

凤眼莲叶片超氧化物歧化酶的初步研究

李学宝¹ 何光源² 吴振斌³ 夏宜琤³

¹(华中师范大学生物系, 武汉 430070)

²(中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074)

³(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

本文研究凤眼莲叶片 SOD 活性与低温、pH 和衰老等环境和生理因素的关系。试验结果表明,凤眼莲叶片主要含 Cu-Zn-SOD, KCN 明显抑制 SOD 活性。环境 pH 小范围改变(自中性至弱酸弱碱)对 SOD 的影响不大,只有当 pH 有较大变化时,酶活性才明显下降, SOD 同工酶酶带数目减少。持续低温导致 SOD 活性减弱,减弱的程度与低温持续的时间呈正相关性。随着凤眼莲叶片的衰老, SOD 活性逐渐下降。老叶的 SOD 活性显著低于幼叶,其同工酶带的数目也少于后者。本文还报道了叶片呼吸强度和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性的变化。

关键词 凤眼莲,超氧化物歧化酶,衰老,低温胁迫

凤眼莲 (*Eichhornia crassipes Solm*) 具有极强的抗污能力,能够净化污染水体中的 N、P、K、酚、氰、有机物及重金属等污染物质,在污水净化和富营养化水体治理中具有重要的应用价值^[1-3]。凤眼莲生长发育和分蘖繁殖需要较高的环境温度,在我国广大的寒温带地区,自然状态下越冬繁殖较为困难。研究凤眼莲的衰老生理和抗性生理,具有重要的理论和实践意义。

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, 简称 SOD, EC1, 15, 1, 1) 作为活性氧清除剂,对防御机体的衰老和活性氧对机体的伤害有重要作用。SOD 与植物叶片衰老、种子老化、抗污染、抗旱、抗寒的关系已有不少报道^[4]。但这些研究主要集中在农作物上,而对环境净化植物的研究尚很少报道。作者研究了凤眼莲叶片不同生育期,不同 pH 值和低温条件下 SOD 活性及同工酶谱的变化规律。

1. 材料与方法

1.1 自然状态下生长的凤眼莲植株,用自来水冲洗干净后,进行溶液培养。将凤眼莲植株置 2℃低温下处理 4, 8, 12, 16, 24h, 对照为 28±1℃, 暗培养。剪取处理后的叶片或常温下生长的不同生育期的叶片,供测试用。称取凤眼莲叶片 2g 鲜重,加入 5×10⁻²mol/L pH7.8 磷酸钠缓冲液(不同 pH 值处理时,采用相应的 pH 值磷酸缓冲液作提取介质),

按鲜重加入 2.5ml/g。冷冻研磨成浆,用双层纱布过滤后,滤液于 10000r/min 条件下冷冻离心 20min。弃去沉淀,上清液即为 SOD 粗提液。

1.2 SOD 活性测定参照 Giannoplitis 等^[5]的方法,测定 SOD 对氯化硝基四氮唑蓝(Nitroblue tetrazolium,简称 NBT)光化还原的抑制作用。反应混合液的组成为: 1.3×10^{-2} mol/L 甲硫氨酸; 1.3×10^{-8} mol/L 核黄素, 7.5×10^{-5} mol/L NBT, 1×10^{-7} mol/L 乙二胺四乙酸, 5×10^{-2} mol/L pH7.8 磷酸缓冲液(测定 pH 对 SOD 的影响时,用相应的 pH 值磷酸缓冲液)。8ml 反应混合液加入适量的酶液后,在 4000 lx 荧光下光照 15min,测定 560nm 处的光密度值 (OD560),空白以缓冲液代替酶液。酶活性单位采用抑制 NBT 光化还原的百分数表示。

1.3 SOD 同工酶用聚丙烯酰胺凝胶电泳,参照罗广华等^[6]的方法进行活性染色,凝胶先在 2.45×10^{-3} mol/L NBT 溶液中浸泡 20min,再移入含有 2.8×10^{-2} mol/L 四甲基乙二胺, 2.8×10^{-4} mol/L 核黄素和 3.6×10^{-2} mol/L pH7.8 磷酸缓冲液的溶液中 15min,最后将凝胶浸在含有 1×10^{-4} mol/L 乙二胺四乙酸的 5×10^{-2} mol/L pH7.8 磷酸缓冲液中,光照 20—30min,在蓝色背景上出现透明的 SOD 活性谱带。

1.4 酶液的蛋白质含量按 Lowry^[7]的方法测定;叶片呼吸强度用氧电极法^[8]测定;按欧阳光察^[9]介绍的方法测定葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活性。

2. 结果

2.1 KCN 和 pH 值对凤眼莲叶片 SOD 的影响

NBT 在光照条件下能迅速还原成蓝甲腈,反应最初的 20min 内,光化还原率呈直线上升(图 1a)。凤眼莲叶片 SOD 对 NBT 光化还原有明显的抑制作用,抑制的百分率随酶液量的增加而上升(图 1b)。

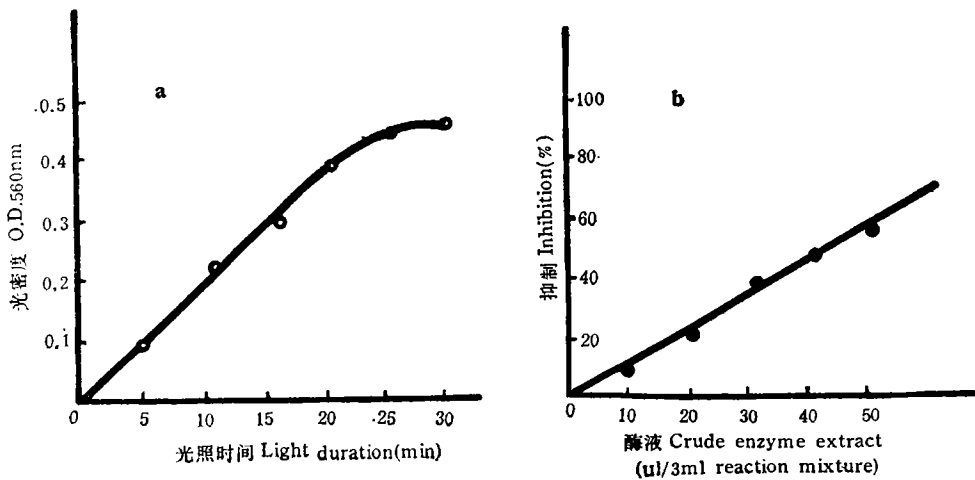


图 1 NBT 光化还原速率(a)和凤眼莲 SOD 对 NBT 光化还原的抑制 (b)

Fig. 1 Rate of NBT photochemical reduction (a) and inhibition of the reduction by SOD extract (b) from water hyacinth leaves

加入一定量的 KCN 时, SOD 抑制 NBT 光化还原的效应减弱,表明 SOD 活性

下降, SOD 活性下降的程度与 KCN 的浓度有关。KCN 浓度为 $0.3 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 时, 酶活性下降 90% 以上(表 1)。

表 1 KCN 对凤眼莲叶片 SOD 活性的影响

Tab.1 Effect of potassium cyanide on the SOD activity of *E. crassipes* leaves

KCN 浓度 Concentration of KCN ($\times 10 \text{mol/L}$)	0	0.05	0.10	0.20	0.30
SOD 活性 SOD activity (Unit/mg protein)	178.2	140.4	116.8	70.3	15.6
抑制 Inhibition(%)	0	21.2	34.5	59.4	91.4

用不同 pH 值的磷酸缓冲液作提取介质所得到的酶粗提液, 其 SOD 活性有差异。弱酸和弱碱条件下, SOD 活性变化不大。但过酸 (pH3) 或过碱 (pH12) 都显著降低 SOD 活性(图 2)。电泳分析 SOD 同工酶谱表明, 凤眼莲叶片 SOD 同工酶有 7 条谱带。在 pH5 条件下, 快带区酶带活性似乎有所增强。碱性条件对 SOD 同工酶活性影响较大, pH12 时, 酶带数目减少, 活性减弱(图 4)。

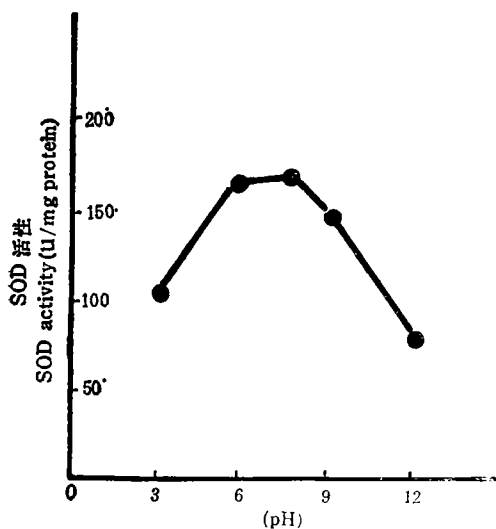


图 2 pH 对凤眼莲叶片 SOD 活性的影响
Fig.2 Effect of pH in extracting buffer on SOD activity in water hyacinth leaves

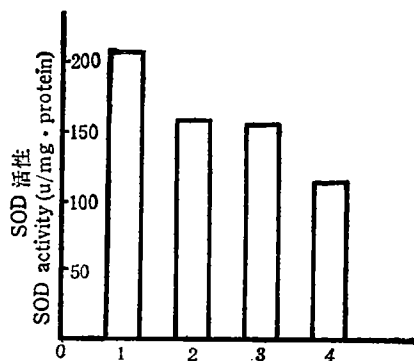


图 3 不同生长期的凤眼莲叶片 SOD 活性变化
Fig.3 Difference of the SOD activity of water hyacinth leaves at developmental stages
1. 3d 龄叶, 3-day aged; 2. 6d 龄叶, 6-day aged; 3. 9d 龄叶, 9-day aged; 4. 30d 以上叶, 30⁺-day aged

2.2 不同生长时期的凤眼莲叶片 SOD 活性变化

分别采取生长发育 3、6、9d 龄叶和老叶叶片, 测定 SOD 活性。由图 3 的结果可以看出, 凤眼莲 3d 龄幼叶(叶片刚展开) SOD 活性最强, 6、9d 龄叶片次之, 老叶的 SOD 活性最低。SOD 同工酶分析也显示出, 幼叶的同工酶带最丰富(肉眼可辨认出 7—9 条酶带)。不同生长期的叶片酶带宽窄和染色强弱不同, SOD 活性随叶片的衰老而递减(图 4)。

10 46	3	24	Duration of temperature
5.718.7	162.1196.0768f35.9D	16	SOD 活性 (unit/mg
103087	0.0950/0.0509080	min	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶
138.01	394.38.27.inten	呼吸强度 (ul/O ₂ /g	G-6-P dehydrogenase activity

较后者为小。这是否表明 SOD 对低温胁迫更为敏感,尚有待进一步研究。

3. 讨论

SOD 的种类有 Cu-Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD, 以 Cu-Zn-SOD 较普遍地存在于动植物体中, 不同种类的 SOD 对环境 pH 改变的敏感性不同。研究表明, Mn-SOD 对 pH 改变的稳定性最差, 环境 pH 变化对其有严重影响, 而 Cu-Zn-SOD 只有在 pH 变化较大时, 其活性才有所下降^[10,11]。而且, Cu-Zn-SOD 对 KCN 敏感而 Mn-SOD 不敏感, 可用 KCK 对 SOD 的抑制程度来判断 Cu-Zn-SOD 的活性高低。在本试验中, 环境 pH 的改变对凤眼莲叶片 SOD 活性影响较小而 KCN 显著抑制其活性, 这表明凤眼莲叶片主要含 Cu-Zn-SOD。我国地域广大, 水资源丰富, 水环境也十分复杂, 水体 pH 变化具有多样性。研究不同 pH 条件下凤眼莲 SOD 活性变化, 对于利用和提高凤眼莲的净化效率, 具有一定的实践意义。

在低温条件下, 植物体内 SOD 等酶活性下降, 活性氧含量增加, 番茄叶片在 0℃ 和黑暗中贮藏 3d 后, SOD 活性极端下降^[12]。在 5℃ 下, 水稻叶片的 SOD 活性下降 10—30%^[13]。低温导致黄瓜子叶 SOD 活性下降 11.6—21.7%^[14]。我们的实验也证明, 低温对凤眼莲 SOD 等活性有较大的影响, SOD 活性降低的程度与低温持续的时间有关。由于 SOD 等活性氧清除剂的活性或含量下降, 影响植物体内活性氧代谢系统的平衡, 促进活性氧在细胞内大量积累, 启动和加速细胞膜脂过氧化作用, 从而使植物体受到伤害, 代谢活动逐渐减弱^[15-17], 这与本研究结果是一致的。凤眼莲叶片生长发育过程中, SOD 活性下降, 细胞内活性氧不能及时清除, 可能导致细胞膜脂过氧化, 破坏细胞膜的结构, 促进叶片的衰老死亡。可以认为, SOD 活性不断下降的过程标志着凤眼莲叶片逐渐衰老的过程和抗寒能力逐渐减弱。无疑, SOD 活性可以作为凤眼莲叶片衰老的一项生理指标。

参 考 文 献

- [1] 吴振斌等。凤眼莲净化燕山石油化工废水的研究, I. 动态模拟试验, 水生生物学报, 1987, **11**(2):139—150。
- [2] 吴振斌等。凤眼莲净化燕山石油化工废水的研究, II. 静态净化试验, 水生生物学报, 1987, **11**(4):299—309。
- [3] 周泽江、杨景辉。水葫芦在污水生态处理系统中的作用及其利用途径, 生态学杂志, 1984, (5):36—40。
- [4] 王建华、刘鸿先、徐同。超氧化物歧化酶 (SOD) 在植物逆境和衰老生理中的作用。植物生理学通讯, 1989, (1):1—7。
- [5] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase II. purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *Plant Physiol.*, 1977, **59**:315—318。
- [6] 罗广华、王爱国。植物 SOD 的凝胶电泳及活性显示。植物生理学通讯, 1983, (6):44—45。
- [7] Lowry O H, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**:265—275。
- [8] 李德耀、叶济宇。薄膜氧电极的制作与呼吸或光合控制的测定。植物生理学通讯, 1980, (1): 35—40。
- [9] 欧阳光察。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性测定。见: 植物生理学实验手册。上海: 上海科学技术出版社, 1985: 183—184。
- [10] Fridovich I. Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.*, 1975, **44**:147—155。
- [11] 罗广华等, 大豆和花生种子超氧化物歧化酶的同工酶研究。植物生理学报, 1984, **10**:175—179。
- [12] Michalski W P, Kaniuga Z. Photosynthetic apparatus of chilling-sensitive plants X. relationship between superoxide dismutase activity and photoperoxidation of chloroplast lipids. *Biochem. Biophys. Acta*, 1981, **637**:159—167。
- [13] 王以柔等。在光照和黑暗条件下低温对水稻幼苗光合器官膜脂过氧化作用的影响, 植物生理学报, 1986, **12**: 244—251。

- [14] 刘鸿先等。低温对不同耐寒力的黄瓜幼苗子叶中各细胞器的超氧化物歧化酶的影响。植物生理学报, 1985, 11: 48—61。
- [15] Lee E H, Bennett J H. Superoxide dismutase. *Plant Physiol.*, 1982, 69:1444—1449.
- [16] Pauls K P, Thompson L E. Evidence for the accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. *Plant Physiol.*, 1984, 75:1152—1157.
- [17] Tanaka K, Sugahara K. Role of superoxide dismutase in defense against SO₂ toxicity and an increase in superoxide dismutase activity with SO₂ fumigation. *Plant and Cell Physiol.*, 1980, 21:601—611.

PRELIMINARY STUDY ON THE SUPEROXIDE DISMUTASE IN THE LEAVES OF *EICHHORNIA CRASSIPES*

Li Xuebao¹, He Guangyuan², Wu Zhenbin³ and Xia Yicheng³

¹ (Dept. of Biol., Central China Normal Univ., Wuhan 430070)

² (Wuhan Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, 430074)

³ (Institute of Hydrobiol., The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract

The characteristics of *E. crassipes* leaf SOD in relation to low temperature, pH and physiological age were investigated. SOD activity was nearly unaffected when environmental pH changed within a narrow range, but declined markedly when pH changed remarkably. After the leaves of *E. crassipes* were exposed to a low temperature of 2°C for 4, 8, 12, 16 and 24 hours, the SOD activity decreased obviously. But the number of SOD isoenzyme bands remained unchanged though the activities of the bands changed. As the senescence of the leaves continues, SOD activity decreases gradually. Both the SOD activity and the number of SOD isoenzyme bands are much higher in the young leaves than those in the senesced leaves.

Key words *Eichhornia crassipes*, Superoxide dismutase, Senescence, Stress of low temperature