

转 SOD 基因烟草中 SOD 酶活力对逆境的耐性及其遗传学特征

周 玮^{1,2}, 周 波³, 杨 雪^{1,4}, 侯思名¹, 刘明求¹, 刘飞虎^{1*}

(1. 云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650091; 2. 云南大学 现代生物学研究中心, 云南 昆明 650091; 3. 湖南 龙山县食品药品监督管理局, 湖南 龙山 416800; 4. 中国科学院 昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘 要: 温度、pH、酶抑制剂 H_2O_2 和 KCN 均对转 SOD 基因烟草及其子代(S1 和 F1)的 SOD 活性有影响。在这些不利条件下, 转基因 SOD 高表达烟草品系的 SOD 耐性明显优于对照品系, 且其 S1、F1 能很好地保持亲本的这种优势。

关键词: 转基因烟草; SOD; 耐性; 遗传学特征

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)02-0200-04

The tolerance to adversity stress and its heredity characteristics of SOD activities in transgenic tobacco lines with SOD gene

ZHOU Wei^{1,2}, ZHOU Bo³, YANG Xue^{1,4}, HOU Si-ming¹,
LIU Ming-qiu¹, LIU Fei-hu^{1*}

(1. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2. Modern Biology Research Center, Yunnan University, Kunming 650091, China; 3. Longshan Food and Drug Administration of Hunan Province, Longshan 416800, China; 4. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: The conditions such as temperature, pH, enzymatic inhibitor H_2O_2 and KCN affected SOD activities of the leaves in near isogenic tobacco lines (including transgenic lines with SOD gene in chloroplast and non-transgenic line) and their S1 progenies or F1 hybrids. Under these unsuitable condition, transgenic tobacco lines with overexpressed SOD gene showed obvious advantages in SOD tolerance over that of non-transgenic line, and these advantages could be passed down to their S1 progenies or F1 hybrids.

Key words: transgenic tobacco; SOD; tolerance; heredity characteristics

植物在进化过程中形成了由非酶抗氧化剂和抗氧化酶类组成的内源保护系统以免受活性氧类的伤害。目前在植物体内已发现的抗氧化酶类有超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)等。一般认为 SOD 是植物体内防御氧毒害的关键酶, 它的活性与植物生长发育

(Rizhsky 等, 2003)、细胞膜系统结构和功能稳定性(Allen 等, 1997)密切相关。近年来的研究表明, 采用转基因技术将编码 SOD 的外源基因导入植物体内进行表达, 可以提高转基因植物的生物量(Samis 等, 2002), 并增强植物本身的耐性与抗逆性(Gupta 等, 1993; McKersie 等, 1993; Rennenberg 等, 1994;

收稿日期: 2004-11-29 修回日期: 2005-08-25

基金项目: 云南省人才基金[Supported by Foundation for Excellent Scholar of Yunnan Province]。

作者简介: 周玮(1977-), 女, 湖南永顺县人, 在读博士, 主要从事植物生理生化、遗传育种、生物信息学研究。

* 通讯作者(Author for correspondence)

Tanaka 等,1996; Van Camp 等,1996; Van Breusegem 等,1999; McKersie 等,2000)。但转基因植物体内 SOD 活性发生变化的同时,其本身对逆境胁迫的耐性是否也有所改变? 为此,本文研究了转 SOD 基因烟草及其后代(S1 和 F1)的 SOD 酶活性对提取后的贮存条件和处理条件的响应,以了解温度、缓冲液 pH 及酶抑制剂等对 SOD 活性稳定性的效应,探讨转 SOD 基因烟草体内 SOD 对逆境胁迫的耐性和遗传学特征。

1 材料和方法

1.1 材料

转 SOD 基因烟草(*Nicotiana tabacum*)品系及其近等基因对照品系(从澳洲引进):(1)Fe-SOD 叶绿体高表达品系(Fe-SODh);(2)Mn-SOD 叶绿体高表达品系(Mn-SODh);(2)Mn-SOD mRNA 逆转录低表达品系(Mn-SODl);(4)非转基因对照品系(对照);高表达品系(1)、(2)的自交一代(S1)及转基因品系杂交一代(F1)(杂交组合:(1)×(2)、(2)×(1)、(1)×(3)、(3)×(1)、(2)×(3)、(3)×(2))

1.2 SOD 的提取

SOD 提取液的组成为 50 mmol/L pH7.8 磷酸缓冲液(含 0.1 mmol/L EDTA;0.3%(w/v) Triton X-100;4%(w/v)pvp)(现代植物生理学实验指南,1999),反应液的组成为 2.5 mL 50 mmol/L pH7.8 的磷酸缓冲液+200 μ L 30 mmol/L dl-甲硫氨酸+100 μ L 0.003 mmol/L EDTA +100 μ L 1.5 mmol/L 核黄素(现配)+100 μ L 2.25 mmol/L NBT(刘祖祺等,1994);四个生长期的 SOD 活性以开花后期为最高(另文发表),因此文中以开花后期材料为样品进行分析,选取 1.0 g 植株中部叶混合样,去掉叶脉后,加入 3 倍于样品量的 SOD 提取液。冰浴上研磨成匀浆,于 4 $^{\circ}$ C 下、以 11 424 $\times$ g 条件下的 BECKMAN J2-MI 冰冻高速离心机中离心 20 min,上清液即为粗酶液,即时测定后置于冰箱-25 $^{\circ}$ C 条件下冰冻,以备后面各种处理所需。

1.3 转基因烟草品系及其 S1、F1 的 SOD 活性对贮存条件和抑制因子的响应

1.3.1 冰箱贮存条件的影响 SOD 粗酶液分别在冰箱-25 $^{\circ}$ C 条件下冰冻 7 d,4 $^{\circ}$ C 条件下冷藏 10 h、36 h 后测定酶活。

1.3.2 SOD 的热稳定性 SOD 粗酶液分别放在

20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 条件下的快速恒温数显水浴锅中处理 15 min 后测定酶活。

1.3.2 SOD 的耐酸碱性 SOD 粗酶液分别按 1 体积酶液:9 体积缓冲液(缓冲液的 pH 分别调至 2,4,6,7,8,10,12)混合,于 30 $^{\circ}$ C 水浴锅中处理 15 min 后测定酶活。

1.3.4 H₂O₂ 的影响 SOD 粗酶液分别与 1.562 5 mmol/L、3.125 mmol/L、6.25 mmol/L H₂O₂ 等体积混合,于 30 $^{\circ}$ C 水浴锅中处理 15 min 后测定酶活。

1.3.5 KCN 的影响 SOD 粗酶液分别与 6.25 mmol/L、12.5 mmol/L 的 KCN 等体积混合,于 30 $^{\circ}$ C 水浴锅中处理 15 min 后测定酶活。

1.4 SOD 活性的测定

SOD 活性用 NBT 光化还原法(现代植物生理学实验指南,1999)测定,在盛有 3 mL 反应混合液的试管中,加入适量处理后的 SOD 粗酶液,混匀后放在试管架上。5500 光照度下照光 15 min 后,取出试管,采用 UV-755B 紫外分光光度计迅速测定 OD₅₆₀ 值。以不加酶液(用相同体积的缓冲液代替)的反应液试管照光为最大还原管,不照光的作空白管。SOD 活性计算,以能抑制 NBT 光还原反应 50% 的酶量为 1 个酶活单位(U),酶活性以 U/mg 蛋白表示,按公式 SOD 活性=[(OD_{max} - OD₅₆₀)/OD_{max}]/[(50%) $\times$ 3 mL 反应混合液中加入的蛋白质的量(mg)]计算酶活。

2 结果与讨论

2.1 冰箱贮存条件的影响

不同材料在相同条件下提取的原始粗酶液活性约在 38 U $\cdot$ mg⁻¹ 蛋白(如对照、(Mn-SODl $\times$ Fe-SODh)F1)~45 U $\cdot$ mg⁻¹ 蛋白(如(Mn-SODh $\times$ Mn-SODl)F1)之间,其它材料间活性较接近。经过冰箱贮存后,呈现出原始的酶活>冰冻 7 d 后的酶活>冷藏 10 h 后的酶活>冷藏 36 h 后的酶活(图 1)。冰冻 7 d 后,大多数材料的酶活变化不大;冷藏 10 h 后,对照、Mn-SODl、(Mn-SODl $\times$ Fe-SODh)F1 的活性丧失最快,下降 30% 左右;冷藏 36 h 后,酶活只能保留原来的 30%~50%,并以 Mn-SODl 品系下降最快。相对于对照品系,2 个转基因高表达品系的 SOD 活性在贮存过程中丧失较慢;而 Mn-SODl 品系的酶活则丧失较快;S1 酶活丧失情况接近其亲本;F1 酶活丧失情况介于双亲之间。3

个转基因品系明显地影响了其后代的耐性特征。对冰箱贮存条件而言,转基因高表达品系 SOD 活性的耐性更强,而转基因低表达品系的 SOD 活性的耐性变弱。SOD 酶活测定前的贮藏环境是影响测定结果的重要因素之一,冰冻对活性影响较小但解冻费时;冷藏方便但对酶活影响大,尤其是长时间放置。因此应当在分离提取后马上测定,尽量避免贮存条件对 SOD 活性测定造成的不利影响。

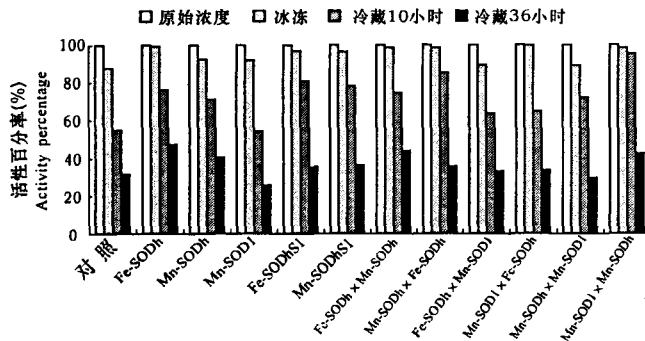


图 1 冰箱贮存对 SOD 活性的影响
Fig. 1 Effect of different storage conditions on SOD activity

不同材料的原始酶活性按图中顺序依次为 38, 84, 42, 58, 42, 12, 41, 15, 42, 59, 40, 75, 43, 98, 42, 43, 38, 45, 25, 41, 63 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白。图中不同条件下的酶活丧失情况均以各自原始的 SOD 活性为参照(设为 100%)。

The original activities of different materials were 38, 84, 42, 58, 42, 12, 41, 15, 42, 59, 40, 75, 43, 98, 42, 43, 38, 45, 25 and 41, 63 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein according to the orders in figure 1, respectively. Every activity percentage in different conditions was calculated on the basis of its own original activity.

2.2 SOD 的热稳定性

不同温度条件下酶活的总体趋势是 50 $^{\circ}\text{C}$ 的酶活 < 40 $^{\circ}\text{C}$ 的酶活 < 30 $^{\circ}\text{C}$ 的酶活 < 20 $^{\circ}\text{C}$ 的酶活(图 2),酶液在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 15 min 后出现大量肉眼可见的沉淀。从热处理后的酶活丧失的情况分析,即使在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下进行处理 15 min 后 SOD 活性丧失都很明显。随着处理温度的升高,酶活逐步降低。当温度达到 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,对照品系活性最低,这表明转 SOD 基因烟草品系在高温条件下的热稳定性优于对照品系,并且这种热稳定优势在转基因品系的后代中略有加强,尤其是杂交后代(F1)。

2.3 SOD 的耐酸碱性

缓冲液 pH 为 4~10 时, SOD 显示出最高活性(图 3),随着 pH 值的上升或下降,酶活急剧降低。酶活的最适 pH 值依次为: (Mn-SODh x Fe-SODh) F1、(Fe-SODh x Mn-SODl) F1、(Mn-SODl x Fe-

SODh) F1 是 4; 对照品系、Fe-SODh 品系 S1、Mn-SODh 品系 S1 是 6; (Fe-SODh x Mn-SODh) F1、(Mn-SODh x Mn-SODl) F1 是 7; Fe-SODh 品系、Mn-SODh 品系、Mn-SODl 品系、(Mn-SODl x Mn-SODh) F1 是 8。不同材料的最适 pH 不同,因此常用的 pH 7.8 条件下测定 SOD 活性将会导致测定结果产生偏差。pH 值为 2 时,对照品系、3 个转基因亲本品系、Fe-SODh 和 Mn-SODl 组合的 F1 SOD 活性完全丧失;而 pH 值为 12 时,仅 Mn-SODl 品系的酶活为零。从 pH 2~12 的处理结果看,转 SOD 基因高表达品系及其后代的 SOD 活性的耐酸碱性更好。

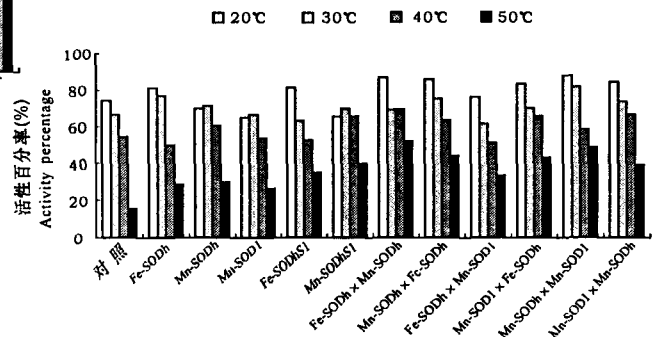


图 2 不同温度处理后的 SOD 活性变化
Fig. 2 Changes of SOD activities caused by different temperatures

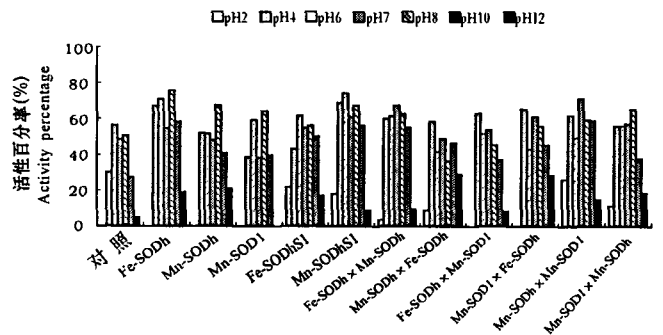


图 3 不同 pH 缓冲液处理后的 SOD 活性变化
Fig. 3 Changes of SOD activities caused by buffer solutions of different pH

2.4 SOD 对 H_2O_2 和 KCN 的反应

从图 4, 5 可见, (1) 抑制剂 H_2O_2 处理后的 SOD 活性损失非常严重(图 4), 浓度达到 6.25 mmol/L 时, 一部分材料的酶活性完全丧失。虽然 SOD 活性丧失严重, 但仍能看出转基因品系略有优势, 其后代

的优势则不明显。3 种 SOD 同工酶类型中仅 Mn-SOD 对 H_2O_2 不敏感,而 Cu,Zn-SOD 和 Fe-SOD 均对 H_2O_2 敏感,推测可能是植物材料的 Mn-SOD 含量较少所致。(2) KCN 对 SOD 活性的影响不如 H_2O_2 显著(图 5)。3 种 SOD 同工酶类型中仅 Cu,Zn-SOD 对 KCN 敏感,因此抑制剂 KCN 影响的主要是 Cu,Zn-SOD 的活性。转基因品系对抑制剂 KCN 的耐性比对照品系强,在其后代中体现得更为明显。

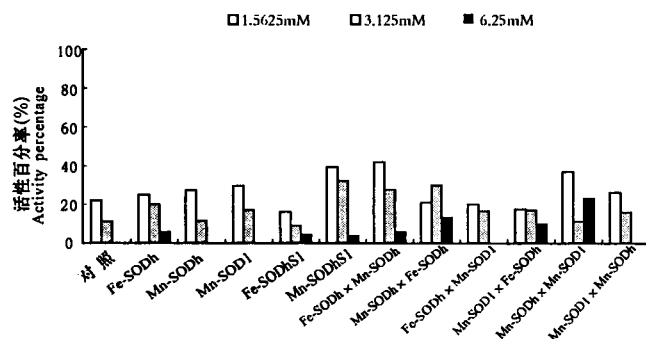


图 4 不同浓度 H_2O_2 处理后的 SOD 活性变化

Fig. 4 Changes of SOD activities caused by H_2O_2 at different concentration

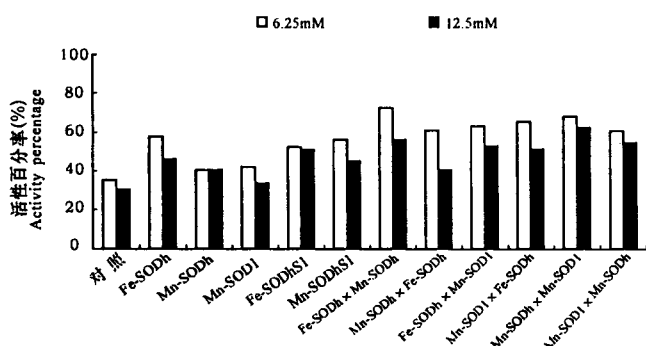


图 5 不同浓度 KCN 处理后的 SOD 活性变化

Fig. 5 Changes of SOD activities caused by KCN at different concentration

SOD 的外源基因既可以提高(或降低)SOD 表达产物的总量,又能通过改变此类 SOD 同工酶的含量从而增强(或削弱)SOD 本身在不利条件下的耐性,这些改变能遗传给后代,并且 S1、F1 较好地保持从亲本获得的这种特性。

参考文献:

- 中国科学院植物生理研究所,上海市植物生理学会. 1999. 现代植物生理学实验指南[M]. 上海:科学出版社,314—394.
- 刘祖祺,张石城. 1994. 植物抗性生理学[M]. 北京:中国农业出版社,371—372.
- Allen RD, Webb RP, Schake SA. 1997. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses[J]. *Free Radic Biol Med*, 23(3): 473—479.
- Gupta AS, Heinen JL, Holaday AS *et al.* 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(4): 1 629—1 633.
- McKersie BD, Chen Y, de Beus M, *et al.* 1993. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Plant Physiol*, 103(4): 1 155—1 163.
- McKersie BD, Murnaghan J, Jones KS, *et al.* 2000. Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance[J]. *Plant Physiol*, 122(4): 1 427—1 437.
- Rennenberg H, Polle A. 1994. Protection from oxidative stress in transgenic plants[J]. *Biochem Soc Trans*, 22(4): 936—940.
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R. 2003. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress [J]. *Jour Biol Chem*, 278(40): 38 921—38 925.
- Samis K, Bowley S, McKersie B. 2002. Pyramiding Mn-superoxide dismutase transgenes to improve persistence and biomass production in alfalfa[J]. *Jour Exp Bot*, 53(372): 1 343—1 350.
- Tanaka K, Aono M, Saji H *et al.* 1996. Stress tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase[J]. *Biochem Soc Trans*, 24(2): 200.
- Van Breusegem F, Slight L, Stassart JM, *et al.* 1999. Overproduction of *Arabidopsis thaliana* FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize[J]. *Plant Cell Physiol*, 40(5): 515—523.
- Van Camp W, Capiou K, Van Montagu M, *et al.* 1996. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts[J]. *Plant Physiol*, 112(4): 1 703—1 714.

综上所述,贮藏环境、温度、缓冲液 pH 及酶抑制剂对 SOD 活性都有影响。在本文实验涉及的不利条件下,转基因 SOD 高表达烟草品系及其后代的 SOD 活性及耐性明显优于对照品系;而转基因 SOD 低表达烟草品系相对于对照品系则不具优势。这说明利用转基因技术导入编码(或抑制)某种类型