

# 超氧化物歧化酶(SOD)研究进展<sup>\*</sup>

杜秀敏

(济南军区总医院实验诊断科 济南 250031)

殷文璇 张 慧 赵彦修

(山东师范大学逆境植物实验室 济南 250014)

**摘要** 环境胁迫使植物细胞中积累大量的活性氧,从而导致蛋白质、膜脂、DNA 及其它细胞组分的严重损伤。植物体内有效清除活性氧的酶类包括超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化氢酶(CAT)等,其中研究最深入的是 SOD。利用基因工程策略增加这些物质在植物体内的含量,从而获得抗逆转基因植株。

**关键词** 活性氧 氧化损伤 超氧化物歧化酶

环境胁迫可以引起植株整体水平碳和氮代谢的改变,从而降低光合和生长速率。然而在分子水平上,则由于活性氧的产生与活性氧清除系统之间的平衡被破坏,植物细胞中积累大量的活性氧,从而对许多重要的细胞组分造成氧化损伤。产生的活性氧包括:超氧根阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )、氢氧根离子( $OH^{\cdot}$ )、羟自由基( $\cdot OH$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )、单线态氧( $^1O_2$ )和过氧化物自由基( $ROO^{\cdot}$ )。它们可以导致膜脂过氧化、碱基突变、DNA 链的断裂和蛋白质的损伤<sup>[1]</sup>

植物体内有效清除活性氧酶类包括超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和过氧化氢酶(CAT)等。SOD 可以催化超氧化物生成  $H_2O_2$  和  $O_2$ ; APX 和过氧化氢酶可将  $H_2O_2$  还原成  $H_2O$ 。利用基因工程增加这些酶类在植物细胞内的含量,从而获得具有实用价值的抗逆农作物,是近几年国内外生物工作者研究的重点之一。目前,已从多种植物材料中分离克隆了 SOD cDNA 并用来转化不同的植物,均获得抗逆程度不一的转基因植株。

## 1 SOD 的分类比较

SOD 作为植物抗氧化系统的第一道防线,清除细胞中多余的超氧根阴离子。在高等植物中, SOD 根据其辅基部位结合的不同金属离子分为

三类: Mn-SOD、Fe-SOD、Cu/Zn-SOD。不同种类的 SOD 对于不同抑制剂的敏感程度不同,并以此作为最初分类的生化依据。对 SOD 基因家族的深入研究是在玉米中进行的。已得到的序列分析表明,广泛存在于真核生物中的 Cu/Zn-SOD 与 Fe-SOD 和 Mn-SOD 不同源。

现已从多种材料中分离纯化出了 Cu/Zn-SOD。该酶由两个亚基组成,每个亚基各含有一个 Cu、一个 Zn。在植物中, Cu/Zn-SOD 是三种超氧化物歧化酶中含量最丰富的一类,主要存在于叶绿体、胞质和过氧化物酶体中<sup>[1]</sup>。Mn-SOD 和 Fe-SOD 每个亚基都只含一个金属离子, Mn-SOD 主要位于线粒体中,从 Fe-SOD 的一些生化指标及前导序列推测,该酶存在于叶绿体中。Mn-SOD 与 Fe-SOD 具有序列相似性,并且含有完全相同的特征结构域,所以将存在于线粒体中的 Mn-SOD 导入烟草、苜蓿的叶绿体后,转基因植株对臭氧及干旱胁迫的抗性增强<sup>[2]</sup>, 但将叶绿体 Fe-SOD 过量表达的植株与叶绿体 Mn-SOD 过量表达的植株同时用百草枯(Paraquat)处理时,前者比后者具有更强的抗氧化性。为了解释这一实验结果, Van Camp 等(1996)提出了一个假说:一方面可能是由于这两种蛋白分子本身的特性所决定;另一方面可能是由于它们在叶绿体中具有不同的亚细胞定位所造成。此外,通过对大肠杆菌 K-12 的研究发现: Fe-SOD、Mn-SOD 具有不同的抗氧化功能, Mn-SOD 对 DNA 的保护更为有效,而 Fe-SOD 在菌体中则重点保护那些对氧化

修回日期: 2002-11-27

<sup>\*</sup> 国家重点基础研究专项经费资助(批准号: G 199911700)

作用敏感的可溶性蛋白。

## 2 胁迫下 SOD 的基因表达情况

对烟草、番茄、玉米的 *sod* 表达进行深入分析发现:在不同的发育阶段用不同的胁迫处理,该基因表达呈现出不同特征。例如:烟草胞质 Cu/Zn-SOD 在热激、低温及百草枯处理后增加最为明显;光照加百草枯处理可同时诱导番茄叶绿体 Cu/Zn-SOD 和胞质 Cu/Zn-SOD 基因的表达;但干旱只能诱导细胞质 Cu/Zn-SOD 基因的转录<sup>[3]</sup>。总之,在胁迫条件下,SOD 基因转录水平的大幅度提高与 SOD 酶活性的适度增加是相关的。胁迫因子很可能加速了 SOD 的代谢,迫使基因提高转录活性来维持正常水平的蛋白浓度。

不同种类的胁迫因子是通过何种信号诱导特异 *sod* 表达的呢?一种假说认为:由于不同胁迫因子使各个亚细胞遭受不同程度的氧化胁迫,而不同的亚细胞器又存在种类特异的 SOD 作为抗氧化保护剂,所以氧化胁迫的程度不同则导致了各种 *sod* 表达的差异<sup>[4]</sup>。虽然这个假说仍需进一步的实验证明,但不同细胞器中存在的专一脂类过氧化物酶无疑是一个极好的佐证。Alscher (1989) 发现,当用臭氧、SO<sub>2</sub> 热激、干旱等胁迫因子处理植物时,植物体内还原型谷胱甘肽的含量有所增加;Herouart (1993) 的研究表明烟草 *sodCc* 表达受氧化还原的控制,谷胱甘肽既可以作为抗氧化剂直接发挥作用,也可激活抗逆基因如 Cu/Zn-SOD 基因的转录<sup>[5]</sup>。另外,用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理烟草实生苗时发现:胞质中自由 Ca<sup>2+</sup> 浓度的增加与 SOD 酶活性降低呈现出一定的相关性,推测 Ca<sup>2+</sup> 参与了信号转导<sup>[6]</sup>。但尚不知道哪一种 *sod* 是受 Ca<sup>2+</sup> 的调控,参与清除 ROS 的其它酶类是否受上述处理的影响还有待进一步研究。

## 3 SOD 基因工程进展

几种 SOD cDNA 已从植物中得到克隆并用转化不同的植物,最终获得 SOD 活性增强的转基因植株。在转基因烟草、苜蓿、土豆和棉花中,叶绿体 SOD 的过量表达,提高了它们对氧化胁迫的耐受性;SOD 在苜蓿线粒体和土豆细胞质中的过量表达,也具有同样的效果<sup>[7]</sup>;转基因苜

蓿 ChlSOD 的过量表达,提高了植株对冻害的耐受性<sup>[8]</sup>;转基因烟草 ChlSOD 的过量表达,提高了植株对冷害的耐受性<sup>[9]</sup>。酵母线粒体 Mtr-SOD 在水稻叶绿体中的过量表达,提高了转基因植株对盐胁迫的耐受性,而且盐胁迫下转基因植株中 SOD 和 APX 的活性都较对照株提高 1.5 ~ 2.0 倍,CAT 活性降低的程度小于对照株<sup>[10]</sup>;拟南芥耐盐突变株幼苗对 MV 的抗性较对照株提高了 10 倍,SOD 和 APX 的活性分别比野生型提高 1.3 和 3 倍<sup>[11]</sup>。然而转基因烟草 Fe-SOD 的过量表达并未提高其对冷害和盐胁迫的耐受性<sup>[12]</sup>;用矮牵牛叶绿体 Cu/Zn-SOD cDNA 转化烟草得到的转基因植株 Cu/Zn-SOD 活性提高了 30 ~ 50 倍,但植株并未提高对百草枯或臭氧引起的氧化损伤的耐受性<sup>[13]</sup>;用同样的基因表达框架转化番茄,得到的转基因植株也未提高对低温和强光诱导的光抑制的耐受性。转基因植株中存在的这些区别说明:1) SOD 可能具有不同的抗氧化功能;2) 转基因植株中基因表达水平有所差异,SOD 的表达只在一定范围内是有效的,超出这一范围的过量表达往往是有害的;3) SOD 与其它活性氧清除酶类,如抗坏血酸过氧化物酶和谷胱甘肽还原酶之间的酶活性平衡可能是很关键的。

在光培养中,只有过量表达 ChlSOD 的植株具有显著的 MV 抗性,而在暗培养中,过量表达 ChlSOD 和 MitSOD 植株都有较高的 MV 抗性<sup>[14,15]</sup>。目前研究表明:(1) 强光下生长的植株较弱光下生长的植株具有较高的 MV 耐受性。(2) 只有在强光下,叶绿体 Mtr-SOD 的过量表达才能提高植株对 MV 的耐受性。这可能是因为 SOD 只是叶绿体抗氧化酶类中的一环,只有当活性氧的清除能力不受其它抗氧化酶类及底物制约时,SOD 的过量表达才能提高植株对氧化胁迫的耐受性。在光照条件下生长的转基因植株能够提高这些酶及底物的表达,从而增强了植株对 MV 的抗性。

另外,实验表明,在过量表达叶绿体 Mtr-SOD 的植株中,其内源 SOD 同工酶的活性都较非转基因植株低。Sen Gupta 等的实验也证明豌豆叶绿体 Cu/Zn-SOD 在烟草中的过量表达,导致了转基因植株内源叶绿体 Cu/Zn-SOD 活性的降低。这些结果说明内源 SOD 同工酶的表达是由超氧

化物离子或超氧化物发生反应产生可动的信号分子诱导的。外源 SOD 基因的过量表达可以降低超氧化物或信号分子的浓度,从而导致内源 SOD 基因表达的降低。

#### 4 展望

综上所述,由于植物中许多抗氧化剂参与活性氧的清除过程,而且在氧化胁迫下,许多细胞组分需要保护,所以单纯地转化某一个基因使之过量表达很难达到预期的效果。近几年来,随着对植物细胞内小分子渗透保护物质(如甘氨酸甜菜碱、脯氨酸)生化途径的研究及其相关基因的分离鉴定,不仅使我们有机会深入了解胁迫下的代谢保护机制,而且对活性氧在植物细胞内的产生、作用位点及其脱毒保护机制也更加清楚。今后通过改变植物体内的信号传导途径或提高抗氧化代谢水平,我们将有希望获得具有推广应用价值的抗逆农作物。

#### 参考文献

- [ 1 ] Asada K. Production and action of active oxygen in photosynthetic tissue. CRC Press ,Boca Raton. FL ,1994 ,pp. 77 ~ 104
- [ 2 ] Van Camp W, Willekens H, Bower C, et al. Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. -Bio/Technology, 1994, 12: 165 ~ 168
- [ 3 ] Perl-Treves R, Galun E. The tomato Cu/Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. Plant Mol Biol, 1991, 17: 745 ~ 760
- [ 4 ] Tsang E W T. Differential regulation of superoxide dismutase in plants exposed to environmental stress. Plant Cell, 1991, 3: 183 ~ 192
- [ 5 ] Herouart D. Redox-activated expression of the cytosolic copper/zinc superoxide dismutase gene in Nicotiana. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 3108 ~ 3122

- [ 6 ] Price A H. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. Plant Cell, 1994, 6: 1301 ~ 1310
- [ 7 ] Perl A, Perl-Treves R, Galili S, et al. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu/Zn superoxide dismutase. Theor Appl Genet, 1993, 85: 568 ~ 576
- [ 8 ] McKersie B D, Chen Y, Beus M, et al. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (Medicago sativa L.). Plant Physiol, 1993, 103: 1155 ~ 1163
- [ 9 ] Foyer D P, Kunert K J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. Plant Cell Environ, 1994, 17: 507 ~ 523
- [ 10 ] Tanaka Y, Hibino T, Hayashi Y, et al. Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mr-SOD in chloroplasts. Plant Science, 1999, 148: 131 ~ 138
- [ 11 ] Kazuo Tsugane, Kyoko Kobayashi, Yasuo Niwa, et al. A recessive arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. The Plant Cell, 1999, 11: 1195 ~ 1206
- [ 12 ] Van Camp W, Caplan K, Wan Montagu M, et al. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. Plant Physiol, 1996, 12: 1703 ~ 1714
- [ 13 ] Picher L H, Brennan, Hurley A, et al. Overproduction of petunia chloroplastic copper/zinc in transgenic tobacco, Plant Physiol, 1991, 97: 452 ~ 455
- [ 14 ] Sooten L, Capiau K, Vandenbranden S, et al. Improvement of the resistance of higher plants against oxidative stress. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen van de Universiteit Gent, 1992, 7: 1477 ~ 1485
- [ 15 ] Bowler C, Sooten L, Vandenbranden S, et al. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. EMBO J, 1991, 10: 1723 ~ 173

(下转第 74 页)

## Studies on the Expression Condition of Engineered Strain of the Novel $\alpha$ -Amylase from *Sulfolobus shibatae* in *E. coli*.

Liu Li Wu Jin Chen Wei Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology Chinese Academy of Science Beijing 100080)

**Abstract** Expression conditions of engineering bacteria *E. coli* DH5 /SBAM expressed novel  $\alpha$ -amylase from *Sulfolobus shibatae* B12 were optimized. Search for how expression conditions to affect engineering bacterial expressing level of protein. We modified various conditions which affect expression ,developed a success technique for the ESBAM to express target protein at higher level. The optimum culture conditions were the host strain DH5 ,medium LB<sup>+</sup> ,induction temperature 41 ,induction time 4 hours and the initial concentration OD<sub>600</sub> 0.6 - 0.8 of the engineering strain ESBAM respectively. Trehalose was detected by HPLC after amylose was acted by the two recombinant enzymes cooperatively ,which were the novel  $\alpha$ -amylase and the maltotriose synthase (MTSase) from *Sulfolobus shibatae*.

**Key words** Trehalose *E. coli* Novel  $\alpha$ -amylase Engineering strain Expression condition

(上接第 50 页)

## The Researching Progress of Superoxide Dismutase

Du Xiumin

(Department of Medical Laboratory , General Hospital of Jinan Military Area , Jinan 250031)

Yin Wenxuan Zhang Hui Zhao Yanxiu

(Laboratory of Stress Plant Shan Dong Normal University , Jinan 250014)

**Abstract** The imposition of environmental stress leads to increased production of reactive oxygen species (ROS) in plant cells ,which can damage proteins ,membrane lipids ,DNA and other cellular components. Plants have evolved enzymatic detoxication system that efficiently scavenges ROS. Enzymatic detoxication system includes superoxide dismutase (SOD) ,ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) . Superoxide dismutase is studied more intensively than others. The over-expression and accumulation strategies of these antioxidants in plants have been followed up to now ,and have gained many transgenic plants showing increased stress tolerance.

**Key words** ROS Oxidative damage Superoxide dismutase