

· 污染防治技术 ·

# 转基因技术在植物修复重金属污染土壤研究中的新进展

刘晓峰<sup>1</sup>, 王海鸥<sup>1</sup>, 弓爱君<sup>1</sup>, 钟广蓉<sup>1</sup>, 张淑贞<sup>2</sup>

(1. 北京科技大学应用科学学院生物系, 北京 100083; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

**摘要:** 综述了植物修复的相关机制及其进展和发展方向。随着一些功能基因的鉴定和分离, 利用转基因技术提高植物对重金属的积累能力已取得了一些进展, 开拓了植物修复的新领域。

**关键词:** 植物修复; 转基因技术; 重金属; 污染土壤

**中图分类号:** X53 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-2009(2006)06-0034-04

## New Advance of Transgenic Technology in Phytoremediation of Heavy Metals Contamination of Soils

LU Xiao-feng<sup>1</sup>, WANG Hai-ou<sup>1</sup>, GONG Ai-jun<sup>1</sup>, ZHONG Guang-rong<sup>1</sup>, ZHANG Shu-zheng<sup>2</sup>

(1. Applications Science Institute of Beijing Technology University, Beijing 100083, China;

2. Research Center for Eco-environmental Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

**Abstract:** The mechanism, advance and developing direction of Phytoremediation technology for soil contaminated with heavy metal were summarized. Development has been achieved in increase accumulation of heavy metals in plants with transgenic technology because of the isolation and identification of functional genes. A new field has been expolited in phytoremediation.

**Key words:** Phytoremediation; Transgenic technology; Heavy metal; Soils contamination

由于人类的生产活动和全球工业化进程的加剧, 重金属在土壤中产生的污染问题日趋严重, 受到社会的普遍关注。重金属污染具有隐蔽性、稳定性等特点, 如被 Cd 污染的土壤中其 Cd 的保持率在 85% ~ 95%<sup>[1]</sup>。

已有很多技术应用于治理污染土壤, 如石灰改良法、化学淋洗法等, 但都存在一些局限, 或费用昂贵或造成土壤营养元素的沉淀, 并可能造成二次污染<sup>[2,3]</sup>。近年来出现的植物修复技术, 由于其潜在或显在的经济效益, 日益受到青睐和重视, 成为国际学术界研究的热点。

植物修复是一种利用自然生长的植物 (主要是超积累植物) 或遗传工程培育植物修复被重金属污染环境的技术总称。一些植物在金属胁迫下的分子机理研究已在进展中, 这些植物耐金属基因的研究及鉴定和功能描述对于植物修复污染土壤的研究很有意义。由于目前所发现的超积累植物生长慢, 生物量少, 大规模修复污染土壤的潜力被

限制。因此分离克隆相关基因, 利用基因工程技术, 获得高效去除环境中污染物的转基因植物, 可能是培育优良重金属超积累性植物的有效途径。一些转基因植物茎叶部表现了较高的金属离子富集量, 并在污染土壤生态恢复中进行了初步应用<sup>[4]</sup>。

### 1 植物修复研究现状

目前对植物修复的研究主要集中在阐明植物对重金属超积累的分子机理及机制, 或超积累植物与其他方法相结合, 去除环境土壤中的重金属。

#### 1.1 酶系统

重金属胁迫可引起植物体中一系列酶的活性发生变化。重金属胁迫下, 植物体产生大量的活性氧自由基, 自由基能损伤主要的生物大分子 (如蛋

收稿日期: 2006-08-01; 修订日期: 2006-08-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20377049)

作者简介: 刘晓峰 (1977—), 女, 河北新乐人, 硕士研究生, 主要从事植物修复方面的研究。

白质和 DNA)引起膜质过氧化。而植物消除自由基的一个主要的途径,就是产生一系列的抗氧化酶,主要有超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)等。Dixit<sup>[5]</sup>研究表明豌豆在浓度为 40  $\mu\text{mol/L}$  的 Cd 中培养 7 天后,其 SOD、CAT、APX 的活性都有所增加。Koeduka<sup>[6]</sup>报道在 5 mmol/L 的硫酸铜处理下,大米的双加氧酶(DOX)活性显著增加。Lombardi<sup>[7]</sup>等报道了桃树的根在 100  $\mu\text{mol/L}$  铜胁迫下 CAT 活性比对照提高了 5 倍, SOD 活性比对照提高了 3~5 倍。

### 1.2 添加螯合剂

添加螯合剂如 EDTA 可提高重金属等污染物在土壤中的可移动性,有利于植物对重金属的吸收和运输。人工合成的螯合剂 EDTA 对污染土壤中 Pb 具有强的活化能力,施加到土壤后, Pb 的溶解度显著提高<sup>[8-10]</sup>,印度芥菜对 Pb 吸收效率明显增加。在含铅 600 mg/kg 的土壤中,加入 EDTA 后植物体内 Pb 的质量比可以达到 1.5%,而不加 EDTA 植物体内 Pb 的质量比则在 0.01% 以下<sup>[11]</sup>。Pickering<sup>[12]</sup>等发现在水培条件下添加 As 螯合剂二巯基丁二酸可使印度芥菜叶片 As 水平提高 5 倍多。

### 1.3 植物与微生物相结合修复污染物

将微生物与植物修复相结合,可提高修复效率。已发现某些菌根真菌能够促进植物对重金属的吸收。超积累植物与对重金属吸收能力强的菌根真菌等微生物联合可改进植物修复性能。具有泡囊丛枝菌根的 *Melilotus officinalis* 和 *Sorghum sudanense* 促进<sup>137</sup>Cs 的吸收和积累<sup>[13]</sup>。在两种湿地植物的根部接种细菌后,超积累硒和汞的能力分别比对照提高 60% 和 35%<sup>[14]</sup>。

## 2 转基因技术在植物修复中的应用进展

### 2.1 金属硫蛋白(MT)

金属硫蛋白(MT)是自然界普遍存在的一类由基因(是原核、真核生物以及病毒的 DNA 和 RNA 分子中具有遗传效应的核苷酸序列,是遗传的基本单位)编码(包含密码的、编排在密码中的或通过密码表达的,特别用于 DNA 和 RNA 的密码)富含半胱氨酸的低分子多肽,可通过半胱氨酸残基上的巯基与重金属结合形成无毒或低毒的络合物,从而降低重金属毒害。其氨基酸序列是由 Cys-X-Cys 聚集形成的结构域。最初发现于哺

乳动物,之后陆续在高等植物中被发现,称之为类-MT。过量表达(将一个基因中信息转化成含有该信息的产物,对细胞中的基因表达的激活)金属硫蛋白(MT)及转 MT 突变体中 aa 可以显著提高植物对 Cd、Cu 等重金属的耐受性<sup>[15]</sup>。转 MT 突变体中 aa 烟草可在含 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 的基质中正常生长,过量表达哺乳动物 MT 的烟草可以在 100  $\mu\text{mol/L}$ ~200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 浓度下正常生长;而对照野生烟草在 10  $\mu\text{mol/L}$  Cd 浓度下生长便受到严重抑制<sup>[15,16]</sup>。

MT 对重金属具有很强的结合力,现已分离出许多 MT 的相关基因。Zhang<sup>[17]</sup>等从一种湿地植物(*Typha Latifolia*)中得到一种 型类-MT 的基因 T<sub>3</sub>MT, T<sub>3</sub>MT 与其他单子叶植物的类-MT 基因的同源性达 50% 以上,与大米同源性达 75.6%。把 T<sub>3</sub>MT 转入拟南芥(*A. thaliana*)后,其对 Cu 和 Cd 的耐性提高。已有报道向植物中插入编码金属结合蛋白的基因,以提高植物耐重金属和吸收重金属的能力,但这些都是在水培或以琼脂为基质的条件下进行的,以污染的土壤进行的实验报道很少<sup>[18]</sup>。

### 2.2 植物螯合肽(PC)

PC 是一种由半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸组成的 Cd 络合多肽。其结构通式为 (-Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly( $n=2-12$ ),其中最常见形式是  $n=2-4$ 。PC 是由 (-Glu-Cys)二肽转移酶(PC 合酶)催化其底物 GSH 合成的,主要是由重金属如 Cd、Cu、Hg、Pb 和 Zn 等诱导合成。在高等植物中分离得到的 PC 大多数为镉离子络合物。PC 与 Cd 的络合物可以被分为低分子量(LMW)和高分子量(HMW)复合物两类。LMW 复合物是 Cd<sup>2+</sup>从细胞质向液泡中转运的主要形式, HMW 复合物是 Cd<sup>2+</sup>在液泡中积累的主要形式。Gsbert<sup>[19]</sup>等报道了向烟草中转小麦 PC 基因 Tapcs1 的研究。在重金属污染土壤生长的植物中选择了一种野生型烟草作为转基因受体,转基因烟草比野生型对重金属如 Cd、Pb 的耐受性大大增强,在高浓度 Pb 矿土壤中,转基因烟草比野生型积累了 2 倍多的 Pb。

Tsuji<sup>[20]</sup>等从原核生物 *Nostoc* SP. PCC7120 中得到一个 alr0795 基因,该基因编码 PC 合酶,序列分析表明 alr0795 编码的蛋白含有 243 个氨基酸残基,该序列与真核生物的 PC 合酶的 N-末端保守序列同源。Matsumoto<sup>[21]</sup>对来源于拟南芥(*A. thaliana*)的 PC 合酶基因的序列分析表明 C-末端

区域对该酶的活性起重要作用。并将 PC 合酶基因转入 *E. coli* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 中进行表达, *E. coli* 生长率和对 Cd 的耐受性都有所提高, *Saccharomyces cerevisiae* 对 Cd 的耐受性比对照也增加。从而表明来自于 *A. thaliana* 的 PC 合酶基因能催化 PC 合成, 并能增强其对 Cd 的耐受性。

### 2.3 其他相关基因

苔藓植物 *Lunularia crucrata* 在 Cd 存在下可分离到四组基因, 其中一组被 Cd 激活, 编码  $\gamma$ -胱硫酰合酶<sup>[22]</sup>。来源于大麦的基因 Hvhsp17 编码低分子量的热激蛋白 (heat shock protein), 该 Hvhsp17 不但在热胁迫下被诱导, 并且在 20 mmol/L Cd<sup>2+</sup> 存在下被转录, 曾有报道在低 Cd<sup>2+</sup> 浓度 (0.1 mmol/L 和 1 mmol/L) 下, 水培的转基因烟草植物中也可测到 Hvhsp17 的活性, 且活性高低依赖于 Cd<sup>2+</sup> 浓度和作用时间<sup>[23]</sup>。Zhang<sup>[24]</sup> 等从被重金属胁迫的蚕豆中分离出一种 PvSR2 基因, 在重金属胁迫下 PvSR2 被转录, 而非重金属胁迫下却未发现 PvSR2 转录。并且发现重金属毒性越强, PvSR2 越易被诱导, 把 PvSR2 基因转入 *E. coli* DH5a 发现 *E. coli* DH5a 转化株明显地表现出对 CdCl<sub>2</sub> 的抗性, 表明 PvSR2 编码的蛋白在重金属解毒方面具有重要作用。

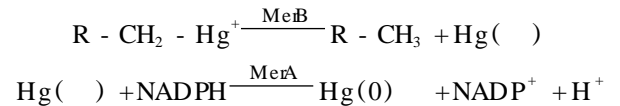
### 2.4 金属转运蛋白

近年来人们在植物、动物以及微生物中克隆到了许多编码微量元素转运蛋白的基因。这些金属转运蛋白可提高植物对重金属的抗性<sup>[25]</sup>。其中 ZIP 家族 (ZRT, ZRT-like protein)、CDF 家族 (Cation diffusion facilitator) 和 Nramp 家族 (Natural resistance associated macrophage protein) 是研究较多的基因家族。ZIP 基因家族编码的蛋白一般具有 8 个跨膜区。ZRT1、ZRT2 (Zn 吸收运输蛋白基因) 和 RT1 (Fe 吸收运输蛋白基因) 是最早克隆到的 ZIP 基因家族成员。研究表明, 由 ZIP 基因编码蛋白与酵母中 ZRT1、ZRT2 基因编码蛋白、拟南芥中的 ZRT1 基因编码蛋白有高度的同源性。CDF 家族成员在植物中分布较多。到目前为止, CDF 家族成员中的研究大多集中在拟南芥的 ZAT 基因上, 它与哺乳动物 Zn 转运蛋白基因的同源性达 35% ~ 40%。拟南芥过量表达 Zn 运载蛋白基因 ZAT1 在根部比对照植物累积了高浓度的 Zn, 在 Zn 浓度为 200  $\mu$ mol/L 的水培条件下, 对照植株的根生长被抑制了 85%, 而转基因植株的根只被抑制

了 15%。Nramp 基因家族是与金属离子吸收有关的蛋白。

### 2.5 细菌汞代谢基因 merA 和 merB

在重金属脱毒方面, 汞研究得最好。汞主要是以液态 Hg(0) 和二价 Hg(II) 进入环境。其中 Hg(0) 毒性较小, 且易挥发, 所以对环境威胁减轻。然而, 在溶液中, Hg(II) 却极易被厌氧菌转变为甲基汞 (MeHg), 而 MeHg 对人类和动物有剧毒<sup>[26]</sup>。merA 和 merB 是近年来在细菌体内发现的操纵汞代谢的两种基因, 分别编码汞离子还原酶和有机汞裂解酶, 它们编码的产物催化下列反应<sup>[27]</sup>:



研究表明, 转单基因 merA 或 merB 的植株虽然可提高其对汞的抗性, 但在含有有机汞的溶液中, 只有 merA + merB 双基因植株能挥发出基态汞。将 merA、merB 基因引入其他植物物种中也可产生汞挥发性植株, 转入 merA 和 merB 的鹅掌楸 (*Liriodendron tulipifera*) 和印度大麻 (*Cannabis Sativa L. var. indica Lamark*) 均表现出汞抗性的增强<sup>[28, 29]</sup>。

## 3 问题与展望

我国重金属污染土壤的面积在逐渐扩大, 程度不断加深, 急需成熟、高效的植物修复技术的应用。但大规模的转基因修复尚存在一些问题。安全性方面。转基因植物的环境安全性问题, 在转基因植物用于修复之前, 需要进行生物安全性评价, 以防产生基因污染; 不能让重金属进入食物链。技术方面。超积累植物生物量有限, 生长周期长, 难以满足快速高效的修复要求。

目前人们已经开始利用植物基因工程技术分离克隆了相关基因, 转入生长快且生物量大的植物中, 使植物能大量表达金属硫蛋白、植物螯合肽、液泡转运蛋白等金属结合蛋白, 以提高植物的超积累能力或在植物体内建立一条更广泛的重金属代谢途径, 使其能够同时对多种重金属有抗性并有积累作用, 从而培育出可以高效去除环境中重金属污染物的植物。

### [参考文献]

- [1] 王莉, 郭淑满. 某灌区土壤中重金属镉污染调查 [J]. 环境

- 监测管理与技术, 2006, 18(4): 19 - 21.
- [ 2 ] EBBS S D, LASAT M M, BRADY D J, et al Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated site[J]. Journal of Environment Quality, 1997, 26: 1424 - 1430.
- [ 3 ] SALT D E, SMITH R D, RASKIN I Phyto remediation[J]. Annual Review Plant Physiology & Plant Molecular Biology, 1998, 49: 643 - 668.
- [ 4 ] BENNETT L E, BURKHEAD J L, HALE K L, et al Analysis of transgenic Indian mustard plants for phyto remediation of metal-contaminated mine tailings [J]. Journal of Environment Quality, 2003, 32(2): 432 - 440.
- [ 5 ] DIXON V, PANDEY V, SHYAM R. Differential antioxidant responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum Sativum* L. cv Azad) [J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52: 1011 - 1109.
- [ 6 ] KOEDUKA T, MATSUI K, HASEGAWA M, et al Rice fatty acid-dioxygenase is induced by pathogen attack and heavy metal stress: activation through jasmonate signaling [J]. Journal of Plant Physiology, 2005, 162: 912 - 920.
- [ 7 ] LOMBARDI L, SEBASTIANI L. Copper toxicity in *Prunus Cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of vitro grown plants[J]. Plant Science, 2005, 168: 797 - 802.
- [ 8 ] BLAYLOCK M J, SALT D E, DUAHENKOV S, et al Enhanced accumulation of lead in Indian Mustard by soil-applied chelating agents [J]. Environmental Science & Technology, 1997, 31: 86 - 865.
- [ 9 ] HUANG J W, CHEN J, BERTI W R. Phyto remediation of lead-contaminated soil: role of synthetic chelates in lead phytoextraction[J]. Environmental Science & Technology, 1997, 31: 800 - 805.
- [ 10 ] HUANG J W. Phyto remediation of uranium-contaminated soils: role of organic acids in triggering uranium hyperaccumulation in plants[J]. Environmental Science & Technology, 1998, 32: 2004 - 2008.
- [ 11 ] VASSILA D, KAPLANIK Y, RASKIN I, et al The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard [J]. Plant Physiology, 1998, 117: 447 - 453.
- [ 12 ] PICKERING I J, PRINCE R C, GEORGE M J, et al Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard [J]. Plant Physiology, 2000, 122: 1171 - 1177.
- [ 13 ] YRASAD M N V, HAGEMEYER J. Biogeochemical process in the rhizosphere: role in phyto remediation of metal polluted sites[C]//Heavy Metal Stress in Plants from Molecules to Ecosystem. Berlin: Springer, 1999: 273 - 303.
- [ 14 ] SOUZA M P, HUANG C P A, CHEE N, et al Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury wetland plants[J]. Planta, 1999, 209: 250 - 263.
- [ 15 ] ZHANG X Y, ZHOU W, RUBEN G. Transgenic tobacco with mutant gene has high tolerance to heavy metal[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2000, 42(4): 416 - 420.
- [ 16 ] PAN A, YANG M, TIE F, et al Expression of mouse metallothionein - gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 24: 341 - 352.
- [ 17 ] ZHANG Y W, TAM N F Y, WONG Y S. Cloning and characterization of type 2 metallothionein-like gene from a wetland plant, *Typha latifolia* [J]. Plant Science, 2004, 167: 869 - 877.
- [ 18 ] KRAMER U, CHARDONNENS A N. The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55: 661 - 672.
- [ 19 ] GSBERT C, ROS R, HARO A D, et al A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phyto remediation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2003, 303(2): 440 - 445.
- [ 20 ] TSUJIN, NISHIKORIS, IWABEO, et al Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by *alc0975* from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 315: 751 - 755.
- [ 21 ] MATSUMOTO S, SHIRAKI K, TSUBUN, et al Functional analysis of phytochelatin synthase from *Arabidopsis thaliana* and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Science and Technology of Advanced Materials, 2004, 5: 377 - 381.
- [ 22 ] BASILE A, NUZZO R A D, CAPASSO D. Effect of cadmium on gene expression in the Liverwort *Lunularia Cruciata* [J]. Gene, 2005, 356: 153 - 159.
- [ 23 ] GULLIM, RAMPINO P, LUFOTTIO E, et al The effect of heat stress and cadmium ions on the expression of a small hsp gene in barley and maize [J]. Journal of Cereal Science, 2005, 42: 25 - 31.
- [ 24 ] ZHANG Y X, CHAI T Y, DONG J, et al Cloning and expression analysis of the heavy-metal responsive gene *PvSR2* from bean [J]. Plant Science, 2001, 161: 783 - 790.
- [ 25 ] GUERNOT M G. The ZIP family of metal transporters [J]. Biochimica Biophysica Acta, 2000, 1456(1 - 2): 190 - 198.
- [ 26 ] MEAGHER R B, RUGH C L, KANDASAMY K, et al Engineered phyto remediation of mercury pollution in soil and water using bacterial genes. In: Terry N, Banuelos Geds Phyto remediation of Contaminated Soil and Water [M]. Boca Raton: CRC Press, 2000: 201 - 219.
- [ 27 ] KRAMER U. Phyto remediation: novel approaches to cleaning up polluted soils [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2005, 16: 133 - 141.
- [ 28 ] LANGER P, MUSSIG J, FISCHER H, et al Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phyto remediation potential [J]. Industrial Crops and Products, 2002, 16: 33 - 42.
- [ 29 ] ELIZABETH P S, MARINUS P. Breeding mercury-breathing plants for environmental cleanup [J]. Trends Plant Science, 2000, 6: 235 - 236.

本栏目责任编辑 李文峻