

玉米发芽过程中 Cd 和硫醇化合物相互作用的研究

薛洪宝^{1,2}, 常华兰¹, 陶兆林^{1*}, 梁丽丽¹, 李 晖²

(1.蚌埠医学院公共课程部化学教研室, 安徽 蚌埠 233000; 2.四川大学化学工程学院 成都 610065)

摘 要:随着现代工业的发展,重金属镉(Cd)对农作物的污染情况日趋严重,作为广泛传播的污染物,Cd 易于通过土壤被农作物吸收。为了研究玉米对毒性金属积累、暴露响应和耐受机制,以探讨玉米发芽过程中 Cd 与硫醇化合物相互作用机理为目的,利用毛细管电泳等分析技术,研究了 Cd 对玉米发芽势、发芽率的影响,培养液中 Cd²⁺对玉米种子中 Cd 含量的影响,Cd-硫醇化合物吸收光谱和玉米种子中硫醇化合物含量水平。结果表明,发芽率和发芽势呈无规律性变化;当玉米经过含 Cd²⁺培养液浸泡时,存在着 Cd²⁺在二者间的相互迁移作用,且迁移作用呈线性关系(5 d 除外);当 Cd 与硫醇化合物共存时,Cd-硫醇化合物吸收光谱暗示形成金属硫蛋白;硫醇化合物含量随 Cd 的存在呈现先增加后减少的变化规律,Cd²⁺浓度为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时含量达最大值,更高浓度时,其含量降至低于空白对照样品值。研究结果表明,不同种类的硫醇化合物含量可间接指示金属 Cd 对植物种子发芽毒害影响程度。

关键词:玉米;镉;硫醇化合物;相互作用

中图分类号:X503.231 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)05-0824-06

The Interaction Between Cd and Thiol Compounds During the Maize Seed Germination

XUE Hong-bao^{1,2}, CHANG Hua-lan¹, TAO Zhao-lin^{1*}, LIANG Li-li¹, LI Hui²

(1.Teaching and Research Section of Chemistry, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China; 2.College of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: The heavy metal Cd is present in varying amounts in agricultural crops. It is a widely spread pollutant. With the development of industry, it can reach high levels in agricultural soils and easily be assimilated by plants. During the bio-process of maize germination, capillary electrophoresis and other modern analytical techniques were used to explore the interaction mechanism between Cd and thiol compounds. Cd impacted maize germination viability, germination rate, culture medium Cd²⁺ impacted the Cd content of maize seeds, the Cd-thiol compounds absorption spectra and thiol compounds content in maize seed were investigated. The results of our experiments suggested that the germination rate and germination viability changed irregularly with the increase of Cd²⁺ concentration and cultivating days. The intermigration of Cd²⁺ occurred when the maize immersed the culture medium containing Cd²⁺, and the migration had a linear relationship(except for 5 days) with the increase of Cd²⁺. Under the co-existence of Cd and thiol compounds, the Cd-thiol compounds absorption spectra implied the formation of Metallothionein. The content of thiol compounds increased and then decreased with Cd existence. The content reached maximum value as Cd²⁺ concentration was 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. When Cd²⁺ concentration was higher, the content decreased significantly below the level of the untreated control sample. The compounds were the indicators of the effect of Cd on the formation of potential heavy metal responding on plant seed germinating.

Keywords: maize; Cd; thiol compounds; interaction

重金属 Cd 是一种广泛存在于各种相关农作物中的污染物,严格限制农作物中 Cd 含量备受关注,因此研究谷类作物中 Cd 水平导致的相关生物作用

具有重要意义^[1]。Cd 有一些未知的生物学功能,甚至在极低浓度范围内就表现出高的毒性,能诱导各种明显植物中毒症状^[2]。危害植物毒性强弱通常通过硫醇化合物如半胱氨酸(Cys)、还原性谷胱甘肽(GSH)和氧化性谷胱甘肽(GSSG)的含量水平来评价,硫醇化合物的含量水平能有效反应生物体中 Cd 中毒的程度^[3]。Chassaigne 等^[4-5]研究了玉米秧苗在 Cd 暴露条件下,生物体外由酶促进反应得到植物金属螯合剂类多

收稿日期:2010-11-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(29877018)

作者简介:薛洪宝(1979—),男,河北秦皇岛人,博士,讲师,主要从事生物分析技术研究。E-mail:hongbaoxueqhd@126.com

* 通讯作者:陶兆林

肽,并通过质谱法确定了相关的多肽。Clemens^[6]总结了植物中含硫化合物对毒性金属积累、暴露响应和耐受机理所起的解毒作用。本文采用化学及生物方法,对玉米种子发芽过程中Cd与硫醇化合物相互作用进行了研究,为其对植物生长的影响提供相关生物信息。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

电感耦合等离子原子发射光谱仪(Thermo Fisher Scientific corporation, USA):功率100 W,冷却气高流速,辅助气流速 $1.0\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$,喷雾器载气压力0.21 MPa,循环喷雾系统,样品进样速度 $1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样时间2.0 s,扫描频率27.12 MHz;波长214.438、228.802 nm。双光束紫外分光光度计(TU-1901,北京普析通用分析仪器有限公司)。 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.2),采用全波长扫描测量。毛细管电泳仪(Beckman-Coulter P/ACE 5500, USA)。激光诱导荧光检测器检测波长520 nm,毛细管长度57 cm,进样压力3.45 kPa(0.5 psi),进样时间为3 s,分离电压15 kV,升压时间为10 s,毛细管温度保持在25℃。

1.2 实验材料

玉米种子(杂交31×P138,中国农业大学),L-半胱氨酸(Cys,成都科龙试剂厂),L-还原型谷胱甘肽(GSH, Beijing Topbio science & technology Co. Ltd.), L-氧化型谷胱甘肽(GSSG, Beijing Topbio science & technology Co. Ltd.), 荧光标记试剂(bromobimane, Sigma-Aldrich, USA), N-2-羟基乙基哌嗪-N'-3-丙烷磺酸(HEPPS, Sigma-Aldrich, USA), 二乙烯三胺五乙酸(DTPA; Sigma-Aldrich, switzerland)。其他化学试剂:乙二胺四乙酸(EDTA)、乙腈、乙醇、 CdCl_2 、 NaH_2PO_4 、HCl、 HNO_3 、 HClO_4 、 H_2O_2 、NaOH等, HBO_3 为分析纯试剂。

1.3 分析样品制备

1.3.1 玉米种子的培养

精选5批玉米种子,每批30粒,用蒸馏水冲洗后用75%的乙醇浸泡杀菌,再用蒸馏水浸泡4 h。把玉米种子放入玻璃培养皿(直径120 mm,深20 mm)中,培养皿依次编号,空白为100 mL蒸馏水,其他分别为5、10、50、 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 诱导培养液。将每一批玉米种子放在滤纸上后浸泡到培养液中,培养皿放入恒温培养箱中,培养温度28℃,明暗时间比为(16/8)h,培养1 d,实验重复3次。第2、3、4、5 d的培养实

验条件与第1 d的相同。

培养后,收集根、芽、胚乳等植物组织,弃去培养液,用pH5.6的 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA溶液清洗相关生物组织表面以除去粘附的 Cd^{2+} 。然后将生物组织置于烘箱中加热到60℃,用约20 h干燥至恒重。恒重的植物组织混合样品,粉碎成细小颗粒(粒度 $<3\text{ }\mu\text{m}$),称量作为Cd含量和硫醇化合物含量分析的待测样品。

1.3.2 Cd含量测定的样品制备

分别称取1.000 0 g培养不同天数,混合的根、芽、胚乳恒重样品至消化罐中,加入5.0 mL硝酸,2.0 mL双氧水和1.0 mL高氯酸,微波消解处理后,加热赶酸,定容至10 mL用于ICP-AES分析。同时作空白实验。

1.3.3 UV吸收检测的样品制备

称取0.500 0 g培养3 d的样品于试管中,加入1.0 mL蒸馏水润湿后,用液氮冷冻破坏细胞。冷冻样品溶于1.0 mL $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.2)中。恒温4℃下,充分混合样品,然后在4℃下离心($14\ 000\times g$)分离30 min后,滤膜($0.45\text{ }\mu\text{m}$)过滤上清液,定容至10 mL作为紫外检测样品。

1.3.4 电泳分析的样品制备

取紫外检测中滤膜过滤上清液1.0 mL,封入带有两个小孔的6 mL小瓶中,其中一孔吹入氩气以排除氧气^[7]。其次,将0.9 mL $0.163\ 7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 荧光标记试剂加入HEPPS缓冲液(0.9 mL $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ N-2-羟基乙基哌嗪-N'-3-丙烷磺酸,0.9 mL $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二乙烯三胺五乙酸和1 mL 50%乙腈, pH7.8)中,预热该缓冲液至70℃,注入小瓶中,并充分混匀。小瓶在暗处加热并保持恒温70℃下,反应30 min。混合物用50%乙腈定容至10 mL,于-70℃储存以备毛细管电泳分析。

2 结果与讨论

2.1 种子的发芽率和发芽势

玉米种子培养过程中的发芽率、发芽势结果见图1。在 $0\sim 100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同 Cd^{2+} 浓度下,培养1 d的发芽率均为0,第2、3、4、5 d的发芽率第与1 d的比较,发芽率呈现随机变化规律[图1(A)],本文结果与文献[2]报道相吻合。发芽势[图1(B)],培养1 d的与发芽率变化相同,也是0。而培养第2、3、4、5 d的发芽势显示出不同的变化规律。其结果显示,无 Cd^{2+} 空白样品的发芽势显示出无规律性,并与发芽率结果类似,第2、3、4、5 d的发芽势随培养液中 Cd^{2+} 浓度增加而呈现出不同的变化规律。图1(B)中,培养2 d的样

品,当 Cd^{2+} 浓度为 5 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,种子的发芽势随浓度升高而降低,当 Cd^{2+} 浓度大于 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,发芽势基本保持不变。第 3、4、5 d 的发芽势在 $10\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度间呈现无规律性变化。但是,当 Cd^{2+} 浓度在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 到 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,发芽势基本达到最大值,此浓度范围能激活玉米种子发芽。本研究的实验数据显示, Cd^{2+} 的存在能诱导玉米种子的发芽,但发芽率和发芽势的变化无一定规律性。

2.2 样品中 Cd 的吸收

图 2 是利用 ICP-AES 测定的玉米经培养液浸泡

后玉米中 Cd 的总含量(干重)。玉米样品中 Cd 含量随培养液中 Cd^{2+} 浓度的变化,除培养 5 d 外,其他培养天数均呈线性变化,且 Cd 的吸收曲线斜率不同,其顺序是第 3 d<第 4 d<第 1 d<第 2 d。而培养 5 d 的 Cd 吸收曲线不呈线性关系的类似报道结果也有^[3,8]。表明当玉米经过含 Cd^{2+} 培养液浸泡时,存在着 Cd^{2+} 在二者间的相互迁移作用。

2.3 样品的紫外吸收光谱

通常 pH 对金属和硫形成的化合物的吸收曲线有影响。本实验中,取培养 3 d 的玉米样品,改变 Cd

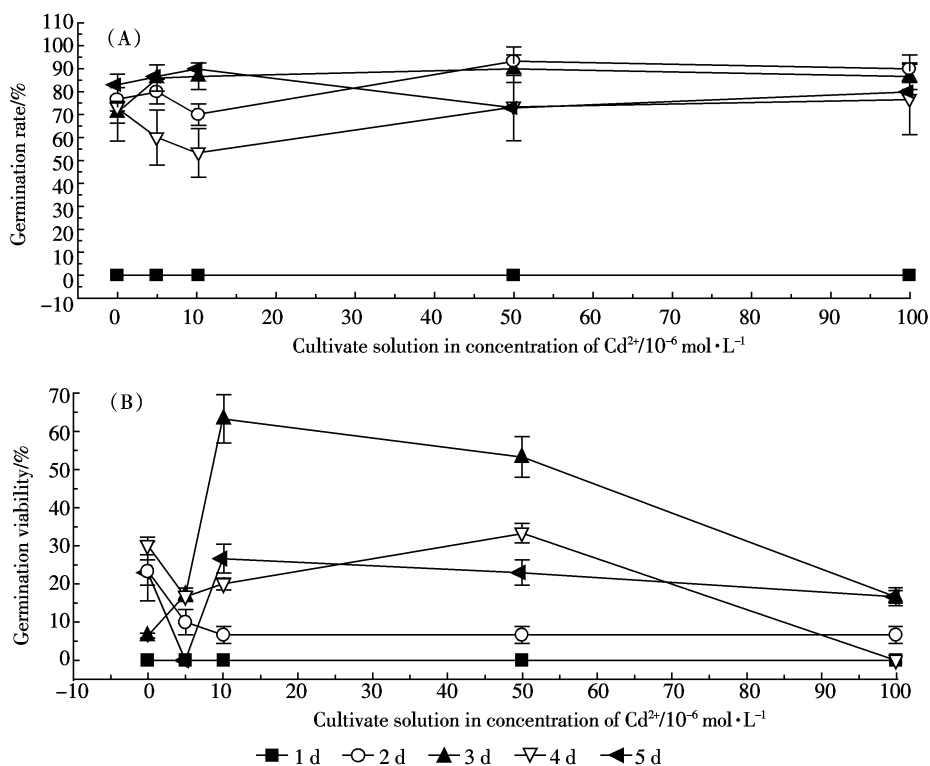


图 1 不同 Cd^{2+} 浓度培养液中不同培养天数的玉米种子发芽率(A)和发芽势(B)

Figure 1 Maize seed germination rate(A) and germination viability(B) of cultivating in solution of different concentration of Cd^{2+} for different cultivating days

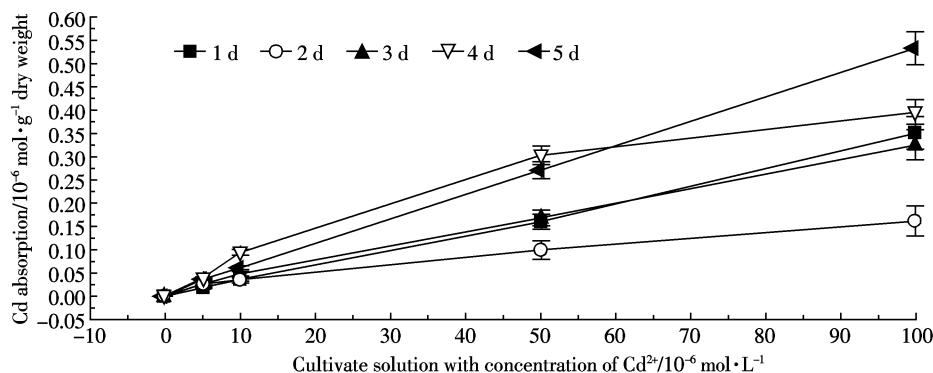


图 2 不同 Cd^{2+} 浓度培养液中不同培养天数的玉米样品总 Cd 含量

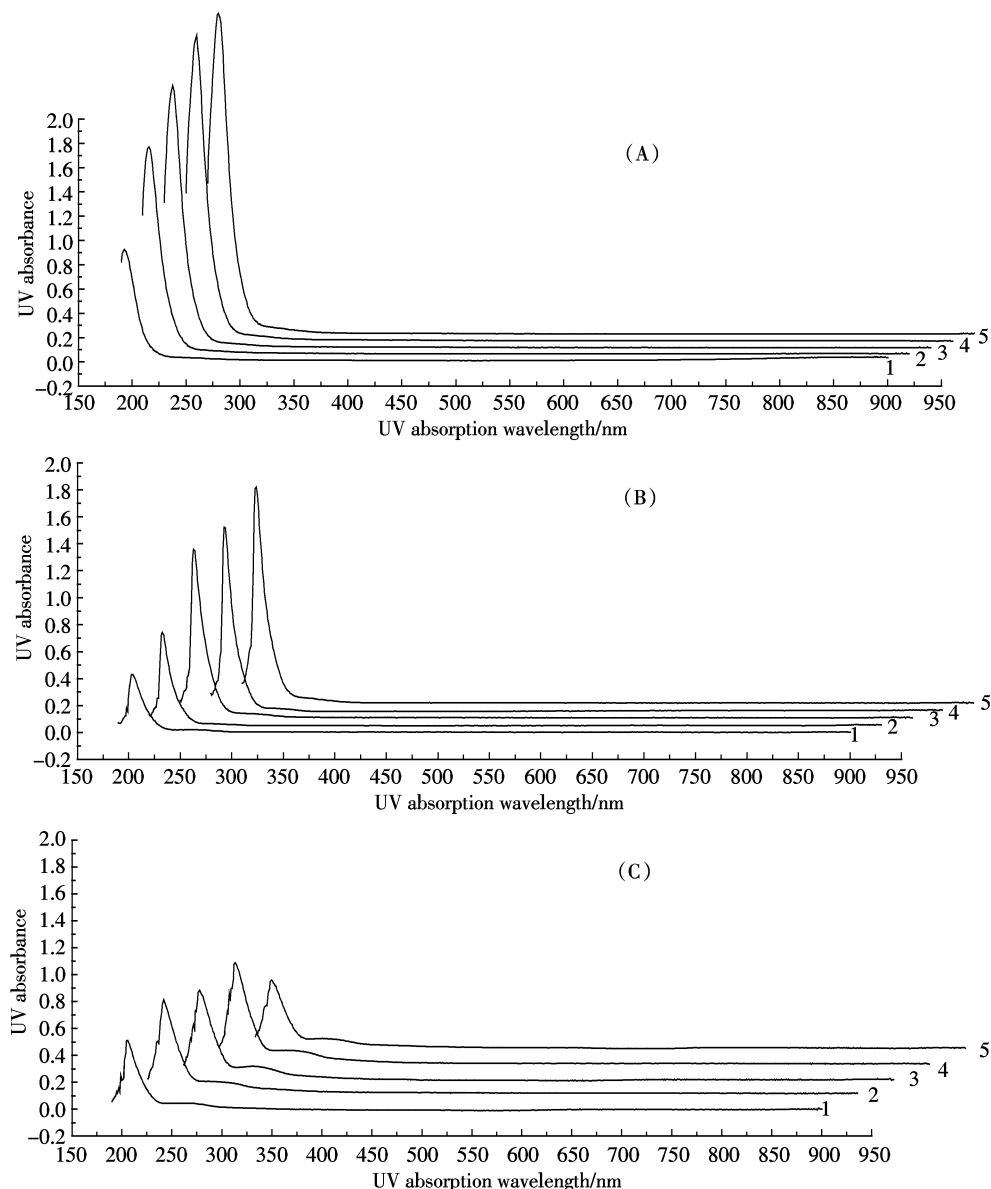
Figure 2 Total Cd content in maize sample of cultivating in solution of different concentration of Cd^{2+} in different days

浓度,考察 pH 对吸收曲线的影响,结果表明最佳的 pH 范围是 4~6。其次,对含有半胱氨酸、还原型和氧化性谷胱甘肽, Cd^{2+} +半胱氨酸、还原型和氧化性谷胱甘肽及培养 3 d 的玉米样品这 3 个体系,在 190~900 nm 范围内进行全波长扫描,结果见图 3。比较图 3 (A)和(B)可见, Cd^{2+} 和半胱氨酸、还原型和氧化性谷胱甘肽共存时的吸收光谱发生了较明显的变化,整个

吸收曲线发生位移,且在 263 nm 处检测到其他吸收峰。图 3(C)的吸收曲线变化规律与图 3(B)类同。据上述结果,在 Cd^{2+} 和半胱氨酸、还原型和氧化性谷胱甘肽共存时,可以推测 Cd 和 S 结合形成金属硫蛋白。

2.4 样品溶液中硫醇化合物的定量

图 4 是样品溶液经毛细管电泳分离后所得结果。



(A)半胱氨酸、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽标准样,1~5 表示浓度分别为 20、40、60、80、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (B)混有相应浓度 Cd^{2+} 的半胱氨酸、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽标准样,1~5 表示浓度分别为 20、40、60、80、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (C)培养 3 d 的玉米样品(稀释 50 倍),1~5 表示培养液中 Cd^{2+} 含量为 0、5、10、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对应的样品

(A)Standard solution of Cys, GSH and GSSG, 1~5 indicate contain 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys, GSH and GSSG, respectively; (B)Standard solution of Cys, GSH and GSSG mixed with corresponding Cd^{2+} concentration, 1~5 indicate contain 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cys, GSH and GSSG, respectively; (C)3 days cultivated maize sample solution(50 times diluted), 1~5 indicate sample of 0, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} concentration in cultivation solution.

图 3 不同样品全波长扫描紫外可见吸收光谱图

Figure 3 Full wavelength scanning ultra-violet absorption spectrum of the sample

半胱氨酸分离效果较好,谷胱甘肽由于衍生化反应的影响,分离效果较差。本文取峰高值进行半胱氨酸和谷胱甘肽定量,定量结果如图 5 所示。

实验结果显示,3 种硫醇化合物含量均呈随培养液中 Cd^{2+} 浓度的增加而先减少后增加再减少的变化规律。这是因为一旦培养液中有 Cd^{2+} 存在下, Cd^{2+} 与硫醇化合物结合,导致硫醇化合物降低。当培养液中包含一定量的 Cd^{2+} 时,半胱氨酸,还原型、氧化型谷胱甘肽都被剧烈消耗,含量降到一定程度后会诱导合成植物金属螯合剂,与重金属发生更牢固的螯合作用,这种作用比重金属与半胱氨酸,谷胱甘肽的作用更强

烈,因此 3 种物质含量开始剧烈增加,在 Cd^{2+} 浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时含量呈最大值,此时玉米对 Cd 的特异性应激反应已经达到了最大值。更高浓度重金属存在时,玉米体内帮助其抵抗和削减金属毒性^[9]的防御系统遭破坏,硫醇化合物含量开始降低。当 Cd^{2+} 浓度达到 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,由于防御系统完全被破坏,硫醇化合物含量降到最低,甚至低于空白对照样品值。

3 结论

(1)Cd 的存在影响玉米的发芽率和发芽势,呈无规律性的变化。当 Cd^{2+} 浓度在 $10 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围

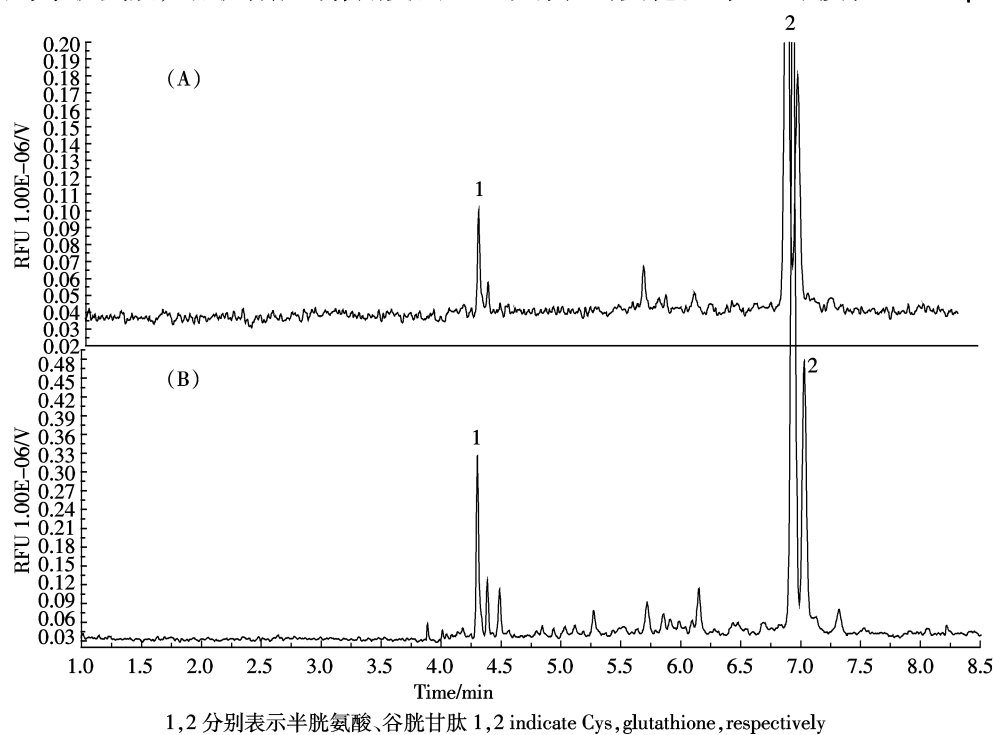


图 4 半胱氨酸、谷胱甘肽标准样(A)及玉米样品中的半胱氨酸、谷胱甘肽(B)电泳图

Figure 4 Electropherogram of the Cys, glutathione in standard solution(A) and Cys, glutathione in maize samples(B)

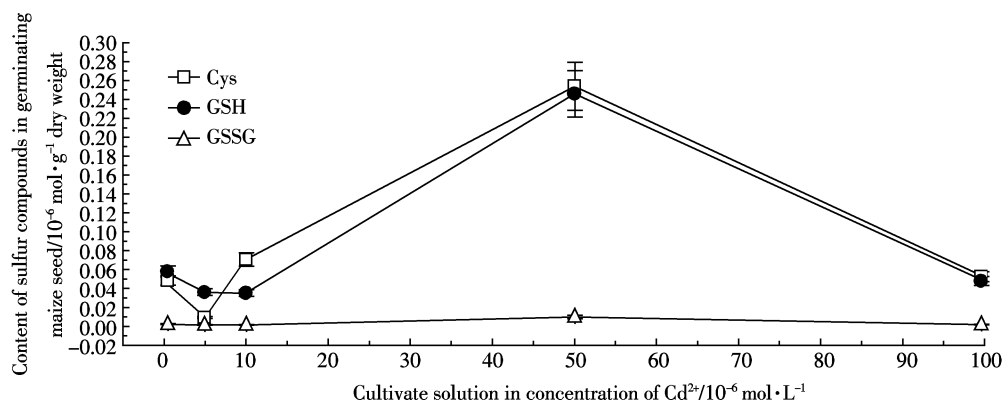


图 5 培养 3 d 的玉米样品中半胱氨酸、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽含量

Figure 5 The content of Cys, GSH and GSSG in the maize sample in 3 days cultivation

时,发芽势达最大值,是激活玉米种子发芽的适宜浓度范围。

(2)除培养5 d外,培养液中 Cd^{2+} 浓度对玉米种子中Cd含量的影响均呈线性变化。

(3)紫外吸收光谱表明,Cd与硫醇化合物共存时,可能形成金属硫蛋白。

(4)硫醇化合物是Cd对植物种子发芽影响形成的潜在的重金属响应指示剂。当培养液中一定量 Cd^{2+} 存在时,会诱导合成植物金属螯合剂,当浓度更高时,破坏抵抗金属毒性的防御系统。

通过对玉米种子发芽过程中Cd与硫醇化合物相互作用研究可知:玉米重金属Cd中毒过程中,其解毒机理是植物金属螯合剂解毒机理,硫醇化合物含量间接反映玉米Cd中毒后金属螯合剂产生情况。本研究为重金属影响植物生长情况提供了相关生物信息,以此为深入揭示农作物重金属中毒机理,增强作物抵抗重金属中毒研究提供帮助。

参考文献:

- [1] 李 勇,黄占斌,王文萍,等. 重金属铅镉对玉米生长及土壤微生物的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(11): 2241–2245.
LI Yong, HUANG Zhan-bin, WANG Wen-ping, et al. Effect of heavy metals lead and cadmium on *Zea mays* L. growth and soil microorganism [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(11): 2241–2245.
- [2] Milone M T, Sgherri C, Clijsters H, et al. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2003, 50: 265–276.
- [3] Jonathan J H, Ross M W, Wendell A N, et al. Measurement of thiol-containing amino acids and phytochelatin(PC2) via capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. *Electrophoresis*, 2002, 23: 81–87.
- [4] Chassaigne H, Vacchina V, Kutchan T M, et al. Identification of phytochelatin-related peptides in maize seedlings exposed to cadmium and obtained enzymatically in vitro[J]. *Phytochemistry*, 2001, 56: 657–668.
- [5] David P, Jitka P, Vojtech A, et al. Simultaneous femtomole determination of Cys, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize(*Zea mays* L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1084: 134–144.
- [6] Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants[J]. *Biochimie*, 2006, 88: 1707–1719.
- [7] Teresa W-M F, Andrew N L, Richard M H. An electrophoretic profiling method for thiol-rich phytochelatin and metallothioneins [J]. *Phytochemical Analysis*, 2004, 15: 175–183.
- [8] Jonathan J H, Ross M W, Wendell A N, et al. Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars[J]. *Plant Physiol*, 1998, 116: 1413–1420.
- [9] Baldrian P. Interactions of heavy metals with white rot fungi[J]. *Enzyme Microb Tech*, 2003, 32: 78–91.