

渗透胁迫与百草枯对普通水绵 SOD 的影响

陆长梅 吴国荣 陶明煊 周长芳 魏锦城

(南京师范大学生物系, 南京 210097)

摘要 普通水绵 [*Spirogyra communis* (Hassall) Kützing] 的超氧化物歧化酶(SOD)含有 2 条锰型和 1 条铁型同工酶主带。低浓度的 Zarrouk 培养液对 SOD 影响不明显, 浓度提高到 3 倍以上时造成渗透胁迫, 在一定时间内, SOD 比活升高, 但培养时间继续延长则下降。在百草枯 1 mmol/L 和 2 mmol/L 培养 6 d 和 4 d 时, 普通水绵 SOD 比活最高, 此后则下降; 2 mmol/L 组的 MDA 含量在试验期内一直缓缓上升。5 倍的 Zarrouk 培养液和 2 mmol/L 百草枯进行培养后, Fe-SOD 带消失, Mn-SOD 主活性带有增强的趋势。

关键词 普通水绵; SOD; 同工酶; MDA

Effects of osmotic stress and paraquat on SOD in *Spirogyra communis* (Hassall) Kützing Lu Changmei, Wu Guorong, Tao Mingxuan, Zhou Changfang, Wei Jincheng (Nanjing Normal University, Nanjing 210097), *J. Plant Resour. & Environ.* 1999, 8(2): 13~17

The effects of osmotic stress and paraquat on SOD in *Spirogyra communis* (Hassall) Kützing are reported. Different concentration of Zarrouk culture medium and culture time or paraquat treatments have different effects on SOD specific activity in *Spirogyra communis*; no obvious effect was appeared by low concentration and short time, but as concentration increased to 3 times, osmotic stress will be occurred. SOD specific activities first increased and decreased afterwards; MDA content always increased as time prolonged. SOD isozymograms show the presence of Fe-SOD and Mn-SOD bands in *Spirogyra communis*, but osmotic and chemical stress have different effects on different type of SOD isozymes. If *Spirogyra communis* is cultured in 5 times concentration of Zarrouk culture medium or 2 mmol/L paraquat, Fe-SOD band will disappear and Mn-SOD bands will enhanced.

Key words *Spirogyra communis* (Hassall) Kützing; SOD; isozyme; MDA

自由基生物学是当前生物科学和医学科学的热点。生物处于物理、化学等逆境条件下, 其代谢过程中产生大量的活性氧与 DNA、蛋白质及膜脂类反应, 造成膜结构和细胞器的伤害, 加速机体衰老或致病, 甚至诱发基因突变、致畸和致癌。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase; 简称 SOD, EC.1.15.1.1.)通过歧化反应使超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)转变为 H_2O_2 , 是有机体的一种主要保护酶, 与植物的抗逆性和对逆境诱导产生的活性氧清除有关。在低等植物中, 抗光氧化的蓝藻有较高的 SOD 水平^[1]。在百草枯的影响下, 索氏小球藻(*Chlorella sorokiniana*)中出现 1

* 江苏省自然科学基金资助项目(BJ98077)

陆长梅: 1969 年 12 月生, 硕士, 讲师, 从事植物生理学教学与科研工作。

收稿日期: 1998-12-28

条新的 Mn-SOD 同工酶带^[2]。本实验以普通水绵 [*Spirogyra communis* (Hassall) Kützing] 为材料,利用不同浓度的 Zarrouk 培养液及百草枯进行处理,探讨渗透胁迫和化学物质胁迫对 SOD 活性及同工酶谱的影响,以期诱导出含高 SOD 活性的普通水绵。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

普通水绵 [*Spirogyra communis* (Hassall) Kützing] 采自南京师范大学生物系温室水池。置 30℃、30 W/m²光照培养箱中(12 h 光照/12 h 黑暗)培养 1 周后,用 1~5 倍浓度的 Zarrouk 培养液^[3]进行渗透胁迫,用 1 倍浓度的 Zarrouk 培养液配制 0~10 mmol/L 系列浓度梯度的百草枯处理液进行化学胁迫实验。各处理组均设 3 个重复。试验时间:1997~1998 年。

1.2 测定方法

SOD 粗酶液的制备及活性测定参照文献[4]和文献[5]的方法。可溶性蛋白含量测定参照文献[6]的考马斯亮蓝 G-250 法。浓度梯度胶电泳在 10%~35% 浓度梯度上进行^[7],酶活性染色参照文献[8]的方法。丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法^[9]。SOD 活性谱带的密度扫描应用 Shimadzu 紫外-可见薄层扫描仪对凝胶薄板进行 SOD 活性密度扫描,扫描波长为 560 nm,参比波长为 800 nm。

2 结果与分析

2.1 普通水绵 SOD 活性、类型及同工酶谱

普通水绵 SOD 含量(以鲜重计)为 277.76 U/g, SOD 比活为 28.95 U/mg 蛋白,与一般高等植物无明显区别^[4,5]。梯度胶电泳染色显示,普通水绵 SOD 同工酶有多条活性带,其中 3 条为主活性带(图 1)。采用抑制剂 KCN、H₂O₂ 处理表明普通水绵 SOD 同工酶谱带中,仅 1 条 Fe-SOD(图 1b),其余为 Mn-SOD,未发现 Cu·Zn-SOD。这与大多数真核藻类只有 Mn-SOD 和 Fe-SOD 的特点一致^[10]。

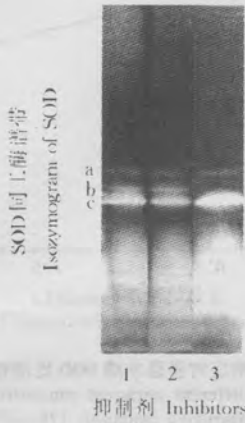
2.2 渗透胁迫对普通水绵 SOD 的影响

普通水绵在 1~5 倍浓度的 Zarrouk 培养液中培养 1 周生长基本正常,培养 3 周后 3 倍以上浓度处理的普通水绵开始黄化并陆续死亡。

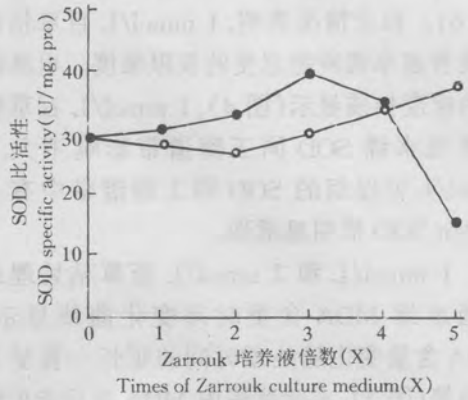
在不同渗透浓度下普通水绵含水量变化较大,故以酶的比活进行比较,图 2 为不同渗透浓度下普通水绵 SOD 比活的时间变化曲线。处理 1 周时,1~3 倍浓度 Zarrouk 培养液中的普通水绵 SOD 比活无明显变化,而生活于 4 倍和 5 倍浓度中的比活较对照分别增加 14.90% 和 28.18%。处理 3 周的普通水绵,1~3 倍浓度的 SOD 比活随培养液浓度的加大而增加,3 倍浓度组的 SOD 比活较对照高 34.53%。渗透胁迫继续加大时,SOD 比活下降,5 倍浓度组较对照下降了 48%。这表明普通水绵对介质渗透胁迫的适应有一段过程,在适应过程中,SOD 活性相应发生变化。

5 倍 Zarrouk 培养液浓度处理的普通水绵 SOD 同工酶谱带的密度扫描见图 3,处理 1 周,普通水绵 SOD 同工酶带无明显变化;而 3 周后,谱带数明显减少,Fe-SOD 活性带消失,仅剩两

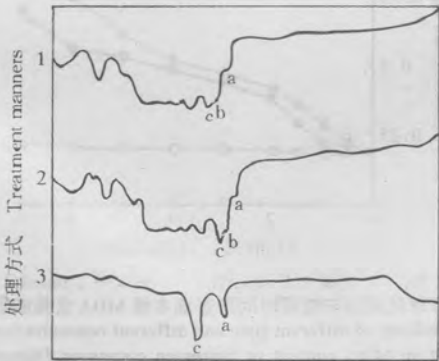
条 Mn-SOD 主活性带, 显示出 Mn-SOD 对渗透胁迫的忍受力及其生理功能。



1. CK; 2. +KCN; 3. +H₂O₂
图1 抑制剂对普通水绵 SOD 同工酶谱的影响
Fig 1 The effects of inhibitors on SOD isozyme pattern in *Spirogyra communis* (Hassall) Kützing



○—1 周 1 week; ●—3 周 3 weeks
图2 不同 Zarrouk 培养液浓度对普通水绵 SOD 比活的影响
Fig 2 Effects of different culture medium concentration on SOD specific activity in *Spirogyra communis* (Hassall) Kützing



1. CK; 2. 5 倍 Zarrouk 培养液, 1 周 5 times of Zarrouk culture medium for 1 week; 3. 5 倍 Zarrouk 培养液, 3 周 5 times of Zarrouk culture medium for 3 weeks
图3 渗透胁迫对普通水绵 SOD 同工酶谱的影响
Fig 3 Effects of osmotic stress on SOD isozyme pattern in *Spirogyra communis* (Hassall) Kützing



1. CK; 2. 1 mmol/L 百草枯 1 mmol/L paraquat; 3. 2 mmol/L 百草枯 2 mmol/L paraquat
图4 百草枯对普通水绵 SOD 同工酶谱的影响
Fig 4 Effects of paraquat on SOD isozyme pattern in *Spirogyra communis* (Hassall) Kützing

2.3 百草枯浓度对普通水绵 SOD 的影响

0~2 mmol/L 百草枯处理 1 周的普通水绵生长基本正常, 浓度高于 2 mmol/L 时, 藻体陆续黄化, 浓度高达 10 mmol/L 时, 藻体短时间内死亡。

普通水绵在百草枯低浓度(0~0.5 mmol/L)培养 1 周 SOD 比活变化不明显, 如图 5 所示, 浓度提高到 1 mmol/L 和 2 mmol/L 时 SOD 比活明显升高, 分别为对照的 224.31% 和 185.83%。但从 SOD 比活变化的时间曲线看, 1 mmol/L 和 2 mmol/L 处理组的峰值分别在

6 d 和 4 d 出现,此后 SOD 比活明显下降。处理后前 5 d, 2 mmol/L 处理组的 SOD 的比活高于 1 mmol/L 处理组, 5 d 后与此相反(图 6)。以上情况表明, 1 mmol/L 百草枯可能是普通水绵所能忍受的极限浓度。电泳图谱的密度扫描显示(图 4), 1 mmol/L 百草枯对普通水绵 SOD 同工酶谱带影响不大, 2 mmol/L 处理组的 SOD 同工酶谱带中有一条 Mn-SOD 带明显增强。

1 mmol/L 和 2 mmol/L 百草枯处理组普通水绵 MDA 含量时间变化曲线显示, MDA 含量变化随处理时间的延长一直呈上升趋势(图 7), 实验范围内 MDA 含量未出现剧变点。

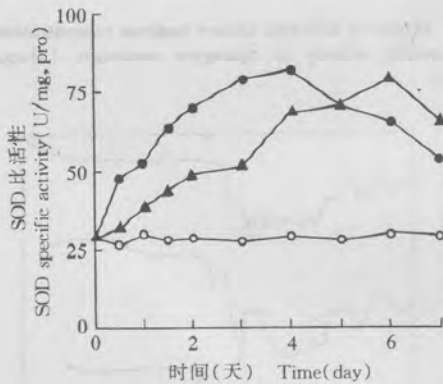


图 6 百草枯浓度与处理时间对普通水绵 SOD 比活性的影响

Fig 6 Effects of different time and different concentration of paraquat on SOD specific activity in *Spirogyra communis* (Hassall) Kützing

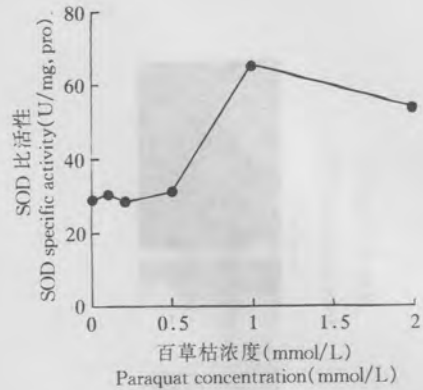


图 5 不同百草枯浓度对普通水绵 SOD 比活性的影响
Fig 5 Effects of different paraquat concentration on SOD specific activity in *Spirogyra communis* (Hassall) Kützing

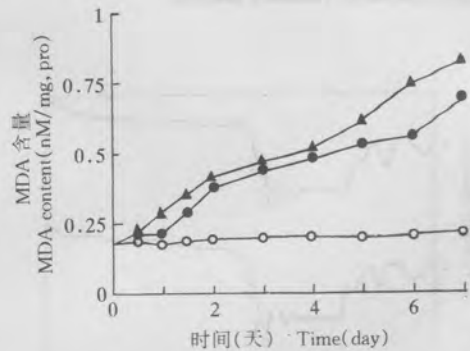


图 7 百草枯浓度与处理时间对普通水绵 MDA 含量的影响

Fig 7 Effects of different time and different concentration of paraquat on MDA content in *Spirogyra communis* (Hassall) Kützing

3 讨 论

正常条件下, 细胞内活性氧的产生和清除处于动态平衡状态, 当植物受逆境胁迫时, 这个平衡就被打破, 活性氧积累。前人的研究均表明, 过剩的活性氧可诱导原核生物内 SOD 生物合成, 使 DNA 的损伤及时得到修复^[1,11]。多种微生物和植物在环境胁迫下, 也具有 SOD 诱导形成的防御机构^[10,11], SOD 活性高低与植物的抗逆性大小有一定相关性。本实验显示常见的普通水绵, 在不同程度的渗透胁迫或化学物质胁迫下, SOD 比活发生明显变化, 且呈单峰曲线, 表明普通水绵对胁迫反应敏感。在一定胁迫范围内可诱导或激活 SOD, SOD 活性迅速升高可提高植物体适应能力, 忍受逆境而得以生存。

Zarrouk 是平衡溶液,浓度提高时形成的渗透胁迫对 SOD 同工酶的影响有差异。5 倍浓度处理 3 周,普通水绵仅剩两条 Mn-SOD 带,表明细胞内 Fe-SOD 同工酶被抑制的同时,Mn-SOD 同工酶可能被诱导或激活。这与前人认为诱导型 SOD 主要为 Mn-SOD 的结果一致^[11],Mn-SOD 对高浓度 O_2^- 有较强的抗性,在高渗透胁迫下,植物机体可能通过选择性调控产生抗性较强的 Mn-SOD 以保护植物体。

百草枯在植物体内被还原,截取电子传递链上的电子,再将截获的电子通过氧化作用传递给分子氧,形成 O_2^- 和 H_2O_2 ,造成植物的伤害^[11]。 O_2^- 不仅对 DNA、多糖、蛋白质和脂质等生物大分子有破坏作用,而且还可通过 Haber-Weise 反应产生毒性更强的羟自由基($\cdot OH$),从而加重对植物的伤害^[11]。然而一定量的百草枯可通过 O_2^- 以提高某些生物的 SOD 活性,从而减轻其伤害;本实验也发现经 1 mmol/L 及 2 mmol/L 的百草枯处理后,普通水绵 SOD 比活明显升高。电泳图谱也显示(图 3)低浓度时 SOD 同工酶谱无明显变化,而浓度高时个别 Mn-SOD 带有增强的趋势。提示百草枯可能诱导普通水绵 SOD 生物合成。

1 mmol/L 和 2 mmol/L 百草枯处理,随着时间的延长,SOD 比活先升高后下降,表明在该处理浓度下,尽管植物机体在一定时间范围内可通过提高 SOD 活性增强植物机体忍受力,但植物机体的忍受力毕竟有一定限度,当机体内的 SOD 不足以清除产生的大量活性氧时,活性氧就会引起膜脂过氧化造成 MDA 积累。

综上所述,适当浓度的渗透胁迫及百草枯能引起普通水绵体内 SOD 比活的增加,且对 SOD 不同同工酶作用效应不一。这些理化因子作用的有关参数我们正在作进一步研究,以期能诱导出含高 SOD 活性的普通水绵,并阐明其作用机制。

参 考 文 献

- 1 Steinitz Y, Mazor Z, Shilo M. A mutant of the cyanobacterium *Plectonema boryanum* resistant to photooxidation. *Plant Sci Lett*, 1979, 16: 317~325.
- 2 Rabinowitch H D, Clase D A, Crapo J D, et al. Positive correlation between superoxide dismutase and resistance to paraquat toxicity in the green alga *Chlorella sorokiniana*. *Arch Biochem Biophys*, 1983, 225(2): 664~668.
- 3 Soong P. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. In: Shelef G, Soeder C J eds. *Algae Biomass*. Amsterdam: North-Holland Biomedical Press, 1980, 97~99.
- 4 程光宇,魏锦城,邹玉珍,等.枸杞果实铜锌超氧化物歧化酶的纯化及其性质研究. *南京师范大学学报(自然科学版)*, 1991, 14(2): 82~92.
- 5 Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plant. *Plant Physiol*, 1977, 59: 309~314.
- 6 Bradford M A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1970, 72: 248.
- 7 程光宇,魏锦城,吴国荣. SOD 的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离和酶活性显示. *植物生理学通讯*, 1994, 4(3): 28.
- 8 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.
- 9 Heath R L, Parker L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 1968, 25: 189~195.
- 10 林植芳,林桂珠,彭长连. 盐藻的超氧化物歧化酶及其对介质盐度的反应. 见:中国科学院华南植物研究所. 中国科学院华南植物研究所集刊(9),北京:科学出版社,1994. 81~87.
- 11 Hassan H M, Fridovich I. Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli* induction by methylviologen. *J Biol Chem*, 1978, 252: 7667~7672.

(责任编辑:许定发)