

植物

活性氧代谢 及其利用

王文斌 编著

中国农业科学技术出版社

植物

活性氧代谢 及其利用

王文斌 编著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物活性氧代谢及其利用 / 王文斌编著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2011. 7

ISBN 978 - 7 - 5116 - 0499 - 6

I. ①植… II. ①王… III. ①植物 - 活性氧 - 代谢 - 研究
IV. ①Q945. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 114518 号

责任编辑 张孝安 赵 赟

责任校对 贾晓红

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82109708 (编辑室) (010) 82109704 (发行部)
(010) 82109703 (读者服务部)

传 真 (010) 82109700

网 址 [http://www. castp. cn](http://www.castp.cn)

经 销 者 各地新华书店

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 787 mm × 1 092 mm 1/16

印 张 10. 5

字 数 160 千字

版 次 2011 年 7 月第 1 版 2011 年 7 月第 1 次印刷

定 价 30. 00 元

— 版权所有 · 翻印必究 —

前 言

干旱、盐碱、低温等是限制作物生产的主要环境因子。据统计,全球干旱、半干旱地区约占土地总面积的 36%,占耕地面积的 43%,在我国则占到国土总面积的 52.5%,其中,干旱地区占 30.5%,半干旱地区占 22.0%。干旱对植物造成的损失在所有的非生物逆境中占首位,仅次于生物胁迫和病虫害造成的损失。土地盐碱化也是一个世界性问题,盐胁迫使作物的产量和品质降低。据联合国教科文组织不完全统计,全世界盐碱土地面积近 $9.5 \times 10^8 \text{ hm}^2$,我国有盐渍土 $2.7 \times 10^7 \text{ hm}^2$ 。这些环境因子的变化同时又是导致植被及生态系统破坏,并进一步造成土地沙漠化的重要原因。

近年来,关于活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)代谢与环境胁迫之间的关系逐渐成为植物抗性机理研究热点。随着分子生物学技术渗透至生物学各个方面,活性氧在分子水平上的代谢及其调控机制得到进一步的阐明。而且通过基因工程手段获得高效表达的转基因植物,已被大量实验证实是一条提高植物抗逆性的有效途径。

本书全面介绍植物体中活性氧的产生及清除机制,并重点阐述各种抗氧化酶类和非酶类物质、以及有关抗氧化基因工程的最新研究进展。最后,结合笔者对苜蓿抗逆性的研究成果,阐述了干旱、盐渍及低温条件下抗氧化酶的功能及其同功酶的响应模式,进一步揭示活性氧代谢与植物抗逆性的关系。

本书由山西省回国留学人员科研项目(2010042)及山西农业大学引进人才科研启动经费(XB2009002)资助出版。由于笔者水平有限,书中定会出现不少缺点与错误,敬请各位同行专家和广大读者批评指正。

笔者

2011 年 2 月

内 容 提 要

该书是基于笔者近年来在植物活性氧代谢方面取得的研究成果，参考国内外相关领域的最新进展编写而成。全书共分 9 章，第一章、第二章介绍了活性氧的产生、检测及其在植物体中的作用；第三章重点介绍了活性氧的非酶类清除物质；第四章、第五章、第六章和第七章分别阐述植物超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶、抗坏血酸过氧化物酶和谷胱甘肽过氧化物酶的结构、功能、基因调控、应用及其在植物抗逆性中的作用等；第八章重点阐述了与活性氧相关的植物基因工程；第九章以苜蓿为例介绍了植物中活性氧代谢的研究。

该书适合农业和生命科学领域的高等院校教师和学生、科研院所研究人员参考阅读。

目 录

第一章 植物活性氧	(1)
第一节 活性氧的概念	(1)
第二节 植物活性氧分类	(2)
第三节 植物活性氧的产生	(2)
第四节 植物体中活性氧的检测	(5)
参考文献	(9)
第二章 活性氧在植物体中的作用	(12)
第一节 活性氧对植物生长发育的危害	(12)
第二节 活性氧的促进作用	(16)
第三节 植物体中活性氧信号传导	(20)
参考文献	(22)
第三章 活性氧的清除	(26)
第一节 概述	(26)
第二节 抗氧化酶系统	(26)
第三节 抗氧化非酶系统	(27)
参考文献	(35)
第四章 植物超氧化物歧化酶	(38)
第一节 SOD 的起源与分类	(38)
第二节 SOD 在植物细胞中的分布	(38)
第三节 植物 SOD 的理化性质	(39)
第四节 SOD 的生物学功能	(40)
第五节 SOD 基因的表达及其调控	(41)
第六节 SOD 与植物抗性	(42)
第七节 SOD 活性测定	(45)

参考文献	(49)
第五章 植物过氧化氢酶	(52)
第一节 CAT 的来源及在植物细胞中的分布	(52)
第二节 CAT 的分类及其结构特征	(53)
第三节 CAT 的功能	(55)
第四节 CAT 与植物抗逆性	(57)
第五节 CAT 基因表达及其调控	(60)
第六节 CAT 应用现状	(62)
第七节 过氧化氢酶活性测定——紫外吸收法	(63)
参考文献	(65)
第六章 植物过氧化物酶	(69)
第一节 植物 POD 的类型划分和组织定位	(69)
第二节 POD 分子结构特点	(70)
第三节 POD 的功能	(73)
第四节 POD 与植物的抗逆性	(76)
第五节 POD 的活性测定——愈创木酚法	(76)
参考文献	(78)
第七章 植物抗坏血酸过氧化物酶及谷胱甘肽过氧化物酶	(81)
第一节 植物抗坏血酸过氧化物酶	(81)
第二节 植物谷胱甘肽过氧化物酶	(84)
参考文献	(89)
第八章 与活性氧代谢相关的基因工程	(94)
第一节 概述	(94)
第二节 抗氧化酶基因工程	(96)
第三节 非酶抗氧化物质基因工程	(100)
第四节 一种与活性氧清除相关的酶——核苷二磷酸 激酶	(101)
参考文献	(108)

第九章 苜蓿抗氧化酶防御系统对盐渍、干旱及 低温的响应机制	(114)
第一节 对盐渍、干旱及低温具有明显忍耐力 差异的苜蓿品种筛选	(114)
第二节 盐渍、干旱及低温条件下苜蓿抗氧 化酶系统的响应	(131)
参考文献	(154)

第一章 植物活性氧

第一节 活性氧的概念

自由基, 又称游离基, 是指分子结构中外层轨道含有未配对电子的原子、原子团或特殊状态的分子, 包括超氧自由基、羟自由基、过氧化羟基自由基 ($\cdot\text{OH}_2$)、烷氧自由基 ($\text{RO}\cdot$)、过氧化物自由基、二氧化氮和一氧化氮自由基、氧化脂质自由基 ($\text{LO}\cdot$) 以及过氧化脂质自由基 ($\text{LOO}\cdot$) 等。自由基中以氧自由基对机体的危害最大。

与氧自由基有关的一个概念是活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS)。活性氧是指含有氧且具有较高氧反应性的原子或原子团, 包括超氧自由基、羟自由基、过氧化氢、单线态氧 ($^1\text{O}_2$) 与脂质过氧化物。在上述活性氧中, 原子上含有不成对电子的自由基称为活性氧自由基 (Reactive Oxygen Free Radical)。由此可见, 自由基是可以不含氧的, 如氢自由基、有机自由基、脂质自由基, 而活性氧也可以不是自由基, 如单线态氧、过氧化氢。因此, 自由基、氧自由基、活性氧及活性氧自由基等既有区别又有联系。

植物细胞在正常代谢中, 可经由多种途径产生活性氧, 而几乎所有的需氧反应都可以产生活性氧。在植物的光合作用和呼吸作用, 氧化还原反应与许多酶反应系统中, 当分子氧在还原过程中产生未完全还原的中间产物时, 如叶绿体、线粒体、过氧化物体和质膜上的电子传送给分子氧时, 则产生活跃的、具有毒性的物质即为活性氧 (Dat J, *et al.*, 2000)。

第二节 植物活性氧分类

活性氧的毒性是由它们的结构、电子状态决定的,它是体内较活泼的氧代谢中间产物。活性氧主要包括单线态氧 ($^1\text{O}_2$)、超氧阴离子自由基 (O_2^-)、 $\text{HO}_2\cdot$ 、 H_2O_2 、 HO_2^- 、羟自由基 ($\cdot\text{OH}$)、 $\text{LO}\cdot$ (L 为烃基或脂质基等有机部分)、 $\text{LO}_2\cdot$ 、 ONOO^- 和 LOOH 等。 H_2O_2 是单线态氧 $^1\text{O}_2$ 的双电子还原产物,具有较强的氧化性,但在较强的氧化剂存在时,也具有一定的还原性。 H_2O_2 能够很容易地穿过生物膜而与细胞质中的成分发生反应 (Foyer C. H., 1996)。

尽管活性氧的反应活性差别较大,但都比单线态氧 $^1\text{O}_2$ 和 H_2O 稳定性差,这就给细胞造成了潜在的威胁。

第三节 植物活性氧的产生

活性氧的大量产生可以由生物或非生物因素诱发。非生物因素主要是强光、高温、除草剂、干旱、电离辐射等;生物因素是指植物病原真菌、细菌、病毒和线虫等。此外,来自病原真菌及由植物产生的葡聚糖、半乳糖醛、寡聚半乳糖醛酸、肽、水杨酸处理也均可诱导植物产生活性氧。

植物细胞由于光合作用,细胞内容物中氧气的浓度最高,容易产生活性氧。就活性氧产生部位而言,有叶绿体、线粒体、过氧化物体、细胞质和细胞膜等。其中,叶绿体、线粒体和过氧化物体是活性氧产生的主要场所。

一、线粒体是活性氧 (ROS) 产生的主要细胞器

线粒体的主要功能是为细胞提供能量,以及为其他大分子的生物合成提供碳骨架。植物组织中耗费的氧中,约有 1% 用于 ROS 的产生 (Puntarulo S., *et al.*, 1988)。在正常情况下,哺乳动物细胞内, O_2^- 和 H_2O_2 的浓度分别为 $10^{-12} \sim 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10^{-9} \sim 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

处于很低的水平。关于植物细胞内 ROS 浓度的报道很少, Puntarulo 等 (1988) 的研究表明, 在正常条件下, 大豆 (Glycinemax) 胚轴中 H_2O_2 的浓度为 $5\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而当用氨基三唑 (aminotriazole) 抑制过氧化氢酶 (catalase, CAT) 的活性时, H_2O_2 的浓度可达到 $50\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 比哺乳动物的水平高得多, 但这种现象是否普遍, 还有待进一步证实。

植物线粒体的电子传递链 (Electron Transport Chain, ETC), 包括 4 种复合物 (Complex, C), 即 NADH 脱氢酶 (NADH dehydrogenase, C I), 琥珀酸脱氢酶 (Succinate Dehydrogenase, C II), 辅酶 Q-细胞色素 bc_1 还原酶 (Ubiquinol-cytochrome bc_1 , C III), 细胞色素 C 氧化酶 (Cytochrome Oxidase, C IV), 它们具有与动物线粒体相似电子传递特性 (图 1-1)。但是, 植物的 ETC 还包括 5 种在哺乳动物线粒体中不存在的酶: 有 1 种交替氧化酶 (Alternative Oxidase, AOX) 和 4 种 NAD (P) H 脱氢酶。这 4 种脱氢酶具有与黄素蛋白 (Flavoproteins) 非常相似的特性, 因此也是 ROS 产生的潜在位点。

植物线粒体在电子传递过程中, 位于呼吸链底物端的一些物质 (如黄素蛋白、非血红素铁蛋白、醌, 尤其是半醌等) 发生氧化还原的能障是很低的, 常常直接启动 O_2 的单电子还原, 产生 O_2^- (Chen Q., *et al.*, 2003)。其中, 在电子传递给末端氧化酶之前漏出呼吸链与氧反应生成超氧自由基的过程是线粒体产生 ROS 的主要来源 (Miller I. M., 2001)。复合物 I 和复合物 III 参与了氢醌和泛醌之间的相互转化, 并且产生了反应中间物质——泛半醌, 它可以接受从这两个化合物中漏出的电子 (Beyer R. E., 1990; Wang P., *et al.*, 2006)。泛半醌是氧的主要电子供体, 因此, 线粒体泛醌库总的还原水平决定着线粒体 ROS 的产量 (Triantaphylides C., *et al.*, 2008)。由于 ROS 是电子传递链不可避免产生的副产品, 所以生物细胞会产生解除 ROS 毒害和清除 ROS 的机制。

二、叶绿体中活性氧 (ROS) 的产生

光合作用的电子传递是光合细胞活性氧产生的最主要场所。在光

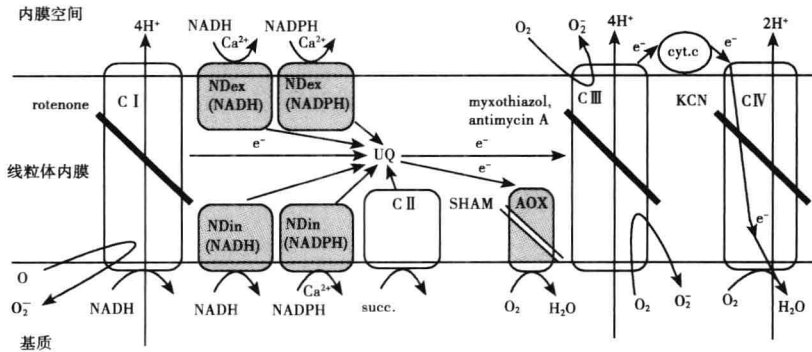


图 1-1 植物线粒体内膜上的电子传递链

C I 为复合物 I, NADH 脱氢酶; C II 为复合物 II, 琥珀酸脱氢酶; C III 为复合物 III, 辅酶 Q-细胞色素 b_c1 还原酶; C IV 为复合物 IV, 细胞色素 C 氧化酶; rotenone 为鱼藤酮, C I 的抑制剂; AOX 为交替氧化酶; SHAM 为水杨氧肟酸, AOX 的抑制剂; antimycin A 为抗生素 A, C III 的抑制剂; KCN 为氰化钾, C IV 的抑制剂; UQ 为泛醌; myxothiazol 为黏噻唑; NDex 为外部鱼藤酮不敏感的 NDAH 脱氢酶; NDin 为内部鱼藤酮不敏感的 NDAH 脱氢酶

合电子的传递过程中, 活性氧主要在 3 个部位产生: ①光系统 II (PS II) 的光吸收蛋白复合物; ②PS II 的还原侧反应中心; ③光系统 I (PS I) 的还原侧。

三、过氧化物体

过氧化物体是光呼吸过程的重要细胞器之一。在过氧化物体基质与过氧化物体膜上, 通过乙醇酸氧化酶、脂肪酸 β -氧化酶、黄素氧化酶等氧化产生 H_2O_2 及 O_2^- 等活性氧分子。

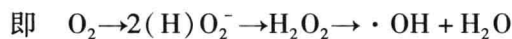
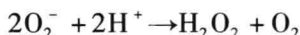
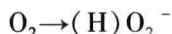
植物细胞内的活性氧可在不同区域产生, 一方面, 它是细胞代谢不可避免的产物; 另一方面在胁迫下, 活性氧的大量增加, 对细胞的正常生长产生潜在危害。

四、活性氧的相互转化

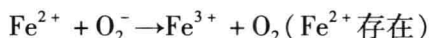
生物体在正常生长发育与代谢过程中, 活性氧可以由体内一系列的化学反应相伴而生; 在生物和非生物胁迫条件下, 导致代谢紊乱, 酶和电子传递链功能失调, 进而活性氧大量产生, 使细胞内活性氧的

水平升高 (Dat J., 2000; Maxwell D. P., *et al.*, 1999)。最初活性氧的产生与代谢研究,主要集中在叶绿体的光合过程中。叶绿体光合成系统中存在大量的自动氧化两类,能够通过米勒反应将氧还原成超氧化物,这些超氧化物或参与 PS 电子循环,或从类囊体腔扩散至基质膜表面,在那里超氧根阴离子可自发地或通过酶促反应歧化成 H_2O_2 和 O_2^- ; 在 Fe^{2+} 或 Cu^{2+} 的存在下通过 Fenton 或 Haber-Weiss 反应产生 OH^- 和 O_2 ; 另外,超氧化物和 H_2O_2 同样可在细胞的其他区域中产生 (Willekens H., *et al.*, 1997)。

超氧阴离子 (O_2^-) 是氧进行单电子还原的首要生成物,在自发或超氧化物歧化酶存在的情况下, O_2^- 进而歧化成 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$, 其间转化过程为:



H_2O_2 性质较 O_2^- 更为稳定,存活时间较长,并且具有穿透性,能够跨越质膜,在细胞内移动。如果 H_2O_2 不能得到及时清除,在金属离子还原物存在的情况下,将进一步转化成氧化性更强的一类活性氧分子——羟自由基 ($\cdot\text{OH}$),对有机物分子发生氧化作用。



Haber-Weiss 总反应为:



第四节 植物体中活性氧的检测

由于活性氧 (ROS) 具有很高的反应活性,它们可以与许多不同的化合物发生反应,根据反应生成物或者反应物的变化程度可以间接地对 ROS 进行定量或者定性分析。通常采用的方法有化学发光法、紫外-可见吸收分光光度法、荧光染色法、DAB 组织染色法、电子显

微技术检测法以及电子顺磁共振技术 (Electron Paramagnetic Resonance, EPR) 等。

一、化学发光法

化学发光法是活性氧检测中常用的实验技术,其原理是化学发光试剂与活性氧反应生成激发态的产物,产物中的电子经非辐射性跃迁回到基态而放出光子。常用的化学发光试剂有鲁米诺 (Luminol)、光泽精 (Lucigenin)、甲壳动物荧光素 (如海萤的荧光素) 等。鲁米诺作为一种有效的化学发光试剂目前仍受到广泛应用。碱性条件下,鲁米诺在催化剂 (酶、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 等过渡金属离子或金属络合物) 作用下与溶液中的 ROS 发生氧化还原反应而导致光子放出,据此可间接检测 ROS。Imke Ortmann 等 (2004) 曾利用鲁米诺化学发光体系考察了小麦悬浮细胞受激发子刺激过程中 H_2O_2 的产生情况。但是,鲁米诺既可以与 H_2O_2 反应,也可与 $^1\text{O}_2$ 、 O_2^- 及 $\cdot\text{OH}$ 发生化学发光反应从而导致了测定选择性差的问题,因此许多情况下依赖鲁米诺的化学发光法只能作为定量或者定性分析的辅助手段。

光泽精 (Lucigenin) 是一种使用较早的化学发光试剂,碱性条件下可与 H_2O_2 、 O_2^- 等过氧化物反应生成激发态的 N-甲基吖啶 (N-methylacridan)。相对鲁米诺而言,光泽精对于活性氧测定的选择性较高,有报道 (Goto H, 1998) 指出光泽精只有在 O_2^- 存在下产生发光现象,但 H_2O_2 也可分解产生 O_2^- , 因此难以定性地判断检测结果。

海萤荧光素 (Cypridina Luciferin Analog, CLA) 可与 O_2^- 和 $^1\text{O}_2$ 发生特异化学发光反应,因而用于生物机体内 O_2^- 及 $^1\text{O}_2$ 的检测。Tomonori Kawano 等 (2000) 在研究水杨酸 (SA) 诱导活性氧产生及胞质钙离子浓度升高过程中过氧化物酶 (POD) 的作用机制时,成功运用此法检测了烟草悬浮细胞中 O_2^- 的产生。随后,有研究者 (Suzuki N., *et al.*, 1991) 开发了一系列选择性较高的化学发光试剂,其中包括 CLA 的类似物 FCLA (Fluoresceinyl Cypridina Luciferin Analog)。FCLA 发光效率较 CLA 大有提高,因此,用其进行生物样品中 O_2^- 和 $^1\text{O}_2$ 的测定时增强了检测方法的灵敏度。

二、紫外-可见吸收分光光度法

紫外-可见吸收分光光度法中最常用的方法有细胞色素 C (Cytochrome C) 的 O_2^- 还原法和氮蓝四唑 (Nitro Blue Tetrazolium, NBT) 还原法。

具有氧化活性的细胞色素 C 被 O_2^- 还原而生成于波长 550nm 处有强吸收的亚铁细胞色素, 以此来检测 O_2^- 的产生。由于细胞色素 C 很容易被其他还原剂所还原, 因此, 一般情况下此法难以准确用于 O_2^- 的定性分析。

NBT 在 O_2^- 的作用下还原生成不溶于水的蓝色甲臍染料, 此法测定灵敏度高, 常用于 O_2^- 的组织化学定位。Fryer 等 (2002; 2003) 运用这种方法检测了光胁迫下拟南芥叶片中 O_2^- 的产生。由于甲臍不溶于水, 长时间放置会生成不均一的沉淀物, 因而难以用于测定细胞或者水溶液体系中 O_2^- 随时间推移而发生的变化。为了克服这个问题, 水溶性四唑盐的研究应运而生。Hiroyuki UKEDA 等 (2001) 发现水溶性四唑盐如 XTT, WST-1, WST-8 适合于 O_2^- 的检测, 其中 WST-1 灵敏度高、氧化态的吸光度低、水溶性好, 效果较 XTT 和 WST-8 更胜一筹。

三、荧光染色法

运用荧光染色技术可进行活体和离体亚细胞水平的 H_2O_2 检测。常用的荧光染料有 2', 7'-二氯氢化荧光素二乙酯 (Dichlorofluorescein diacetate, DCFHDA)、4-aminoantipyrine、7-羟-6-甲基香豆素 (Scopoletin)、Amplex Red (N-acetyl-3, 7-dihydrophenoxazine) 及高香草醛酸 (Homovanillic acid) 等。在辣根过氧化物酶的催化下, H_2O_2 可氧化这些物质生成极易检测的发荧光的物质, 此法简便有效、应用广泛。有研究者用荧光染色法检测了豌豆 (*Pisumsativum*) 叶片衰老过程中线粒体、过氧化物酶体中的 H_2O_2 (Jimenez A., et al., 1998) 及萝卜 (*Raphanussativus*) 种子在萌发过程中经光照、GA、ABA 调控下 H_2O_2 的释放 (Schopfer P., et al., 2001)。Orozco-Cardenas 等 (2002) 曾用 AmplexRed 定量检测了番茄 (*Lycopersicon esculentum*)

叶片提取液中的 H_2O_2 。

荧光染色法较其他方法的优点是可以直观、简便地进行 H_2O_2 的亚细胞定位，不足之处是这种方法检测的 H_2O_2 是半定量的。此外，各种荧光探针渗透能力不同，可能在细胞的不同部位积累，得出假阳性结果。再者，荧光染料极易淬灭，因此观测时必须快速，以免影响实验结果。

四、二氨基联苯胺（DAB）组织染色法

植物叶片渗透二氨基联苯胺（DAB）以定位 H_2O_2 是一种应用比较普遍的组织染色方法。其原理是 H_2O_2 在过氧化物酶的催化下可与 DAB 迅速反应生成棕色化合物，从而定位组织中的 H_2O_2 。具体操作在文献（Fryer M. J., *et al.*, 2002; Thordal - Christensen H., *et al.*, 1997）中都有较为详尽的描述。

五、电子显微技术检测法

电子显微技术检测法应用比较广泛，其原理是 H_2O_2 与氯化铯（ CeCl_3 ）反应生成电子致密物，然后在透射电镜下观察以定位、定量 H_2O_2 。Bestwick 等（1997）成功运用此法检测了莴苣（*Lactuca sativa*）受丁香假单胞杆菌菜豆致病变种（*Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*）感染诱发的过敏反应（hypersensitive reaction, HR）中 H_2O_2 的积累。Blokhina 等（2001）也曾用该法检测缺氧耐受型水生鸢尾（*Iris pseudacorus*）和水稻（*Oryza sativa*）及缺氧非耐受型小麦（*Triticum aestivum*）和德国鸢尾（*Iris germanica*）在缺氧和充氧过程中质膜和质外体空间 H_2O_2 的产生。

六、电子顺磁共振技术（EPR）法

电子顺磁共振技术（Electron Paramagnetic Resonance, EPR）是一种检测自由基的波谱学方法，由于 O_2^- 、 $\cdot\text{OH}$ 反应活性高、寿命短 EPR 信号不易直接检出，EPR 与自旋捕获技术（Spin Traps）相结合可弥补这一缺陷。首先自旋电子捕获剂与自由基发生反应生成 EPR 易检的相对稳定的自由基附加生成物，然后用 EPR 技术进行测定（Khan N., *et al.*, 2003）。常用的捕获剂有 5, 5-dimethyl-1-pyrro-

line N-oxide (DMPO), 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide 和 triarylmethyl radical Ox063 等, 其中 DMPO 最常用。由于 O_2^- 诱捕 DMPO 会产生一个特殊的光谱图, 因此, EPR 法是 O_2^- 检测方法中特异性较好的一种。

能体内检测和定位 ROS 是 EPR 的最大优点, 尤其是与自旋捕获技术相结合提高了检测方法的灵敏度及定性分析的可信度, 扩大了其应用范围。但自旋捕获技术也有其局限性, 即需要将自旋捕获分子渗透到植物细胞中, 而其对细胞的毒性及渗透能力并没有得到充分验证, 且这种药物的渗透本身就可能引起胞内 ROS 和其他信号分子水平的变化, 如果植物自身能合成 EPR 自旋捕获分子就可解决这个问题了 (Shulaev V. and Oliver D. J., 2006)。

七、其他新技术

通过检测脂质、蛋白质、核酸的氧化副产物可以间接反映活性氧 (ROS) 的积累, 针对这些领域的研究, 目前兴起了几种新技术, 如运用质谱技术 (Mass Spectrometry, MS) 检测脂质过氧化物 (Deighton N., *et al.*, 1997); 利用 ROS 示踪染色等方法监测蛋白质氧化进而对氧化胁迫进行细胞、亚细胞定位; 还有反映氧化胁迫引起的细胞转录水平变化的 DNA 芯片技术; 另外, 已有依赖于绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 的氧化还原变化适时成像技术应用于动物体系 (Dooley C. T., *et al.*, 2004), 这可以为植物中 ROS 的亚细胞定位提供一定的参考。

参考文献

1. Bestwick C. S., Brown I. R., *et al.* Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. The Plant Cell Online, 1997, 9 (2): 209 ~ 221.
2. Beyer R. E. The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidant. Free Radical Biology and Medicine, 1990, 8 (6): 545 ~ 565.
3. Blokhina O. B., Chirkova T. V., *et al.* Anoxic stress leads to hydrogen peroxide forma-