10.89	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 5 of pyruvate dehydrogenase complex, chloroplastic
Q02924	1.27	6.50	Allophycocyanin beta chain
A0A330	1.30	16.72	Photystem II D2 protein
P04353	1.35	4.51	Calmodulin
Q02180	1.35	19.13	C-phycoerythrin class 1 subunit beta
Q9XF89	1.36	15.82	Chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic
Q02925	1.44	7.44	Phycobilisome 7.8 kDa linker polypeptide, allophycocyanin-associated, core
P00311	1.47	18.33	C-phycoerythrin beta chain
Q9SRZ6	1.58	19.41	Cytolic isocitrate dehydrogenase [NADP]

表 3-4-3 Pb 浓度 0.6mg/L 胁迫下浮萍的差异表达蛋白

Accession	0.6mg/L vs 0mg/L		Protein Name
	Mean	CV%	
Q41739	0.67	6.83	Thiamine thiazole synthase 2, chloroplastic
P00165	0.79	13.52	Cytochrome b6
A0A361	0.80	18.13	Photystem II CP47 reaction center protein
P54773	0.81	6.45	Photystem II 22 kDa protein, chloroplastic
Q9LY74	0.81	12.76	2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic
B1VKG9	0.81	19.71	Photystem II CP43 reaction center protein
P93306	0.82	16.65	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2
Q9LZ23	1.21	6.46	ACT domain-containing protein ACR12
P51349	1.21	7.64	60 kDa chaperonin, chloroplastic
O50008	1.21	12.23	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase 1
O04130	1.21	11.23	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 2, chloroplastic
P48495	1.21	17.73	Triphosphate isomerase, cytolis
Q6Z0I4	1.21	4.99	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] 1, chloroplastic
O24047	1.21	17.90	Malate dehydrogenase, cytoplasmic
Q43130	1.22	10.80	Enolase
Q05431	1.22	17.14	L-ascorbate peroxidase 1, cytolis
P49612	1.22	10.08	S-adenylmethionine synthase 1 (Fragment)
Q93VC7	1.22	15.17	30S ribomal protein S1, chloroplastic
P51378	1.23	8.18	C-phyococyanin alpha chain
Q8LD27	1.23	9.22	Proteasome subunit beta type-6
P40782	1.23	14.18	Cyprin (Fragment)
P43643	1.23	14.02	Elongation factor 1-alpha
Q09G09	1.23	17.41	50S ribomal protein L14, chloroplastic
O24030	1.23	12.85	Proteasome subunit alpha type-7
P29409	1.24	15.35	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic (Fragment)
P10933	1.24	16.89	Ferredoxin-NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic
Q9FLP6	1.25	16.50	Small ubiquitin-related modifier 2
Q39613	1.25	2.51	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
Q9SUI6	1.25	9.84	Photystem I reaction center subunit VI-2, chloroplastic
Q08080	1.25	6.34	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic (Fragment)
P93014	1.25	11.63	30S ribomal protein S5, chloroplastic
Q9C8P0	1.25	12.01	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 5 of pyruvate dehydrogenase complex, chloroplastic
Q09FY3	1.26	17.05	50S ribomal protein L2, chloroplastic
Q9FJA6	1.26	10.18	40S ribomal protein S3-3
P07030	1.26	0.60	Plastocyanin, chloroplastic
Q9M1X0	1.27	13.32	Ribosome-recycling factor, chloroplastic
Q84P52	1.28	7.25	Gamma aminobutyrate transaminase 3, chloroplastic
P42643	1.30	15.06	14-3-3-like protein GF14 chi
Q2PMV0	1.31	19.74	ATP synthase subunit beta, chloroplastic
O22160	1.31	15.92	Thylakoid lumenal 15 kDa protein 1, chloroplastic
Q9MB35	1.34	16.93	Peroxioredoxin Q, chloroplastic (Fragment)
Q9XJ27	1.34	12.97	30S ribomal protein S9, chloroplastic
Q42699	1.35	15.44	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase
P41372	1.36	10.47	Profilin-1
Q6QPJ6	1.38	15.96	Peroxioredoxin Q, chloroplastic
Q9XF89	1.39	8.31	Chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic
Q9LY66	1.40	17.53	50S ribomal protein L1, chloroplastic
P26302	1.46	17.63	Phosphoribulokinase, chloroplastic
A7M998	1.49	5.25	30S ribomal protein S8, plastid
P27521	1.56	8.55	Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic
Q02925	1.76	6.84	Phycobilisome 7.8 kDa linker polypeptide, allophycocyanin-associated, core

表 3-4-4 Pb 浓度 2mg/L 胁迫下浮萍的差异表达蛋白

Accession	2mg/L vs 0mg/L		Protein Name
	Mean	CV%	
P54205	0.53	17.16	Ribule biphosphate carboxylase large chain
P00311	0.55	9.71	C-phyococyanin beta chain
P51378	0.60	10.29	C-phyococyanin alpha chain
P28556	0.62	10.15	Allophycocyanin beta chain
P00316	0.62	12.88	Allophycocyanin alpha chain
P00308	0.65	6.98	C-phyococyanin-1 alpha chain
P51349	0.66	6.01	60 kDa chaperonin, chloroplastic
P00165	0.67	14.22	Cytochrome b6
Q55247	0.67	3.97	Nitrogen regulatory protein P-II
P51261	0.69	18.67	Allophycocyanin beta chain
B1VKG9	0.71	8.71	Photystem II CP43 reaction center protein
Q02180	0.72	13.64	C-phycoerythrin class 1 subunit beta
Q02924	0.72	17.45	Allophycocyanin beta chain
P27288	0.74	15.37	R-phyococyanin alpha chain
A0A361	0.75	9.59	Photystem II CP47 reaction center protein
Q940P8	0.77	15.84	T-complex protein 1 subunit beta
Q02179	0.78	8.90	C-phycoerythrin class 1 subunit alpha
Q7X999	0.80	1.30	Ribule biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplastic
P26527	0.81	14.33	ATP synthase subunit beta
Q02925	0.82	8.51	Phycobilisome 7.8 kDa linker polypeptide, allophycocyanin-associated, core
O04130	1.20	6.04	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 2, chloroplastic
O50008	1.20	7.12	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase 1
P41372	1.21	6.33	Profilin-1
O24030	1.21	10.36	Proteasome subunit alpha type-7
Q43130	1.21	11.75	Enolase
Q39613	1.22	6.10	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
O22518	1.22	11.64	40S ribosomal protein SA
Q94BQ2	1.22	7.33	26S protease regulatory subunit 8 homolog B
Q1WIQ6	1.22	13.74	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
P93819	1.23	4.96	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1
Q6QPJ6	1.23	12.76	Peroxisomal protein Q, chloroplastic
A7M998	1.24	8.26	30S ribosomal protein S8, plastid
Q84P52	1.24	8.79	Gamma aminobutyrate transaminase 3, chloroplastic
P24067	1.24	8.04	Luminal-binding protein 2
Q42736	1.25	5.79	Pyruvate, phosphate dikinase, chloroplastic
Q9SUI6	1.26	8.28	Photystem I reaction center subunit VI-2, chloroplastic
P93000	1.28	14.24	Germin-like protein subfamily 2 member 3
Q96558	1.28	12.98	UDP-glucose 6-dehydrogenase 1
Q43299	1.29	6.87	Phenolpyruvate carboxylase
P40782	1.30	9.11	Cyprin (Fragment)
P80607	1.30	18.53	Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming]
Q7FAH2	1.32	4.88	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic
Q9ZPS3	1.35	12.47	Glutamate decarboxylase 4
Q0J8A4	1.36	15.69	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, cytosolic
O24047	1.36	5.24	Malate dehydrogenase, cytoplasmic
Q09054	1.37	15.39	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic
P62736	1.39	11.82	Actin, aortic smooth muscle

表 3-4-5 Pb 浓度 6mg/L 胁迫下浮萍的差异表达蛋白

Accession	6mg/L vs 0mg/L		Protein Name
	Mean	CV%	
P27288	0.18	5.48	R-phycoerythrin alpha chain
P51378	0.24	16.09	C-phycoerythrin alpha chain
Q02924	0.30	18.96	Allophycocyanin beta chain
P26527	0.36	16.04	ATP synthase subunit beta
P00308	0.38	14.71	C-phycoerythrin-1 alpha chain
Q02179	0.39	15.95	C-phycoerythrin class 1 subunit alpha
Q55247	0.42	8.59	Nitrogen regulatory protein P-II
P62736	0.44	8.39	Actin, aortic smooth muscle
P28556	0.44	8.01	Allophycocyanin beta chain
O13419	0.67	3.24	Actin
Q940P8	0.68	10.78	T-complex protein 1 subunit beta
P00165	0.73	9.59	Cytochrome b6
Q9SF16	0.75	12.74	T-complex protein 1 subunit eta
P54773	0.75	15.24	Photystem II 22 kDa protein, chloroplastic
B1VKG9	0.75	14.14	Photystem II CP43 reaction center protein
P49361	0.76	17.89	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) A, mitochondrial
P37830	0.79	12.17	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, cytoplasmic isoform
P52032	0.80	16.36	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 1, chloroplastic
P46280	0.81	4.73	Elongation factor Tu, chloroplastic
A8W3D1	0.83	1.95	Cytochrome f
Q9SJB3	0.83	7.92	ATPase 5, plasma membrane-type
Q9SW96	1.21	15.94	Asparagine-tRNA ligase, cytoplasmic 1
P34795	1.21	2.84	Glucose-6-phosphate isomerase, cytosolic
Q43299	1.22	15.99	Phosphoenolpyruvate carboxylase
P35493	1.22	11.19	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
P08823	1.22	2.40	Rubisco large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic (Fragment)
Q09G09	1.23	7.18	50S ribosomal protein L14, chloroplastic
Q09FY3	1.23	8.69	50S ribosomal protein L2, chloroplastic
P24067	1.23	9.87	Luminal-binding protein 2
O64459	1.23	17.88	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
Q0WNZ5	1.23	18.27	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase 3, chloroplastic
P86387	1.24	11.85	Phospholipase D alpha 1
P49027	1.24	5.63	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein A
C02361	1.25	16.46	Chaperonin 60 subunit beta 3, chloroplastic
P42896	1.27	10.00	Enolase
Q8L940	1.27	6.32	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PDX1.3
P50346	1.28	8.83	60S acidic ribosomal protein P0
P17783	1.28	13.33	Malate dehydrogenase, mitochondrial
Q9FPJ4	1.29	8.65	Ras-related protein RABD2b
P93000	1.29	3.58	Germin-like protein subfamily 2 member 3
Q8LD27	1.30	9.96	Proteasome subunit beta type-6
Q9T070	1.30	2.20	Cytochrome c oxidase subunit 6a, mitochondrial
Q9SRZ6	1.31	9.06	Cytosolic isocitrate dehydrogenase [NADP]
Q9MB35	1.31	14.33	Peroxisomal protein Q, chloroplastic (Fragment)
Q9C8P0	1.31	11.36	Dihydropyridine-residue acetyltransferase component 5 of pyruvate dehydrogenase complex, chloroplastic
Q9LUT2	1.32	4.16	S-adenosylmethionine synthase 4
A0A337	1.32	14.29	30S ribosomal protein S4, chloroplastic
Q05431	1.33	18.63	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic
Q62014	1.33	10.79	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] 1, chloroplastic
Q43130	1.33	10.19	Enolase
P21240	1.33	7.24	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic
P33444	1.35	17.04	40S ribosomal protein S3a
O23255	1.35	3.46	Adenosylhomocysteinase 1
Q08080	1.35	5.51	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic (Fragment)
P48502	1.36	12.67	Cytochrome b-c1 complex subunit 7
Q95H50	1.36	15.65	50S ribosomal protein L16, chloroplastic
Q96558	1.37	18.41	UDP-glucose 6-dehydrogenase 1
Q7FAH2	1.38	7.45	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic
P49299	1.38	17.18	Citrate synthase, glyoxysomal
P93819	1.38	17.47	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1
Q9SF40	1.39	15.78	60S ribosomal protein L4-1
Q42699	1.39	15.03	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase
O48549	1.40	6.02	40S ribosomal protein S6-1
Q39043	1.41	15.38	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37f
P93014	1.42	13.81	30S ribosomal protein S5, chloroplastic
Q0J8A4	1.44	8.73	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, cytosolic
Q9LY66	1.44	8.93	50S ribosomal protein L1, chloroplastic
Q94JX9	1.44	9.28	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 2
O24030	1.45	10.78	Proteasome subunit alpha type-7
Q39613	1.46	15.41	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
Q6QPJ6	1.48	8.80	Peroxisomal protein Q, chloroplastic
O24047	1.48	13.98	Malate dehydrogenase, cytoplasmic
Q9ZRX0	1.51	6.19	Translationally-controlled tumor protein homolog
P49612	1.53	16.92	S-adenosylmethionine synthase 1 (Fragment)
A7M998	1.56	9.30	30S ribosomal protein S8, plastid
Q9SIM4	1.57	12.53	60S ribosomal protein L14-1
Q9LXG1	1.58	12.15	40S ribosomal protein S9-1
P43643	1.69	17.53	Elongation factor 1-alpha
Q9ZPS3	1.71	18.48	Glutamate decarboxylase 4
Q84P52	1.74	6.42	Gamma aminobutyrate transaminase 3, chloroplastic
P12357	1.78	8.67	Photystem I reaction center subunit V, chloroplastic
P46299	1.80	17.10	40S ribosomal protein S4
P93554	1.88	11.85	Nucleoside diphosphate kinase 1
Q9FFS8	1.88	15.28	40S ribosomal protein S10-2
Q9M885	1.92	15.36	40S ribosomal protein S7-2
Q41811	2.16	6.23	Histone H4.3

表 3-4-6 上调表达蛋白按功能分类统计

ID	Term	Frequency (p-value)
GO:0043167	ion binding	40 (0.05)
GO:0000166	nucleotide binding	26 (0.02)
GO:0003676	nucleic acid binding	20 (0.00)
GO:0016491	oxidoreductase activity	19 (0.00)
GO:0005198	structural molecule activity	18 (0.02)
GO:0016740	transferase activity	16 (0.13)
GO:0005515	protein binding	14 (0.06)
GO:0048037	cofactor binding	9 (0.00)
GO:0016787	hydrolase activity	7 (0.53)
GO:0046906	tetrapyrrole binding	6 (0.00)
GO:0016853	isomerase activity	5 (0.00)
GO:0016829	lyase activity	5 (0.03)
GO:0009055	electron carrier activity	4 (0.20)
GO:0008233	peptidase activity	3 (0.62)
GO:0016209	antioxidant activity	3 (0.00)
GO:0005215	transporter activity	2 (0.09)
GO:0001882	nucleoside binding	2 (0.31)
GO:0016597	amino acid binding	2 (0.00)
GO:0019842	vitamin binding	2 (0.26)
GO:0031409	pigment binding	2 (0.05)
GO:0043021	ribonucleoprotein complex binding	1 (0.00)
GO:0030234	enzyme regulator activity	1 (0.19)
GO:0016874	ligase activity	1 (0.53)
GO:0045735	nutrient reservoir activity	1 (0.08)
GO:0004871	signal transducer activity	1 (0.78)
	unclassified	13 (0.03)
Total UniProtKB ACCs in this JOB = 104		

表 3-4-7 上调表达蛋白按亚细胞定位分类统计

ID	Term	Frequency (p-value)
GO:0009536	plastid	48 (0.01)
GO:0005737	cytoplasm	43 (0.09)
GO:0016020	membrane	40 (0.00)
GO:0009579	thylakoid	23 (0.07)
GO:0005840	ribosome	19 (0.01)
GO:0055044	symplast	14 (0.08)
GO:0005634	nucleus	13 (0.07)
GO:0015935	small ribosomal subunit	9 (0.02)
GO:0005576	extracellular region	9 (0.02)
GO:0005618	cell wall	8 (0.01)
GO:0030076	light-harvesting complex	7 (0.01)
GO:0005773	vacuole	7 (0.01)
GO:0005739	mitochondrion	7 (0.00)
GO:0005730	nucleolus	6 (0.09)
GO:0009521	photosystem	5 (0.05)
GO:0005844	polysome	4 (0.01)
GO:0005783	endoplasmic reticulum	4 (0.03)
GO:0042579	microbody	3 (0.01)
GO:0043234	protein complex	3 (0.00)
GO:0000502	proteasome complex	3 (0.05)
GO:0005794	Golgi apparatus	3 (0.06)
GO:0005856	cytoskeleton	2 (0.00)
GO:0044464	cell part	2 (0.96)
GO:0032991	macromolecular complex	2 (0.00)
GO:0030684	preribosome	1 (0.03)
GO:0045277	respiratory chain complex	1 (0.00)
GO:0016469	proton-transporting two-se	1 (0.18)
GO:0031982	vesicle	1 (0.03)
GO:0043232	intracellular non-membrane	1 (0.00)
GO:0043230	extracellular organelle	1 (0.00)
GO:0031252	cell leading edge	1 (0.01)
GO:0030175	filopodium	1 (0.01)
GO:0045275	respiratory chain complex	1 (0.00)
GO:0000786	nucleosome	1 (0.00)
GO:0042995	cell projection	1 (0.01)
	unclassified	5 (0.01)
Total UniProtKB ACCs in this JOB = 104		

表 3-4-8 上调表达蛋白按生物作用过程分类统计

ID	Term	Frequency (p-value)
GO:0050896	response to stimulus	20 (0.03)
GO:0006082	organic acid metabolic process	20 (0.08)
GO:0006412	translation	19 (0.02)
GO:0015979	photosynthesis	17 (0.06)
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	16 (0.03)
GO:0051186	cofactor metabolic process	16 (0.03)
GO:0009117	nucleotide metabolic process	14 (0.02)
GO:0042254	ribosome biogenesis	12 (0.01)
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	12 (0.09)
GO:0065003	macromolecular complex assembly	10 (0.08)
GO:0050789	regulation of biological process	10 (0.02)
GO:0045333	cellular respiration	10 (0.01)
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	9 (0.00)
GO:0006464	cellular protein modification process	9 (0.06)
GO:0032501	multicellular organismal process	9 (0.01)
GO:0032502	developmental process	8 (0.02)
GO:0006996	organelle organization	8 (0.03)
GO:0044238	primary metabolic process	7 (0.01)
GO:0051704	multi-organism process	7 (0.06)
GO:0055114	oxidation-reduction process	6 (0.02)
GO:0006457	protein folding	6 (0.03)
GO:0006790	sulfur compound metabolic process	6 (0.07)
GO:0000003	reproduction	5 (0.07)
GO:0008152	metabolic process	5 (0.04)
GO:0065008	regulation of biological quality	5 (0.00)
GO:0006396	RNA processing	5 (0.00)
GO:0022900	electron transport chain	4 (0.00)
GO:0006081	cellular aldehyde metabolic process	4 (0.02)
GO:0006793	phosphorus metabolic process	4 (0.02)
GO:0015031	protein transport	3 (0.01)
GO:0006351	transcription, DNA-templated	3 (0.41)
GO:0006508	proteolysis	3 (0.00)
GO:0006730	one-carbon metabolic process	3 (0.01)
GO:0002376	immune system process	3 (0.00)
GO:0009057	macromolecule catabolic process	3 (0.00)
GO:0009657	plastid organization	2 (0.06)
GO:0051641	cellular localization	2 (0.11)
GO:0006725	cellular aromatic compound metabolic process	2 (0.67)
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	2 (0.38)
GO:0006119	oxidative phosphorylation	2 (0.67)
GO:0007005	mitochondrion organization	2 (0.01)
GO:0009225	nucleotide-sugar metabolic process	2 (0.08)
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	2 (0.69)
GO:0009116	nucleoside metabolic process	2 (0.08)
GO:0006810	transport	1 (0.34)
GO:0022411	cellular component disassembly	1 (0.00)
GO:0006766	vitamin metabolic process	1 (0.63)
GO:0051276	chromosome organization	1 (0.33)
GO:0016458	gene silencing	1 (0.05)
GO:0009059	macromolecule biosynthetic process	1 (0.86)
GO:0008150	biological_process	1 (0.02)
GO:0045229	external encapsulating structure organization	1 (0.30)
GO:0006818	hydrogen transport	1 (0.26)
GO:0006811	ion transport	1 (0.92)
GO:0016192	vesicle-mediated transport	1 (0.30)
GO:0016049	cell growth	1 (0.05)
GO:0016070	RNA metabolic process	1 (0.96)
GO:0015931	nucleobase-containing compound transport	1 (0.01)
GO:0043412	macromolecule modification	1 (0.49)
GO:0006936	muscle contraction	1 (0.03)
GO:0032989	cellular component morphogenesis	1 (0.36)
GO:0006629	lipid metabolic process	1 (0.24)
GO:0005976	polysaccharide metabolic process	1 (0.36)
GO:0046483	heterocycle metabolic process	1 (0.66)
GO:0006259	DNA metabolic process	1 (0.95)
GO:0043170	macromolecule metabolic process	1 (0.06)
GO:0006281	DNA repair	1 (0.98)
GO:0008015	blood circulation	1 (0.02)
GO:0019748	secondary metabolic process	1 (0.00)
	unclassified	9 (0.01)
Total UniProtKB ACCs in this JOB = 104		

四、 结论

以铅锌矿区浮萍为研究对象,通过铅抑制性实验分析,研究了浮萍生长抑制率与铅浓度的关系,确定浮萍中铅的半数效应浓度;通过同步辐射 X 射线荧光光谱微区分析、细胞超显微结构分析和比较蛋白质组学分析,研究了浮萍的耐铅机制。取得的主要成果如下。

(1)获得了适合浮萍铅抑制性培养实验的营养液配方。由于 SIS 培养液中含有大量的 PO_4^{3-} 和 CO_3^{2-} ,这些离子易与 Pb 离子形成沉淀,影响后期铅的抑制性实验。通过多次尝试,减少了 PO_4^{3-} 和 CO_3^{2-} 的浓度,确定了用于实验的营养液配方,通过 ICP-AES 测定,确定设计浓度和测定浓度相当,可用于铅抑制性实验。

(2)确定了浮萍中铅的半数效应浓度,评价了浮萍修复水铅污染的能力。通过 Pb 抑制性实验,发现在水 Pb 浓度为 0.05mg/L 和 0.1mg/L 时,浮萍的相对生长率比对照组高出 4.7%和 3.5%,说明低浓度铅有助于浮萍的生长。另外,确定了浮萍中 Pb 的半数效应浓度 EC_{50} 为 5.9mg/L,是地表水 V 类水体 Pb 限值 (0.1 mg/L) 的 59 倍,说明浮萍修复水体铅污染的能力较强。

(3)研究了铅在浮萍中的微区分布特征。SRXRF 分析发现,Pb 主要在浮萍的叶片边缘、根叶相交的节点处以及中间叶脉中部富集。Mn 元素和 Pb 元素具有极其相似的分布特征,这与已报到的拟南芥中 Pb 与 Mn 元素竞争分布特征不同。Pb 会抑制拟南芥对 Mn 元素的吸收,导致植物中毒凋亡。然而,浮萍中高浓度的 Pb 也未影响到 Mn 等有益元素的吸收,这从元素微区分布的角度揭示了浮萍能够耐受 Pb。

(4)揭示了浮萍的耐铅机制。超显微结构分析发现浮萍中铅主要被隔离在细胞壁和细胞间隙中,极少数进入了细胞质,从而减少了铅带来的细胞损伤。比较蛋白质组学研究发现,铅胁迫下,浮萍中离子结合类蛋白和应激响应类蛋白大量表达,是浮萍抵御铅的防御机制。另外,还发现了三种蛋白 Peroxiredoxin Q、30S ribosomal protein S8 和 Luminal-binding protein 2 在抵御铅毒害方面发挥着重要作用。

参考文献

- [1] Pourrut B., Shahid M., Dumat C., Winterton P., Pinelli E. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants [J]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213, 2011, 113-36.
- [2] Rahman A., Brew B. J., Guillemin G. J. Lead dysregulates serine/threonine protein phosphatases in human neurons [J]. Neurochemical research, 2011, 36(2): 195-204.
- [3] Mahmood Q., Rashid A., Ahmad S. S., Azim M. R., Bilal M. Current Status of Toxic Metals Addition to Environment and Its Consequences [J]. The Plant Family Brassicaceae, 2012, 35-69.
- [4] Tong S., Von Schirnding Y. E., Prapamontol T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions [J]. Bulletin of the World Health Organization, 2000, 78(9): 1068-77.
- [5] Nriagu J. O., Pacyna J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals [J]. Nature, 1988, 333(6169): 134-9.
- [6] 李永华, 姬艳芳, 杨林生, 李顺江. 采选矿活动对铅锌矿区水体中重金属污染研究 [J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(1): 103-7.
- [7] 曾凡萍, 肖化云, 周文斌. 乐安江河水和沉积物中 Cu, Pb, Zn 的时空变化特征及来源分析 [J]. 环境科学研究, 2008, 20(6): 14-20.
- [8] 毛海立, 王震, 龙成梅, 邹洪涛, 钟才宁. 重金属铅超富集植物的研究进展 [J]. 黔南民族师范学院学报, 2011, 31(3): 50-4.
- [9] SaygiDeger S. D., Keser G., Dogan M. Effects of lead on chlorophyll content, total nitrogen, and antioxidant enzyme activities in duckweed (*Lemna minor*) [J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2013, 15(1): 145-8.
- [10] Dirilgen N. Mercury and lead: Assessing the toxic effects on growth and metal accumulation by *Lemna minor* [J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2011, 74(1): 48-54.
- [11] Vaseem H., Banerjee T. Phytoremediation of the toxic effluent generated during recovery of precious metals from polymetallic sea nodules [J]. International Journal of Phytoremediation, 2012, 14(5): 457-66.
- [12] Li T., Xiong Z. A novel response of wild - type duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) to heavy metals [J]. Environmental toxicology, 2004, 19(2): 95-102.
- [13] 种云霄, 胡洪营, 崔理华, 吴启堂, 钱易. 浮萍植物在污水处理中的应用研究进展 [J]. 环境污染治理技术与设备, 2006, 7(3): 14-8.
- [14] 钟庆禄. 南京栖霞山大型铅锌银多金属矿床的发现及其找矿远景 [J]. 地质学刊, 1998, js): 56-61.
- [15] 肖振民, 蔡彩文, 郭晓山等. 南京栖霞山铅锌银锰硫矿床层控及二源二次成矿问题的探讨 [J]. 华东冶金地质, 1980, 2): 1~ 7.
- [16] 谢树成, 殷鸿福. 南京栖霞山多金属矿床的有机成矿作用 [J]. 矿床地质, 1997, 16(004): 289-97.
- [17] 徐忠发, 曾正海. 南京栖霞山铅锌银矿床成矿作用与岩浆活动关系探讨 [J]. 江苏地质, 2006, 30(003): 177-82.
- [18] 曹执庸, 孙南圭, 隋增震, 廖永璋. 栖霞山矿床物质成分的多元统计分析 [J]. 中国地质科学院南京地质矿产研究所文集 (9), 1983, 4(1): 27-44.
- [19] 真允庆, 陈金欣. 南京栖霞山铅锌矿床硫铅同位素组成及其成因 [J]. 桂林工学院学报,

1986, 6(4): 319-28.

[20] 褚桂棠. 南京栖霞山环境地质问题的研究 [J]. 江苏地质, 1986, 10(4): 38-42.

[21] 项长兴, 董雅文. 南京栖霞山铅锌矿区土壤环境质量评价 [J]. 土壤, 1993, 25(6): 319-22.

[22] 储彬彬, 罗立强. 南京栖霞山铅锌矿地区土壤重金属污染评价 [J]. 岩矿测试, 2010, 29(1): 5-8.

[23] 王晓芳, 罗立强. 铅锌银矿区蔬菜中重金属吸收特征及分布规律 [J]. 生态环境学报, 2009, 18(1): 143-8.

[24] 储彬彬, 罗立强, 马艳红. 基于同步辐射 X 射线荧光光谱和 X 射线吸收近边结构谱研究铅锌矿区浮萍中砷的耐受机制 [J]. 分析化学, 2017, 45(5): 668-73.

[25] 沈亚婷. 原位微区同步辐射 X 射线荧光和近边吸收谱研究拟南芥幼苗及根际土壤中铅分布与形态特征 [J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(3): 818-22.

[26] Dietz K.-J. Plant peroxiredoxins [J]. Annual review of plant biology, 2003, 54(1): 93-107.

[27] Barranco-Medina S., Lázaro J.-J., Dietz K.-J. The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function [J]. FEBS letters, 2009, 583(12): 1809-16.

[28] Hossain Z., Hajika M., Komatsu S. Comparative proteome analysis of high and low cadmium accumulating soybeans under cadmium stress [J]. Amino Acids, 2012, 43(6): 2393-416.

[29] Song J. L., Wang C. C. Chaperone - like activity of protein disulfide - isomerase in the refolding of rhodanese [J]. European Journal of Biochemistry, 1995, 231(2): 312-6.

[30] Rodríguez-Celma J., Relán- lvarez R., Abadía A., Abadía J., López-Millán A.-F. Changes induced by two levels of cadmium toxicity in the 2-DE protein profile of tomato roots [J]. Journal of proteomics, 2010, 73(9): 1694-706.

[31] Zeng X.-W., Qiu R.-L., Ying R.-R., Tang Y.-T., Tang L., Fang X.-H. The differentially-expressed proteome in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabis paniculata* Franch. in response to Zn and Cd [J]. Chemosphere, 2011, 82(3): 321-8.

[32] Solovyov A., Gilbert H. F. Zinc - dependent dimerization of the folding catalyst, protein disulfide isomerase [J]. Protein science, 2004, 13(7): 1902-7.