

光系统Ⅱ抑制型除草剂 Atrazine 诱导小麦幼苗叶绿体蛋白质组变化分析

王振英, 李学平, 李雪梅, 彭永康

(天津师范大学化学与生命科学学院, 天津市细胞遗传与分子调控重点实验室, 天津 300387)

摘要:为了研究除草剂作用机理,用光系统Ⅱ抑制型除草剂阿特拉津(Atrazine)处理小麦幼苗,用2-DE技术和生物质谱方法,分析了叶绿体蛋白质组的变化。结果发现,在 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度处理时,有7个叶绿体蛋白质斑点(斑点1,50 kDa/PI8.1;斑点2,41 kDa/PI8.4;斑点3,41 kDa/PI7.6;斑点4,23 kDa/PI7.1;斑点5,31 kDa/PI5.0;斑点6,35 kDa/PI8.9;斑点7,14 kDa/PI8.1)丢失。对7个发生变化的斑点利用MALDI-MS方法,于NCBI进行数据查询,其中,有6个叶绿体蛋白质归属得到鉴别,它们是Calvin循环中,固定 CO_2 的RuBPCase的激活酶(2个同工体和1个 β 型前体),在 H_2O 氧化裂解中起重要作用的23 kDa氧释放蛋白(psbp protein),在能量转贮中起重要作用的3-磷酸甘油酸激酶和催化 HCO_3^- - CO_2 水合作用可逆反应的碳酸酐酶。研究表明,叶绿体蛋白质组中丢失的6个蛋白质是Atrazine处理的相关蛋白。

关键词:叶绿体蛋白质组;阿特拉津;MALDI-TOF-MS;光系统Ⅱ;小麦

中图分类号:X503.231 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)06-1039-05

Changes in the Chloroplast Proteome in Response to PS II Inhibiting Herbicide Atrazine in Wheat Seedlings

WANG Zhen-ying, LI Xue-ping, LI Xue-mei, PENG Yong-kang

(Tianjin Key Lab of Cyto-genetical and Molecular Regulation, College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract:To investigate the mechanism with which the herbicide works, chloroplast proteome changes were analyzed in wheat seedlings which were treated with 0.01, 0.1, 1, 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Photosystem II inhibiting herbicide Atrazine respectively, by using 2-DE techniques. The results indicated that 7 chloroplast protein spots disappeared treated with high concentration Atrazine($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) in wheat seedlings. They were spot 1, 50 kDa/PI8.1; spot 2, 41 kDa/PI8.4; spot 3, 41 kDa/PI7.6; spot 4, 23 kDa/PI7.1; spot 5, 31 kDa/PI5.0; spot 6, 35 kDa/PI8.9; spot 7, 14 kDa/PI8.1. 6 protein spots (spot 1~spot 6) were identified by using MALDI-TOF-MS analysis and NCBI green plants database (Viridiplantae) searching. Spot 1~spot 3 were respectively identified as 2 activase subunits of RuBPCase and activase beta, form precursor. These 3 proteins were associated with CO_2 fixation in plant PS II. Spot 4 was identified as 23 kDa oxygen evolving protein of PS II, this protein was showed to regulate PS II activity by modulating the Ca^{2+} and Cl^- requirement of water-splitting reaction. Spot 5 was 3-phosphoglycerate kinase, a key enzyme in the transfer of high-energy. Spot 6 was identified as carbonic anhydrase, which is an important enzyme for catalyzing the reversion conversion of HCO_3^- - CO_2 , but, spot 7 could not be identified, because its theoretical mass and PI did not fit well the experimental one. The results indicated that these 6 chloroplast protein spots, which were disappeared in seedlings, were associated Atrazine-treated proteins. This technique may provide better ways to understanding of the responses of wheat to Atrazine at proteome level.

Keywords:chloroplast proteome; Atrazine; MALDI-TOF-MS; Photosystem II; wheat

我国是 Atrazine 的使用大国,至今每年仍以 20%

的需求量增加^[1]。Atrazine 可以在土壤中长期存在,并在作物体内累积,造成农业环境污染,作物受害,对食品安全造成潜在威胁,因此,引起人们的高度重视。如对 Atrazine 的环境监测^[2-3]、生物降解与除污^[4-5]、动植物的毒性影响^[6-9]等。对 Atrazine 作用机理的研究已有报道,Atrazine 是一种光系统Ⅱ(PSⅡ)抑制性除草剂,

收稿日期:2009-12-15

基金项目:天津市科委基金项目(2006ZD08,08JCZDJC16500)

作者简介:王振英(1965—),女,博士,教授,主要研究方向为细胞与分子生物学。E-mail:wzycell@yahoo.com.cn

通讯联系人:彭永康 E-mail:pykcell@yahoo.com.cn

它通过与一个位于叶绿体内的分子量为 32 kDa 的 D1 蛋白质相结合,阻止 PS II 中的电子传递,导致叶绿体分子的破坏,抑制光合作用的正常进行。D1 是一种类囊体膜蛋白,是 Atrazine 的靶蛋白,Atrazine 的除草作用主要是破坏了 D1 蛋白质的功能,这是一直被学术界接受的观点。但除 D1 以外,植物经 PS II 抑制型除草剂 Atrazine 处理后,叶绿体蛋白质组中的其他蛋白质是否也会受到影响?这方面的研究尚未见报道。近年来,蛋白质分析技术上的突破,特别是蛋白质组技术的出现,在研究植物的某一个特定组织或在某一特殊环境因子的胁迫下植物体内蛋白质组分变化时,可获得更大量、更全面的实验结果,目前已有很多研究者利用蛋白质组研究技术,对植物受到盐、低温、 H_2O_2 、疾病等胁迫时,体内蛋白质组的变化进行分析,获得很多有价值的结果^[10-13]。小麦是我国主要粮食作物,并且是 Atrazine 敏感作物,苗期除草常造成药害。本研究中,以小麦幼苗为材料,用不同浓度 PS II 抑制型除草剂 Atrazine 处理小麦,从叶绿体蛋白质组水平上,对 Atrazine 的作用机理进行分析,以期获得一些新的结果,为全面了解 Atrazine 作用机理,减少药害提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与培养

栽培小麦(*Triticum aestivum*)农大 189 种子经 3% $HgCl_2$ 表面消毒 5 min,再用自来水冲洗 2 次,在含有用蒸馏水湿润滤纸的培养皿中,室温下萌发 24 h,再在 28 °C/25 °C(昼/夜)培养 3 d,每日光照 12 h。将 3 d 龄的幼苗分别放入 0.01、0.1、1 和 10 $mg \cdot L^{-1}$ 阿特拉津溶液中,处理 5、10 d。

1.2 叶绿体分离和叶绿体蛋白质的制备

叶绿体的分离和叶绿体蛋白质的制备根据 Roscoe 等^[14]的方法。将小麦幼苗叶子置于预冷分离介质 A(0.33 $mol \cdot L^{-1}$ 山梨醇、4 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$ 、2 $mmol \cdot L^{-1}$ 抗坏血酸、10 $mmol \cdot L^{-1}$ 焦磷酸钠,pH 6.5)中匀浆,4 层纱布过滤,200×g 4 °C 下离心 7 min,上清液放入干净的离心管,1 000×g 4 °C 下离心 7 min,沉淀物重新悬浮于预冷分离介质 B(0.33 $mol \cdot L^{-1}$ 山梨醇、4 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$ 、50 $mmol \cdot L^{-1}$ HEPES、2 $mmol \cdot L^{-1}$ EDTA,pH 7.6)中,1 000×g 4 °C 下离心 7 min,此步骤需重复 3 次。将叶绿体重新悬浮于经稀释的分离介质 B(1:25)中,8 000×g 4 °C 立即离心 5 min,除去分离介质,将叶绿体悬浮于等渗介质 B 和 80%预冷的丙酮

中,-20 °C 温浴 1 h 后,35 000×g 离心 15 min,将沉淀物冻干,然后将干燥的沉淀物溶解在裂解缓冲液[含 9 $mmol \cdot L^{-1}$ 脲、4% CHAPS、10 $mmol \cdot L^{-1}$ DTT、0.5%两性电解质(pH 3.0~10.0)、1 $mmol \cdot L^{-1}$ PMSF、2 $mmol \cdot L^{-1}$ EDTA、20 $mmol \cdot L^{-1}$ Tris-HCl(pH 8.5)]中,40 000×g 离心 30 min。以 BSA 为标准蛋白质溶液,利用 Bradford 的方法^[15]测定蛋白质浓度。

1.3 2-DE 电泳和图谱分析

电泳第一向利用 IPG 胶条(pH 3.0~10.0,11 cm),在 BioRad 蛋白质分析系统进行 2-DE 分析,每根胶条的上样量为 60 μg 。分别在 250 V 下 1 h,500 V 下 1 h,1 000 V 下 2 h,2 000 V 下 2 h,4 000 V 下 2 h 进行等电聚焦。电泳的第二向为 12.5%的聚丙烯酰胺凝胶^[16]。2-DE 提供的结果均经 3 次重复。凝胶用考马斯亮蓝^[17]染色,凝胶通过 GS 800 色谱扫描取得图像,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异的蛋白质斑点,用超纯水冲洗 2 次,50 $mmol \cdot L^{-1}$ NH_4HCO_3 脱色 2 次,100%乙腈干燥,用 0.1%TFA 在 50%乙腈溶液 37 °C 下消化过夜,将制备物混匀,冻干。将冻干的制备物溶解在含有 0.1%TFA 和 50%乙腈的 5 $mg \cdot mL^{-1}$ CHCA 中,利用 ABI 4700 型(USA)正离子生物质谱仪进行 MALDI-TOF-MS 分析,质谱采用胰蛋白酶自动降解片段作为内部标准校正。通过 MASCOT 软件,在 NCBI 数据库进行查询。为了表明新鉴别的蛋白质的可靠性,查询条件为:每个被鉴定的蛋白质其序列覆盖率至少达 15%,最少肽数目为 5 个,肽质量数误差范围为 ± 0.1 Da,未水解的酶切位点数为 1,对照物种为水稻和拟南芥。

2 结果与分析

2.1 叶绿体蛋白质组变化

利用等电点为 3~10 IPG 胶条,分别对 0.01、0.1、1、10 $mg \cdot L^{-1}$ Atrazine 处理后小麦幼苗叶绿体蛋白质组变化进行分析。发现在 0.01、0.1 $mg \cdot L^{-1}$ 浓度下,叶绿体蛋白质组没有产生变化,而在 1 $mg \cdot L^{-1}$ 浓度下虽有变化,但不明显,只是个别叶绿体蛋白质斑点的含量有些减少,而变化最为明显的是在 10 $mg \cdot L^{-1}$ 浓度下处理的幼苗。用 2D SDS-PAGE 分析的结果表明,共有 350 余个叶绿体蛋白质斑点被检测到。MW 范围在

10~110 kDa 之间,PI 范围 4~10。有 7 个叶绿体蛋白质产生变化,主要表现为叶绿体蛋白质斑点的消失。图 1 是小麦幼苗叶绿体蛋白质组中有变化区域的凝胶图,处理的幼苗明显可以看到叶绿体蛋白质斑点的缺失,但没有发现新蛋白质斑点被诱导产生。

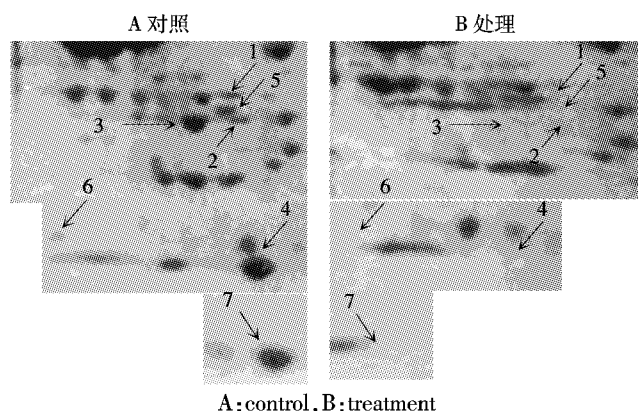


图 1 小麦幼苗经 10 mg·L⁻¹ PS II 抑制型除草剂处理后叶绿体蛋白质组的变化

Figure 1 Changes in chloroplast proteome in wheat seedlings treated with PS II inhibiting herbicide Atrazine(10 mg·L⁻¹)

2.2 与 Atrazine 处理相关叶绿体蛋白质的 MS 鉴别

在经 10 mg·L⁻¹ Atrazine 处理后叶绿体蛋白质组中,有 7 个斑点消失。为了对消失蛋白的生物学功能及可能与 Atrazine 处理间存在的关系进行分析,我们利用 MS 技术,对这 7 个消失的叶绿体蛋白质斑点的归属进行了鉴别,这 7 个被消失的蛋白分别是:斑点 1,核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶激活酶亚基 2;斑点 2,核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶激活酶亚基 1;斑点 3,核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶激活酶 β-亚基前体;斑点 4,23kDa 氧进化蛋白(psbp protein);斑点 5,三磷酸甘油酸激酶;斑点 6,碳酸酐酶;斑点 7 由于 MS 分析所

得出的匹配率偏低,未能鉴别其归属(表 1)。

从表 1 提供的数据看出,6 个被鉴别出的蛋白质斑点肽片段的匹配率高,蛋白质序列覆盖率高,得分达 100,表明该实验结果是可靠的。

3 讨论

在前期研究中,我们对三氮苯类除草剂 Atrazine 对水稻、白菜染色体结构和蛋白质变化作了分析比较。水稻中得出的结果表明,在 0.001 mg·L⁻¹ Atrazine 浓度下,可引起染色体凝聚和微核的形成,而引起蛋白质变化的浓度为 0.1 mg·L⁻¹[18]。Atrazine 对白菜染色体结构影响不明显,引起蛋白质变化的浓度为 10 mg·L⁻¹[19]。上述实验结果表明,不同作物对 Atrazine 的耐药性有很大差异。

小麦是一种对 Atrazine 敏感的作物,很多研究表明,在对 Atrazine 敏感的作物中,Atrazine 可以阻断光合作用 PS II 的正常进行,引起叶绿素损伤,叶子枯萎,作物生长受抑,最后导致死亡。在本研究中,我们分析了 Atrazine 处理小麦幼苗后,叶绿体蛋白质组中有 7 个蛋白质斑点消失,通过 MALDI-TOF-MS 分析和数据库搜寻,它们分别为核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶激酶的两个亚基(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform),核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶-加氧酶激酶 β 形式的前体(Rubisco activase beta form precursor),23 kDa 的氧进化蛋白(23 kDa oxygen evolving protein of PS II),3-磷酸甘油酸激酶(3-phosphoglycerate kinase)和叶绿体前体中的碳酸酐酶(Carbonic anhydrase,chloroplast precursor)。

在 Calvin 循环中,CO₂ 可以被酶催化转变为还原性的化合物。核酮糖-1,5-二磷酸(简称 RuBP)是 CO₂ 固定中的 CO₂ 受体。核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(简

表 1 10 mg·L⁻¹ 阿特拉津处理 10 d 后小麦幼苗叶绿体蛋白质差异蛋白质的质谱鉴定

Table 1 Identification of 2-D separated protein spots from wheat chloroplast following treatment with Atrazine(10 mg·L⁻¹) for 10 days

spot No.	protein name	accession No.	PI / MW(kDa)				No. matched	coverage/%	score
			experiment		theoretical				
			PI	MW	PI	MW			
1	ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform 2	gil167097	8.10	50.1	8.04	51.0	17	113	100
2	ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform 1	gil167096	8.40	41.0	8.62	47.1	17	119	100
3	Rubisco activase beta form precursor	gil32481063	7.60	41.0	7.57	47.1	15	108	100
4	23 kDa oxygen evolving protein of PS II	gil21837	7.10	23.0	8.84	27.3	16	168	100
5	3-phosphoglycerate kinase	gil21396675	5.0	31.4	5.0	31.4	12	108	100
6	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor	gil729003	8.93	35.0	8.93	35.0	9	51	0
7	unidentified								

称为 Rubisco) 可以催化 CO_2 与 RuBP 加成。Rubisco 存在于叶绿体的基质中,它是一个很丰富的酶,约占总叶绿体蛋白质的 50%。在高等植物中它是一个杂多聚体,分子量为 540 kDa,由 8 个相同的大亚基和 8 个小亚基组成。大亚基是酶的催化单位,它能结合底物(CO_2 和 RuBP)以及 Mg^{2+} ;小亚基是调节酶活性的单位,能使催化速度常数增加 100 倍以上。Rubisco 的大亚基是由叶绿体 DNA 的一个基因编码的,而小亚基是由核 DNA 的一个多基因家族编码的。Rubisco 以 3 种形式存在:一是无活性形式,称 E 型;二是氨甲酰化的无活性形式,称 EC 型;三是活性形式,氨甲酰化并在活性部位有 Mg^{2+} ,称 ECM 型。底物 RuBP 与 E 型 Rubisco 的结合比与 ECM 型的结合更牢固,因此 RuBP 是 Rubisco 活性的强抑制剂。从 Rubisco 的活性部位除去 RuBP 是由 Rubisco 激活酶介导的,Rubisco 激活酶是一个调节蛋白,它能与 E 型 Rubisco 结合,在消耗 ATP 的反应中促进 RuBP 的释放。然后,游离的 Rubisco 经氨甲酰化和 Mg^{2+} 的结合变成活性形式。小麦在经过阿特拉津处理后,有两个 Rubisco 激活酶的亚基和一个 Rubisco 的前体与对照相比消失了,这会造成 Rubisco 的活性受到抑制,从而使 CO_2 和 RuBP 的合成反应速率减慢或受到抑制,影响了小麦 Calvin 循环中有机化合物的合成。

在光合作用研究中,光合放氧一直是一个最基础、最焦点的课题,它是一个光合生物将低氧化性的水转变为高氧化性的氧气的过程,放氧是发生在 PS II 中的一个重要化学反应。在 PS II 中,一个完整的具有光合放氧功能的放氧颗粒包括 D1、D2、Cytb559、CP43、CP47、33 kDa、23 kDa、17 kDa 等 20 多种蛋白质。33 kDa、23 kDa、17 kDa 是突出于基粒片层膜外的 3 个水溶性外周蛋白,它们结合于类囊体囊腔侧,对维持锰簇的稳定及正常的放氧功能起很重要的作用。由于位置上突出的特殊性,它们成为光合结构中对理化处理特别敏感的部位,也容易受环境胁迫的影响。现在已经知道,阿特拉津的作用机理是取代质体醌与叶绿体类囊体膜上的 32 kDa 蛋白结合,从而阻断光系统Ⅱ的电子传递而使光合作用受阻。在本研究中,我们没有检测到 32 kDa 蛋白的变化,而是发现 23 kDa 的蛋白质消失了。17 kDa 和 23 kDa 蛋白的去除也会引起放氧功能的部分消失,这主要是因为它们的脱落会引起 Ca^{2+} 和 Cl^- 的游离,研究发现缺失 23 kDa 蛋白会使 Cl^- 对锰簇的亲合力减小而对光抑制非常敏感。由此可见,阿特拉津对小麦的处理对光合放氧也

产生了一些影响。这一结果与已有研究一致。

Calvin 循环中,在 Rubisco 羧化酶作用下 CO_2 和 RuBP 缩合生成不稳定的中间物,然后裂解成 2 分子 3-磷酸甘油酸,基质的 3-磷酸甘油酸激酶催化磷酸基从 ATP 转移到 3-磷酸甘油酸,生成 1,3-二磷酸甘油酸。在甘油醛-3-磷酸脱氢酶催化的反应中 NADPH 提供电子,生成甘油醛-3-磷酸。丙糖磷酸异构酶催化甘油醛-3-磷酸与二羟丙酮磷酸互变。丙糖磷酸在叶绿体中可以转化为淀粉或立即外运到细胞质转变为蔗糖以便运送到植物的生长区域,为生长提供能量。3-磷酸甘油酸激酶消失使磷酸基不能转移,从而也抑制了淀粉或蔗糖等碳水化合物合成。

碳酸酐酶是锌金属酶,它可以催化 CO_2 水合作用的可逆反应。在植物叶绿体中,碳酸酐酶对无机碳的固定起着非常重要的作用^[20]。阿特拉津对小麦的处理影响 CO_2 的固定。

由以上结果可以看出,小麦在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Atrazine 处理 10 d 后,叶绿体蛋白质组中涉及到光合作用的多个蛋白质组分消失,可以认为这些蛋白质的消失,影响了植物正常的光合作用,使植物生长受抑。

虽然以前的研究表明^[21-23],Atrazine 是 PS II 抑制型除草剂,它主要抑制叶绿体蛋白质组中的 D1 蛋白质,而阻断 PS II 的正常进行,D1 是唯一的 Atrazine 结合蛋白。我们的研究则表明,Atrazine 处理小麦幼苗后,有 7 个叶绿体蛋白质消失,表明这 7 个蛋白质是与 Atrazine 的处理相关的,虽然其确切的作用机理有待进一步研究,但本研究加强了对 Atrazine 作用机理的了解,为减少 Atrazine 对作物的伤害和农业上安全、合理使用除草剂提供了参考依据。

4 结论

用 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Atrazine 浓度处理小麦幼苗后,有 7 个叶绿体蛋白质斑点(斑点 1, 50 kDa/PI8.1; 斑点 2, 41 kDa/PI8.4; 斑点 3, 41 kDa/PI7.6; 斑点 4, 23 kDa/PI7.1; 斑点 5, 31 kDa/PI5.0; 斑点 6, 35 kDa/PI8.9; 斑点 7, 14 kDa/PI8.1)丢失。它们是 calvin 循环中,固定 CO_2 的 RuBpCase 的激活酶(2 个同工体和 1 个 β 型前体),在 H_2O 氧化裂解中起重要作用的 23 kDa 氧释放蛋白(psbp protein),在能量转贮中起重要作用的 3-磷酸甘油酸激酶和催化 $\text{HCO}_3^- - \text{CO}_2$ 水合作用可逆反应的碳酸酐酶。6 个叶绿体蛋白质是阿特拉津处理的相关蛋白,蛋白质组分析技术可用于 Atrazine 作用分子机理研究。

参考文献:

- [1] 李清波, 黄国宏, 王颜红, 等. 阿特拉津生态风险及其检测和修复技术研究进展[J]. 应用生态学报, 2002, 13(5): 625–628.
LI Qing-bo, HUANG Guo-hong, WANG Yan-hong, et al. Advances of studies on ecological risk of herbicide atrazine and its determination and remediation[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(5): 625–628.
- [2] Gfrerer M, Wenzl L, Quan X, et al. Occurrence of triazines in surface and drinking water of Liaoning Province in Eastern China[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2002, 53: 217–228.
- [3] Brossa L, Marce R M, Borrull F, et al. Determination of endocrine-disrupting compounds in water samples by on-line solid-phase extraction—programmed-temperature vaporization—gas chromatography—mass spectrometry[J]. *J Chromatography A*, 2003, 998: 41–50.
- [4] Raphi T M. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995: 1451–1457.
- [5] Fadullon F S, Karns J S, Torrents A. Degradation of atrazine in soil by *Streptomyces*[J]. *J Environ Sci Health*, 1998, B33: 3749.
- [6] Aladesanwa R D, Adenawoola A R, Olowofe O G. Effects of atrazine residue on the growth and development of celosia(*Celosia argentea*) under screen house conditions in Nigeria[J]. *Crop Prot*, 2001, 20: 321–324.
- [7] Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. Impacts of atrazine in aquatic eco—systems[J]. *Environ Int*, 2001, 26: 483–495.
- [8] 王英姿, 纪明山, 黄国宏, 等. 土壤中莠去津对几种农作物安全临界浓度的确定[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(1): 33–34.
WANG Ying-zi, JI Ming-shan, HUANG Guo-hong, et al. Determination of critical safety concentrations of atrazine in soil to some crops[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2002–02, 33(1): 33–34.
- [9] 叶常明, 雷志芳, 殷兴军, 等. 含莠去津和乙草胺河水灌溉对苗期水稻危害的研究[J]. 环境科学进展, 1997, 5(5): 51–55.
YE Chang-ming, LEI Zhi-fang, YIN Xing-jun, et al. Study on damage to seeding stage rice due to irrigation water containing herbicides atrazine and acetochlor[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 1997, 5(5): 51–55.
- [10] 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: 235–244.
- [11] Cui S X, Huang F, Wang J, et al. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings[J]. *Proteomics*, 2005, 5: 3162–3172.
- [12] Sweetlove L J, Heazlewood J L, Herald V, et al. The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria[J]. *Plant J*, 2002, 32: 891–904.
- [13] Wang Y, Yang L M, Xu H B, et al. Differential proteomic analysis of proteins in wheat spikes induced by *Fusarium graminearum*[J]. *Proteomics*, 2005, 5: 4496–4503.
- [14] Roscoe T J, Ellis R J. Two-dimensional gel electrophoresis of chloroplast proteins[M]//Methods in Chloroplast Molecular Biology. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1980: 1015–1078.
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [16] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680–685.
- [17] Volker N, Norbert A, Dieter L, et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G–250 and R–250[J]. *Electrophoresis*, 1988, 9: 255–262.
- [18] 彭永康, 邹灵芝, 王振英, 等. 三氮苯类除草剂对水稻染色体结构、蛋白质含量及组分的影响(英文)[J]. 作物学报, 2006, 32(4): 497–502.
PENG Yong-kang, ZOU Ling-zhi, WANG Zhen-ying, et al. The effect of triazine herbicide atrazine on the chromosome structure, protein content and compositions in *Oryza sativa* L.[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32(4): 497–502.
- [19] 李雪梅, 张维佳, 王艳, 等. PS II 抑制型除草剂 Atrazine 诱导白菜幼苗叶绿体蛋白组的变化[J]. 作物学报, 2008, 34(2): 238–242.
LI Xue-mei, ZHANG Wei-jia, WANG Yan, et al. Changes in chloroplast proteome of Chinese cabbage seedlings induced by PS II Inhibiting Herbicide Atrazine[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(2): 238–242.
- [20] Micheal H B, Sue G B. Sequence of a cDNA encoding carbonic anhydrase from barley[J]. *Plant physiol*, 1995, 108: 433–434.
- [21] Oettmeier W, Masson K, Soll H I, et al. Herbicide binding at photosystem II: A new azido-traninone photoaffinity label[J]. *Biophys, Acta*, 1984, 767: 590–595.
- [22] Oettmeier W. Herbicide and photosystem II [M]//Topics in photosynthesis, Barber J. (ed.), Elsevier. Amsterdam, 1992: 99, 349–408.
- [23] Oettmeier W. Herbicide resistance and super sensitivity in photosystem II [J]. *Cellular and Molecular life Science*, 1999, 5: 1255–1257.