

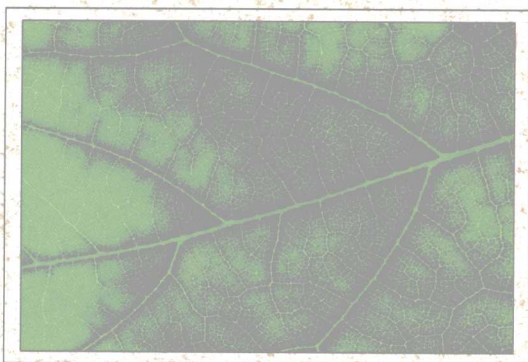


黑龙江大学博士文库

HEILONGJIANGDAXUEBOSHIWENKU

植物活性氧 解毒机理及其应用

鲁振强 · 著



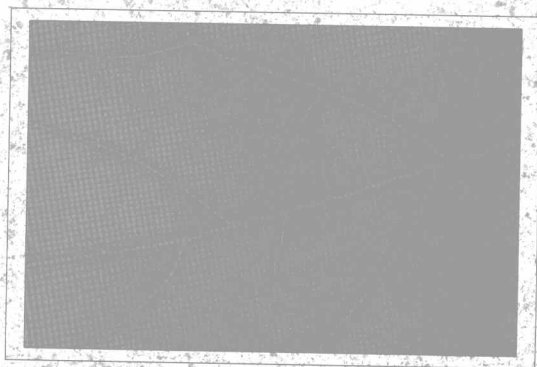
黑龙江大学出版社

HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

黑龙江大学博士文库

植物活性氧 解毒机理及其应用

鲁振强 · 著



黑龙江大学出版社

HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

植物活性氧解毒机理及其应用 / 鲁振强著. —哈尔滨:
黑龙江大学出版社, 2007. 8
(黑龙江大学博士文库)
ISBN 978 - 7 - 81129 - 020 - 2

I. 植… II. 鲁… III. 植物 - 生物活性 - 解毒 - 研究
IV. Q942.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 120855 号

责任编辑 李·丽 赵丽华
封面设计 金鼎艺术设计公司

植物活性氧解毒机理及其应用

ZHIWU HUOXINGYANG JIEDU JILI JIQI YINGYONG

鲁振强 著

出版发行 黑龙江大学出版社

地 址 哈尔滨市南岗区学府路 74 号 邮编 150080

电 话 0451 - 86604277

经 销 新华书店

印 刷 哈尔滨海天印刷设计有限公司

版 次 2007 年 8 月 第 1 版

印 次 2007 年 8 月 第 1 次印刷

开 本 880 × 1230 毫米 1/32

印 张 5.5

字 数 150 千

书 号 ISBN 978 - 7 - 81129 - 020 - 2

定 价 16.80 元

凡购买黑龙江大学出版社图书,如有质量问题请与本社发行部联系调换
版权所有 侵权必究

本书是作者根据自己多年的科研实践与教学经验，并以自己的博士学位论文为基础编写而成。主要阐述了活性氧代谢、植物活性氧解毒系统的概念、植物抗（耐）逆机理、研究方法、发展方向以及最新的研究进展。内容围绕着植物解毒机理进行了论述；同时，在核酸与蛋白质水平上，对抗氧化酶基因的表达特性及其酶的功能特性进行了初步研究，揭示了同工酶与盐胁迫的关系；应用基因重组技术，对同工酶基因在原核、真核生物中体外表达的特性与差异；通过对转基因植物进行分析，对植物抗性机理进行了解释与探索，为提高植物的抗逆机理研究提供理论依据。本书具有较高的基础理论水平和实用价值，可作为农林、师范等院校有关专业本科生、研究生和教师，以及相关领域的事业科研院所的科研人员从事科研与教学的参考用书。

鲁振强，男，黑龙江大学生命科学学院副教授，2005年于东北林业大学获得园林植物学专业理学博士学位。作者自1991年参加工作以来，一直活跃于农、林业的研究领域，主要从事农作物优良品种选育、植物细胞工程育种、分子育种、园艺植物的遗传育种等遗传育种研究；基因克隆、基因表达研究；蛋白质表达、纯化及功能研究；植物相关物质代谢及生理生化特性的研究；重要农作物、林草的遗传转化及选育有益突变体等领域的科学研究。曾先后主持、参与国家、部、省、市级科技项目十余项，在PlantCellRep., Biotechnol.lett.国际学术期刊及国内期刊上发表高水平论文、论著十余篇。

导 言

我国拥有大面积的盐碱地,而全世界也有 30% 以上的陆地被盐碱地覆盖,且有逐年增加的趋势。据联合国教科文组织(UNESCO)和粮农组织(FAO)的不完全统计,全世界盐碱地面积为 9.5438 亿公顷,而我国也有 9 913 万公顷。由于我国人口众多,而耕地面积又相对较少,因而土地的盐渍化在很大程度上影响了我国的农林业生产,并对生态环境产生了破坏作用。如何改善现有的盐碱地,以及如何有效地防止盐碱地的扩大,有效利用盐碱地资源已经成了亟待解决的问题。

近年来,细胞内活性氧类物质(Reactive Oxygen Species, ROS; Active Oxygen Species, AOS; Reactive Oxygen Intermediates, ROI)代谢与环境胁迫及植物抗逆性关系的研究,已成为植物抗性机理研究的热点。通过基因工程手段获得高效表达的转基因植物突变体,提高植物的耐盐性,选育出抗盐碱的植物新品种是可持续性利用盐碱土地资源的一条有效途径。作者将自己的博士论文加工整理成书,全面阐述了植物的活性氧解毒系统,植物的抗逆机理;对抗氧化解毒酶基因的表达特性及其酶的功能特性进行了初步研究,揭示了同工酶与盐胁迫的关系;应用基因重组技术,分别将同工酶基因转入原核、真核生物中,研究其体外表达的特性与差异;通过对转基因植物进行一系列的分析,对植物抗性机理进行了解释与探索,为提高植物的抗逆机理研究提供理论依据。进一步揭示活性氧代谢与植物抗盐性的关系,将有助于对抗盐机理的进一步了解。因此,全面系统地研究植物活性氧的解毒机理,可以进一步阐明植物抗盐机理,提高植物的抗盐性,培育出抗盐碱的植物新品种。

本书由黑龙江大学重点学科经费资助出版,感谢我的博士指导教师柳参奎教授的指导与教诲。由于编者的水平有限,本书难免出现错误与不当之处,敬请各位同行专家和广大读者批评指正。

作 者

2007 年 6 月

目 录

1 植物体内的活性氧及其解毒机理	1
1.1 氧化胁迫与活性氧代谢	3
1.2 活性氧的清除	9
1.3 植物抗氧化胁迫基因工程研究进展	12
参考文献	16
2 植物超氧化物歧化酶	20
2.1 SOD 的种类与分布	21
2.2 SOD 的化学结构	23
2.3 SOD 的理化性质及活性测定	27
2.4 SOD 基因表达调控	29
2.5 SOD 的应用与疾病治疗	30
2.6 SOD 的提取及应用	33
2.7 SOD 的改性及其替代物的研究	35
2.8 SOD 与植物抗逆性	36
参考文献	40
3 植物抗坏血酸过氧化物酶	45
3.1 APX 的酶学特性、分布与定位	47
3.2 APX 的作用机制	48
3.3 抗坏血酸过氧化物酶的研究进展	50
参考文献	58
4 植物过氧化氢酶	62
4.1 CAT 的基本特性	63

4.2 各种因素对 CAT 活性的影响	67
4.3 CAT 的应用现状	75
参考文献	77
5 胁迫条件下水稻的 APX 与 CAT 同工酶	
在活性氧解毒中的应用	80
5.1 盐胁迫下水稻 APX 和 CAT 同工酶基因的表达特性	81
5.2 水稻 APX 和 CAT 同工酶与盐胁迫的关系	106
参考文献	122
6 水稻的 APX 与 CAT 同工酶的体外表达	
在活性氧解毒中的应用	125
6.1 水稻 APX 与 CAT 同工酶基因的重组蛋白	
在 <i>E. coli</i> 中的表达纯化及特性	126
6.2 水稻 APX 与 CAT 同工酶基因在烟草中的表达	
及盐胁迫下的相关生理代谢	140
参考文献	168
附 录	171

1 植物体内的活性氧及其解毒机理

盐碱土壤(盐渍土)作为我国的一项重要的土地资源,其总面积约为9 913万公顷,并且呈逐年增加的趋势^[1]。土壤的高度盐碱化,造成草场退化、植物种类减少、农作物产量低下,草原生态系统的平衡遭到破坏。因此,如何开发利用盐碱土地资源,提高农作物经济产量,是人们多年来孜孜以求的研究目标。

由于环境胁迫造成粮食作物的产量降低、品质下降的损失是惊人的。粮食作物对盐碱土壤表现敏感,抗盐碱能力差,盐碱环境下不能正常生长发育或产量品质下降。近年来,随着现代生物技术的飞速发展,水稻基因组全序列测定已经完成,使对水稻耐盐机理深入细致的阐明成为可能。因此,通过基因工程手段获得高效表达的转基因植物突变体,提高植物的耐盐性,选育出抗盐碱的植物新品种是可持续性利用盐碱土地资源的一条有效途径。

近几十年来,围绕着植物的抗盐机理,国内外进行了多方面的研究,已取得了相当大的进展。由于植物的抗盐机理的复杂性,目前仍不能彻底阐明植物的抗盐机理。盐胁迫造成的盐害首先表现为低渗透势作用和离子毒害^[2]等。土壤中盐碱的增加会造成环境渗透势的降低,当其低于细胞内的渗透势时,细胞就会脱水,导致死亡。另一方面,由于吸收了环境中的大量盐分,植物的生理代谢发生紊乱,植物细胞的代谢调控和平衡受到影响。迄今为止,在离子代谢平衡、机能稳定性与渗透调节等方面研究已有很多报道^[3,4]。

近年来,细胞内活性氧类物质 [Reactive Oxygen Species, Active

Oxygen Species, Reactive Oxygen Intermediates (ROS/AOS/ROI)] 代谢与环境胁迫及植物抗逆性关系的研究,已成为植物抗性机理研究的另一热点^[5]。干旱、涝害、盐碱、高温、冷(冻)害、重金属和有毒气体等胁迫条件,严重影响植物正常生长发育。在胁迫下,植物细胞产生并积累大量的 ROS,如果 ROS 的产生与清除无法达到平衡,超出植物清除活性氧的能力时,将发生氧化胁迫,对细胞及植物个体造成氧化损伤^[6]。植物体内有效清除活性氧的系统为抗氧化酶和非酶抗氧化剂物质,分别在细胞内活性氧代谢的级联反应行使功能,是有氧生物正常代谢所不可缺少的。研究表明,植物抗逆性与氧化胁迫抗性间是密切相关的。在活性氧代谢平衡的破坏、恢复、维持与细胞氧化损伤的修复时,活性氧分子可以行使信使功能,经过信号转导调控应答基因转录、翻译水平的表达,使植物细胞与之相适应。植物抗氧化胁迫的能力与其抗逆性之间也是呈正相关的关系^[7]。以提高植物抗盐性为目标,胁迫下植物抗氧化能力的提高是其抗盐性的体现。进一步揭示活性氧代谢与植物抗盐性的关系,将有助于对抗盐机理的进一步了解。因此,全面、系统地研究植物活性氧的解毒机理,可以进一步阐明植物抗盐机理,提高植物的抗盐性,培育出抗盐碱的植物新品种。

为了提高植物对胁迫的耐性,导入外源目的基因已成有效途径。多种植物、微生物等有机体的编码生化代谢关键酶和胁迫信号传导的重要基因已克隆成功,采用重组 DNA 和转基因技术向目的植物导入这些外源目的基因,增加目的植物体内有效物质的表达,增强抗氧化酶活性与提高抗氧化代谢水平,从而获得抗逆转基因植物突变体^[8]。由于氧化胁迫所造成的伤害可由多种胁迫产生,因此,植物活性氧解毒系统功能获得强化的同时,植物可以平行地提高对多种胁迫的耐性(Cross-tolerance)^[9]。

1.1 氧化胁迫与活性氧代谢

干旱、盐碱、高温、冷(冻)害和涝害等胁迫条件是严重影响栽培植物生长发育的非生物胁迫因子。在胁迫下,如果植物细胞产生并积累大量的活性氧 ROS,当 ROS 的产生与清除无法达到平衡,并且 ROS 的积累超出一定的负荷时,植物将发生氧化胁迫(Oxidative Stress),ROS 攻击生物分子,不可避免地造成膜系统、蛋白质、脂类、DNA 及其他细胞组分的严重损伤^[10],植物个体的生长、发育将受到危害。

1.1.1 活性氧种类

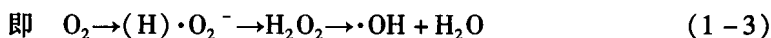
植物细胞在正常代谢中,可由多种途径产生活性氧,几乎所有的需氧反应都可以产生。在植物的光合作用和呼吸作用,氧化还原反应与许多酶反应系统中,当分子氧在还原过程中产生未完全还原的中间产物时,如叶绿体、线粒体、过氧化物体和质膜上的电子传递给分子氧时,则产生活跃的、具有毒性的物质称为活性氧^[5,11]。活性氧毒性是由它们的结构、电子状态决定的,它是体内较活泼的氧的代谢中间产物,活性氧主要包括单线态氧($^1\text{O}_2$)、超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)、 $\text{HO}_2\cdot$ 、 H_2O_2 、 HO_2^- 、羟自由基($\cdot\text{OH}$)、 $\text{LO}\cdot$ (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^[12]。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。

1.1.2 活性氧产生及相互转化

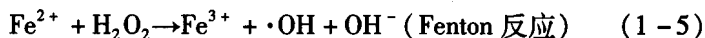
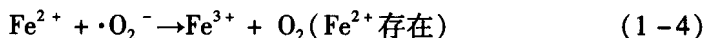
生物体在正常生长发育与代谢过程中,活性氧可以由体内一

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^[5,13]。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酶类,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 PSI 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^[14]。

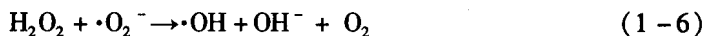
超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)是氧进行单电子还原的首要生成物,在自发或超氧化物歧化酶存在的情况下, $\cdot\text{O}_2^-$ 进而歧化成 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$,其间转化过程为:



H_2O_2 性质较 $\cdot\text{O}_2^-$ 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^[14]。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最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:



1.1.3 活性氧产生的场所

植物细胞由于光合作用,细胞中氧气的浓度最高,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、质膜等。其中,叶绿体、线粒体、过氧化物体是活性氧产生的

主要场所^[5,15]。

1.1.3.1 叶绿体

光合作用的电子传递链是光合细胞活性氧产生的最主要场所^[5]。在光合电子传递过程中,活性氧主要在三个部位产生(图1-1):(1)光系统II(PSII)的光吸收蛋白复合物;(2)PSII的还原侧反应中心;(3)光系统I(PSI)的还原侧是产生活性氧的主要部位。

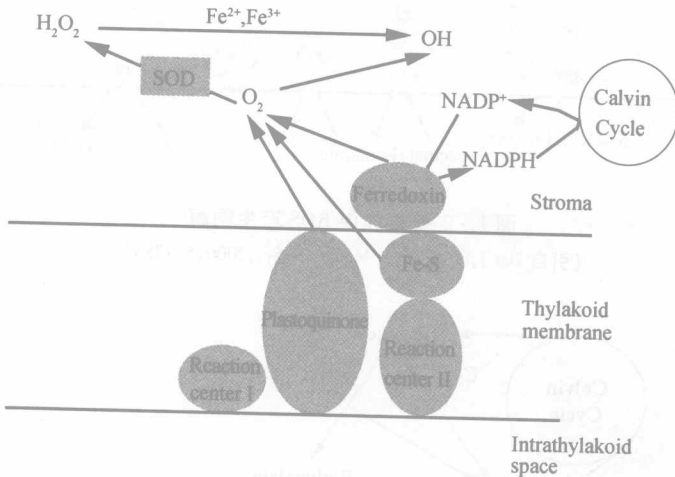


图1-1 叶绿体中 ROS 产生图解

(引自 Dat J, et al., Cell Mol. Life Sci, 2000, 57:781)

1.1.3.2 线粒体

在呼吸作用过程中,线粒体进行电子传递时,发生自我氧化产生超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)^[5]。线粒体复合物I的铁硫中心、复合物III、还原型泛醌及细胞色素C是产生活性氧的主要位点(图1-2)。

1.1.3.3 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过氧化氢及超氧化物阴离子等活性氧分子

(图 1-3), 并且由细胞器内的抗氧化酶清除^[5]。

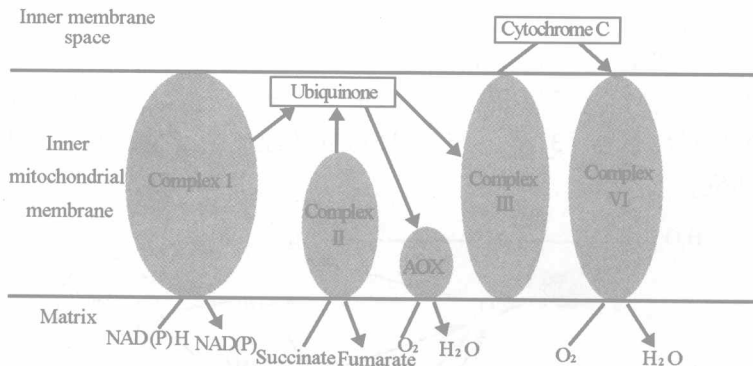


图 1-2 线粒体中 ROS 产生图解

(引自 Dat J, et al., Cell Mol. Life Sci, 2000, 57: 783)

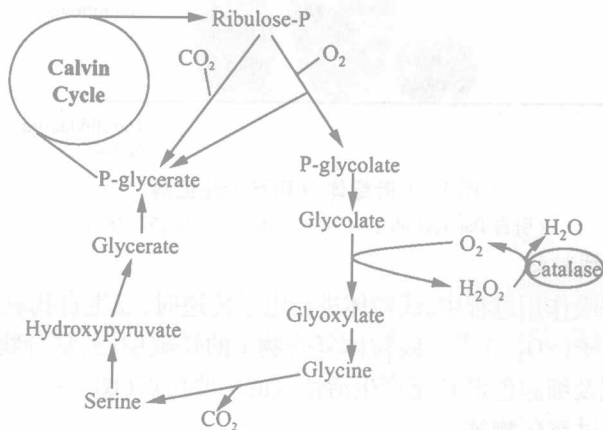


图 1-3 过氧化物体中 ROS 产生图解

(引自 Dat J, et al. , Cell Mol. Life Sci, 2000, 57:782)

总之,植物细胞内的活性氧可在不同的细胞区域内产生。一

方面,它是细胞代谢不可避免的产物;另一方面,胁迫下,活性氧的大量增加,对细胞的正常生长产生潜在的危害。

1.1.4 活性氧检测

活性氧化学性质活泼,寿命短,信号弱,一般很难捕获其信息。到目前为止,准确检测植物内源活性氧水平的技术难度很大。检测 $\cdot\text{O}_2^-$ 的方法主要有电子顺磁共振波谱分析法和酶学分析法。由于 $\cdot\text{O}_2^-$ 是SOD反应的底物,主要通过检测SOD来估计 $\cdot\text{O}_2^-$ 的含量。如化学发光、羟胺氧化法、NBT还原、细胞色素C、邻苯三酚法等^[16]。

羟自由基($\cdot\text{OH}$)的检测,主要是根据SOD和CAT对其产生的抑制作用以及 $\cdot\text{OH}$ 清除剂(如乙醇、甘露醇等)对其产生的清除作用等来估测 $\cdot\text{OH}$ 水平。此外,也可以利用电子顺磁共振测定 $\cdot\text{OH}$ ^[16]。

H_2O_2 是较稳定的活性氧分子。测定 H_2O_2 的方法较多^[16],有碘滴定法、分光光度法、化学发光法、荧光法等。由于过氧化氢酶和过氧化物酶可以清除 H_2O_2 ,故还可以通过测定这两类酶的活性来估测 H_2O_2 的水平。这些方法受到多种因素影响,如样品杂质、人为因素、灵敏度等。

细胞内脂类过氧化物丙二醛(MDA)产量的多少,可以表示所受过氧化程度的高低,因此以MDA作为膜脂过氧化的指标。检测方法有酶法、碘释放法、共轭双键检测法、烃类气体测定法等。其中酶法专一性强,操作简便、可准确定量。目前,使用较多的是丙二醛测定法^[17]。

1.1.5 活性氧危害

细胞在正常代谢条件下,活性氧的产生与清除处于动态的平衡。如果失去平衡,由于活性氧的高活性,势必给细胞造成破坏,使细胞受害甚至死亡。当环境胁迫长期作用于植物体,其产生的

活性氧浓度如果超出活性氧解毒系统的能力时,细胞就会受到氧化损伤。细胞质膜、细胞器膜等生物膜中多不饱和脂肪酸易被氧化,变硬变脆,致使膜功能改变,膜结构受破坏;同时,活性氧攻击蛋白质的氨基酸残基,尤其是 Tyr、Phe、Trp、Met 和 Cys,形成羰基衍生物^[17]。此外,活性氧可以促进分子内(间)的交联,如二硫键的形成和蛋白质的断裂,超氧化物可使一些含金属的酶类失活,或产生羟自由基,引发磷脂的过氧化。 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 可以抑制碳固定,在 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下,它可使卡尔文循环中的一些巯基酶类失活^[10,11]。

活性氧最主要的危害是由 H_2O_2 产生活性更强、更有毒性的 $\cdot\text{OH}$,造成膜脂类过氧化、碱基突变、DNA 链的断裂和蛋白质的损伤。 OH^- 可以修饰一些蛋白质使它们对蛋白水解酶的作用更敏感,一旦被破坏,蛋白质就会进一步被肽链内切酶降解,已发现在类囊体的膜上存在这样的酶。此外,一种具有多种催化功能的蛋白酶复合体已在哺乳动物和植物中被证实其具有选择性地降解活性氧所破坏的蛋白质^[18]。

1.1.6 活性氧的积极作用

高浓度活性氧对植物细胞有很强的毒害作用,但在低浓度下,活性氧在代谢过程中却有其积极作用^[5,6,11]:

(1) 几类活性氧是植物细胞的信号传导分子,在低浓度下,诱导启动与植物胁迫耐性相关的基因表达和生化反应;

(2) 活性氧参与细胞壁中富含羟脯氨酸的糖蛋白交联过程,这有利于抵御病原体侵入细胞;

(3) 活性氧作为第二信使,调控抗病相关基因的表达并启动植物抗毒素合成基因的转录;

(4) 当病原体浸染植物后,细胞内的活性氧水平迅速提高,而引起过敏细胞死亡。