

烟气与化学

重金属离子对烤烟叶片中铜锌超氧化物歧化酶活性的影响

邓家军^{1,2}, 胡继伟¹, 李继新³, 苏贤坤³, 黄先飞¹, 刘峰¹

1 贵州师范大学贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵阳市宝山北路 116 号 550001;

2 贵州师范大学生命科学学院, 贵阳市宝山北路 116 号, 50001;

3 贵州省烟草科学研究所, 贵阳市威清路 334 号, 550003

摘要: 为研究重金属对烟叶铜锌超氧化物歧化酶的作用规律, 消除活体烟叶中其它因素的影响, 本试验采用离体方法, 利用硫酸铵盐析分级分离、乙醇-氯仿沉淀除杂、丙酮再沉淀分级得到只含铜锌超氧化物歧化酶的酶液。研究了不同浓度的 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Se^{2+} 、 Sb^{2+} 、 Cd^{2+} 对该酶的影响。结果显示: 在浓度为 0~100 mg/L 范围内, Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Sb^{2+} 、 Cd^{2+} 都能使铜锌超氧化物歧化酶的活性先降低后升高, 但在相同浓度下, Cd^{2+} 对酶活性的影响最大, 其次是 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 。 Sb^{2+} 使该酶的活性的变化趋势与 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 基本一致, 仅变化幅度不及 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 显著。 Se^{2+} 能降低该酶的活性, 当浓度为 10 mg/L 时, 酶活性的降低率为 58.78%。当 Se^{2+} 浓度为 20 mg/L 时, 酶活性几乎完全丧失。分析了铜锌超氧化物歧化酶活性受 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 等影响的可能机制, 以期对烟草重金属污染的酶学指标监测系统的建立提供数据支持。

关键词: 烤烟; 超氧化物歧化酶; 活性; 重金属离子; 影响

doi: 10.3969/j.issn.1004-5708.2010.03.001

中图分类号: TS411.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-5708(2010)03-0001-06

Effects of heavy metal ions on copper-zinc superoxide dismutase activity in flue-cured tobacco leaves

DENG Jia-Jun^{1,2}, HU Ji-wei¹, LI Ji-xin³, SU Xian-kun³, HUANG Xian-fei¹, LIU Feng¹

1 Guizhou Provincial Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guizhou Normal University, No. 116, Baoshan North Road, Guiyang 550001, China;

2 School of Life Sciences, Guizhou Normal University, No. 116, Baoshan North Road, Guiyang 550001, China;

3 Guizhou Provincial Institute of Tobacco Science, No. 334, Weiqing Road, Guiyang 550003, China

Abstract: In vitro method was applied to study the changing trends in the copper-zinc superoxide dismutase activity caused by heavy metals in order to eliminate influence of various environmental factors. Enzyme solution of copper-zinc superoxide dismutase from tobacco leaves was obtained by using ammonium sulphate to form different levels of precipitates and isolated by using chloroform and alcohol and further cleaned-up with acetone. The effects of Fe^{2+} , Mn^{2+} , Se^{2+} , Sb^{2+} , and Cd^{2+} with different concentrations on copper-zinc superoxide dismutase were studied, and results showed that the activity of copper-zinc superoxide dismutase increased at first and then decreased in response to increasing Fe^{2+} , Mn^{2+} , Sb^{2+} , or Cd^{2+} supply from 0 to

作者简介: 邓家军, 男, 硕士研究生, 主要从事植物化学和环境化学研究, E-mail: dengj2118@163.com

胡继伟(通讯作者), 男, 博士, 教授, 主要从事环境化学和资源化学研究, Tel: 0851-6700996, E-mail: jiwei@yaho.com

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(206135), 贵州省高级人才特助经费(TZJF-2006-27), 贵州省教育厅自然科学研究重点项目(2005106)

收稿日期: 2009-05-12

100 mg/L. At the same concentration, however, Cd^{2+} exhibited the strongest influence on the change of copper-zinc superoxide dismutase activity, followed by Mn^{2+} and Fe^{2+} . The change of the enzyme activity under the effect of Sb^{2+} was similar to, but not more than, that of Cd^{2+} or Mn^{2+} . While Se^{2+} can reduce the activity of copper-zinc superoxide dismutase, the decreasing rate of the enzyme activity was 58.78 % in response to the increasing Se^{2+} supply of 10 mg/L. When the concentration of Se^{2+} reached 20 mg/L, the enzyme activity was almost entirely lost. Copper-zinc superoxide dismutase activities under the effects of heavy metal ions Fe^{2+} , Mn^{2+} , Se^{2+} , Sb^{2+} , and Cd^{2+} can be ascribable to the result that the three main factors interacted. This research may provide useful data for the establishment of zymological indicator systems, which can monitor the potential heavy metal contamination risk during different tobacco growth stages.

Key words: flue-cured tobacco; superoxide dismutase; heavy metals ions

烟草 (*Nicotiana Tabacum* L.), 茄科, 烟草属, 为一年生或多年生植物。是我国重要的经济作物之一^[1]。烟叶作为烟草栽培的目的产品, 其颜色、光泽、油分、香气等烟叶品质指标, 受烟叶生长过程、特别是成熟期生理生化反应进行的状况的影响, 这与烟叶内保护酶的清除效应有着直接的联系^[2-3], 而超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD, EC1.15.1.1) 是酶促清除系统的重要组成部分^[4]。SOD 根据其辅基部位结合金属离子的不同, 可以分为: $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 、 Mn-SOD 和 Fe-SOD ^[5]等。SOD 通过催化超氧阴离子自由基发生歧化反应, 生成 H_2O_2 和 O_2 , H_2O_2 在过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 催化下转化为水而得以清除, 达到清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 的效果^[6], 所以 SOD 在清除超氧阴离子自由基方面起着至关重要的作用, 具有防御活性氧毒性、增强机体抗辐射损伤能力、抗衰老等功效。

作为地貌发育极具特色的我国西南喀斯特区喀斯特山区^[7], 是中国重金属矿的主要所在地之一。在快速工业化过程中, 重金属污染给当地环境保护造成一定压力^[8]。已有研究表明: 云南金顶超大型矿区长期矿业活动对矿区水系沉积物造成了严重的镉污染^[9]。重金属污染物排放所造成的土壤和水系重金属污染, 影响了包括烟草在内的植物的生长、发育, 给农业生产造成巨大损失, 进而对人类健康构成了巨大威胁。重金属对植物 SOD 的影响, 国内外已有不少研究^[10], 但多集中在重金属离子被植物吸收、富集后对植物中某一部位的 SOD 活性产生影响方面, 而利用重金属离子对纯化的烟叶 $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 活性影响的研究却鲜有报道。本文拟以贵州烟叶为研究材料, 探讨 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Se^{2+} 、 Sb^{2+} 、 Cd^{2+} 对初步纯化的 $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 活性影响的规律, 为 SOD 的抗氧化性研究提供一定的理论依据, 同时也能为土壤污染的酶指标体系的建立提供一定的数据参考, 进而为提高中国西南地区烟草产

量及品质提供基础服务。

1 试验部分

1.1 试验仪器

紫外-可见分光光度计 (UV-7504PC, 中国上海欣茂仪器有限公司); 电子天平 (LIBROR AEG-220, 感量: 0.0001 g, 日本岛津公司); 水纯化系统 (Human Nex Power 2000 型, 韩国 Human 公司); 台式高速冷冻离心机 (Allegra X-22R, Beckman Coulter 有限公司); 等离子体发射光谱仪 (UPTIMA 5300V, Perkin Elmer, USA); 移液枪 (250 μL 、1000 μL , 上海求精生化试剂仪器有限公司) 等。所用试剂皆为国产分析纯。

1.2 试验材料和方法

1.2.1 试验材料

供试材料为云烟 87 成熟叶, 由贵州省烟草科学研究所提供。

1.2.2 酶液的制备

将新鲜的烟叶 416.7573 g 冷冻后搅碎匀浆, 用 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 840 mL (pH = 7.6) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下浸泡 20 h, 4 层纱布过滤; 滤液在 10000 r/min 下冷冻 (4 $^{\circ}\text{C}$) 离心 8 min, 得上清液; 在上清液中加入 55% 饱和度的硫酸铵, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下冷藏 20 h, 离心分离; 沉淀用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 150 mL (pH = 7.6, 4 $^{\circ}\text{C}$) 溶解, 加入 0.25 倍的冷冻乙醇和 0.15 倍的冷冻氯仿, 冷藏 2 h, 离心分离 (10500 r/min, 20 min), 取上清液, 加入 3 倍的冷冻丙酮, 冷藏 2 h, 用直径为 0.45 μm 的滤膜抽滤后, 沉淀用 10 mmol/L (pH = 7.6) 的磷酸缓冲液溶解, 用聚乙二醇 20000 透析浓缩至 20 mL, 得酶液。

1.2.3 SOD 活性测定方法

SOD 活性采用氮蓝四唑法 (NBT)^[11]测定: 原理是通过 SOD 抑制氮蓝四唑 (NBT) 在光下的还原作用来测定酶活性大小。在有氧化物质存在下, 核黄素可被光还原, 被还原的核黄素在有氧条件下极易再氧化而产

生超氧阴离子自由基,超氧阴离子自由基可将氮蓝四唑还原为蓝色的甲脒,甲脒在 560 nm 处有最大吸收。而 SOD 可清除超氧阴离子自由基,从而抑制了甲脒的形成。于是光还原反应后,反应液蓝色愈深,说明酶活性愈低,反之酶活性愈高。据此可以计算出酶活性大小。在总体积为 3 mL 的反应液中含有 1.5 mL 浓度为 50 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH = 7.8); 0.3 mL 浓度为 130 mmol/L 的甲硫氨酸; 0.3 mL 浓度为 750 μmol/L 的 NBT; 0.3 mL 浓度为 100 μmol/L 的 EDTA-Na₂; 0.3 mL 浓度为 20 μmol/L 的核黄素; 0.05 mL 酶与金属的混合液(两支对照管以 50 mmol/L, pH = 7.8 的磷酸缓冲液代替酶与金属的混合液); 0.25 mL 蒸馏水。混匀后将 1 支对照管置于暗处,其它各管于 4000 lx 光下照射 20 min。至反应结束后,以不照光的对照管做空白,在 560 nm 处分别测定其它各管的吸光度。已知 SOD 活性单位以抑制 NBT 光化还原的 50% 为 1 个酶活力单位 (U), SOD 活性用比活力表示,其意义为每克酶制剂所具有的酶活力单位数(单位为 U/g)。可以按下式计算

$$\text{SOD 比活力} = (A_{ck} - A_E) \times V / (A_{ck} \times 0.5 \times W \times V_1)$$

式中 A_{ck}: 照光对照管的吸光度, A_E: 样品管的吸光度, V: 样品液总体积 (mL), V₁: 测定时的酶液用量 (mL), W: 样鲜质量 (g)。

1.2.3 重金属对 Cu · Zn-SOD 活性的影响

将酶液稀释 10 倍后,分别与 10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 的 Fe²⁺、Mn²⁺、Se²⁺、Cd²⁺ 及 10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、50 mg/L、80 mg/L 的 Sb²⁺ 以 1:9 的比例混合,30 min 后,取 0.05 mL 的酶与金属的混合液于测定酶活性的反应液中测定酶的活性(计算 SOD 比活力时, V₁ = 0.05 × 实际加入的酶液所占的比例)。

2 结果与讨论

2.1 酶液制备

本试验通过 (NH₄)₂SO₄ 盐析沉淀实现分级分离,饱和度达 55% 以上,活力回收率不再增加,超过 60% 时沉淀溶解液的颜色迅速变深且活力回收率下降。试验确定 (NH₄)₂SO₄ 的饱和度为 55% ~ 60%, 这样既保证了最大活力回收率又避免了过多杂质的引入^[12]。使用 0.25 倍体积的乙醇和 0.15 倍体积的氯仿混合液去除 Fe-SOD、Mn-SOD 和部分其他杂蛋白,再通过丙酮沉淀继续去杂脱色。

2.2 Cu · Zn-SOD 的鉴定

2.2.1 酶活性对 H₂O₂ 和乙醇-氯仿的敏感性

本试验将硫酸铵盐析分级分离、乙醇-氯仿沉淀除杂、丙酮再沉淀分级得到的酶液进行酶的类型鉴定。由于 Cu · Zn-SOD 对 H₂O₂ 敏感而对氯仿-乙醇不敏感, Mn-SOD 对 H₂O₂ 不敏感而对氯仿-乙醇敏感, 而 Fe-SOD 对 H₂O₂ 和氯仿-乙醇均敏感, 因此可用这两种抑制剂鉴定烟叶 SOD 的类型。

表 1 H₂O₂ 对酶活性的影响

H ₂ O ₂ 浓度/(mmol/L)	酶活性/(U/g)	酶活性抑制率
0	16.968	0
1	2.354	86.13%
2	-0.585	103.45%
3	0.665	96.08%
4	1.847	89.11%
5	1.933	88.61%

表 2 乙醇-氯仿对酶活性的影响

乙醇-氯仿浓度/(mmol/L)	酶活性/(U/g)	酶活性抑制率
0	16.968	0
0.5	15.479	8.78%
1	14.654	13.64%
1.5	14.132	16.71%
2	14.015	17.40%
2.5	13.766	18.87%

由表 1 可知: 1 mmol/L 的 H₂O₂ 对酶活性的抑制率为 86.13%, 2 mmol/L 的 H₂O₂ 几乎使酶失活。而由表 2 可知: 1 mmol/L 的乙醇-氯仿对酶活性的抑制率为 13.64%, 2 mmol/L 的乙醇-氯仿对酶活性的抑制率为 17.40%。所以该酶对 H₂O₂ 敏感, 而对乙醇-氯仿较不敏感, 可以初步判定该酶为 Cu · Zn-SOD。

2.2.2 酶液中金属元素含量的测定

本试验通过 ICP-AES 测定了样品中金属元素 Ni、Cu、Zn、Fe、Mn 的含量, 试验结果见表 3。

表 3 酶液中几种重金属 (Ni、Cu、Zn、Fe and Mn) 的含量

分析元素	分析波长/nm	平均浓度/(mg/L)
Ni	232.0	未检出
Cu	324.8	0.652
Zn	213.9	1.216
Fe	248.3	未检出
Mn	279.5	未检出

由以上结果综合分析, 得出样品中只含有 Cu · Zn-SOD, 无 Mn-SOD, Fe-SOD 和 Ni-SOD。

2.3 重金属离子对 Cu·Zn-SOD 活性的影响

2.3.1 Fe²⁺、Se²⁺对 Cu·Zn-SOD 活性的影响

Fe²⁺、Se²⁺对 Cu·Zn-SOD 活性的影响见图 1。

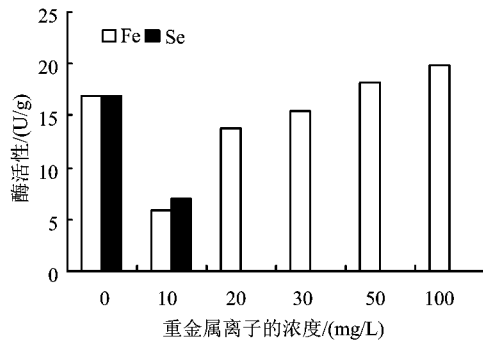


图 1 Fe²⁺、Se²⁺对 Cu·Zn-SOD 活性的影响

当 Fe²⁺ 的浓度为 10 mg/L 时酶活性的下降率为 64.85%，随着 Fe²⁺ 浓度增加，酶的活性逐渐增大，当浓度为 100 mg/L 时，酶的活性是 Fe²⁺ 浓度为零时的酶活性的 1.17 倍。这与文献上报道的运用活体研究的结果基本一致。章艺等^[13]在研究高铁胁迫对大豆叶片体内保护系统及膜脂过氧化的影响时发现：浙春 3 号在 100 mg/kg 的铁胁迫下，SOD 的活性达到最大，尔后随铁浓度的升高而下降。蔡妙珍等^[14]研究表明：过量 Fe²⁺ 胁迫明显抑制了叶片 SOD 的活性，使活性氧清除能力减弱。对于 Se²⁺ 来说，酶的活性对 Se²⁺ 很敏感，当 Se²⁺ 浓度为 10 mg/L 时，酶活性的降低率为 58.78%，当浓度增大到 20 mg/L 时，酶活性几乎为零。由此可见，Se²⁺ 能够抑制 Cu·Zn-SOD 活性。该结果与文献^[15]报道的利用植物活体研究的结果基本一致。

2.3.2 Mn²⁺、Sb²⁺和 Cd²⁺对 Cu·Zn-SOD 活性的影响

Mn²⁺、Sb²⁺和 Cd²⁺对 Cu·Zn-SOD 活性的影响见图 2。

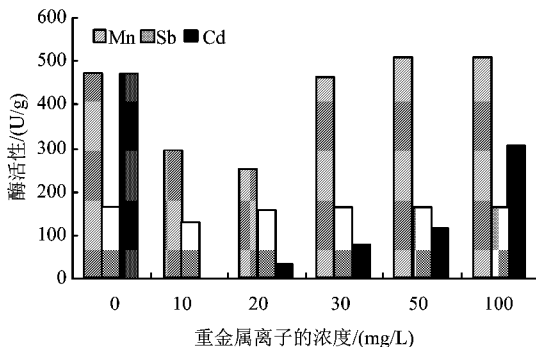


图 2 Mn²⁺、Sb²⁺和 Cd²⁺对 Cu·Zn-SOD 活性的影响

第一，当反应液中的 Mn²⁺ 浓度为 10 mg/L、20

mg/L 时，酶活性分别比对照降低了 37.74%、44.58%；而当 Mn²⁺ 浓度提高到 30 mg/L 时，酶活性开始大幅度上升；当浓度提高到 50 mg/L 时，酶活性大约是对照的 1.07 倍；当浓度达到 100 mg/L 时，酶活性继续上升，只是幅度较小。所以随着 Mn²⁺ 浓度的提高，Cu·Zn-SOD 的活性呈现先降低后升高的趋势，这与文献上报导的对植物活体施以 Mn²⁺ 胁迫的研究结果是一致的。鲍思伟^[16]在研究叶面施锰对豌豆生物效应的影响时发现：喷施不同浓度硫酸锰溶液，能增强豌豆叶片的 SOD 活性，降低活性氧生成速率。其它文献^[17-18]也有相似的报道。

第二，当反应液中的 Sb²⁺ 浓度为 10 mg/L 时，酶活性比对照降低了 22.56%，而当 Sb²⁺ 浓度提高到 20 mg/L 时，酶活性开始升高，当浓度提高到 30 mg/L 时，酶活性接近对照值，以后随着 Sb²⁺ 浓度升高，Cu·Zn-SOD 的活性变化幅度不大。所以随着 Sb²⁺ 浓度的提高，酶活性呈现先降低后升高的趋势，但酶活性的整体变化幅度不大。

第三，Cd²⁺ 浓度在 0~100 mg/L 范围内，Cu·Zn-SOD 的活性对 Cd²⁺ 比较敏感；当浓度为 10 mg/L 时，酶几乎完全失活。随着 Cd²⁺ 浓度的不断升高，酶的活性大幅度攀升，与 20 mg/L 浓度下的酶活性相比，在浓度为 30 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 时的酶活性分别提高了 1.46 倍、2.55 倍和 8.42 倍。所以，随着 Cd²⁺ 浓度的增大，Cu·Zn-SOD 的活性呈现大幅度降低后，再大幅度升高的趋势。黄玉山等^[19]对紫羊茅 (*Festuca rubra* L.) 2 个品种的研究也表明：随着 Cd²⁺ 浓度的提高，SOD 活性呈现先升高后降低的趋势。强维亚等^[20]在研究镉和增强紫外线-B 辐射复合作用对大豆生长的影响时发现：Cd 可导致 SOD 和过氧化物酶 (POD) 活性升高，在 Cd 作用下，SOD 活性升高较 POD 更为显著。另有研究结果^[21-22]与此类似。

2.3.3 重金属浓度与相应的 Cu·Zn-SOD 活性相关性分析

本研究运用 SPSS 11.5 软件对重金属浓度与相应的 Cu·Zn-SOD 活性相关性进行了分析，其结果如表 4。表 4 中的数据说明：重金属离子浓度与相应的酶活性之间相关性系数越大，表示它们之间越接近线性关系，如果是负值，则呈负线性关系；受重金属离子影响的酶活性之间的相关性系数值越大，表示受这两种重金属离子影响的酶活性的变化规律越趋近一致，如果是负值，则变化关系则趋于相反。

已有研究表明^[23]：每个 Cu·Zn-SOD 分子含 1 个 Cu 离子和 1 个 Zn 离子，分子为二聚体，不含色氨酸，

酪氨酸含量亦少,构象分析结果表明 Cu, Zn-SOD 含 α -螺旋很少(3% ~ 8%),主要是 β -折叠(45%);亚基由 8 股逆向平行肽链的 β -折叠构成一桶状结构,十分稳定。Cu · Zn-SOD 活性中心形状像一个椭圆形口袋(15, 9, 6Å),在其附近形成一个明显的正电势梯度,口袋底部金属辅基 Cu 与 4 个 His 和 1 个 H₂O 配位,Zn 与 3 个 His 和 1 个 Asp 配位,Cu 与 Zn 之间通过共同连接 1 个 His 而形成咪唑桥结构。Zn 的作用一是可调节咪唑基

与 Cu 的相互作用,二是对活性中心结构起稳定作用。超氧阴离子在 H⁺ 存在的情况下,经 SOD 催化,生成 O₂ 和 H₂O₂。关于 Cu · Zn-SOD 的催化机理,Boden 等^[24] 提出的理论如下:

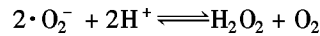
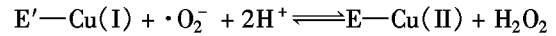
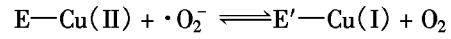


表 4 重金属浓度与 Cu · Zn-SOD 活性之间及 Cu · Zn-SOD 活性之间的相关性

Pearson 相关性	重金属离子浓度	酶活性(Fe)	酶活性(Mn)	酶活性(Se)	酶活性(Sb)	酶活性(Cd)
重金属离子浓度	1					
酶活性(Fe)	0.604	1				
酶活性(Mn)	0.542	0.801	1			
酶活性(Se)	-0.981**	-0.542	-0.439	1		
酶活性(Sb)	0.371	0.943**	0.774	-0.337	1	
酶活性(Cd)	0.141	0.634	0.644	0.029	0.561	1

注: ** 表示在 0.01(双尾检测)水平上相关性显著。

作为一种诱导酶, Cu · Zn-SOD 活性受其底物 ·O₂⁻ 浓度的诱导。由于逆境胁迫下 ·O₂⁻ 的产生会增多,从而诱导了 Cu · Zn-SOD 活性的增强。但当 ·O₂⁻ 的增加远远超过正常的歧化能力时,细胞内多种功能受到破坏,生理代谢紊乱,SOD 活性反而受到抑制而下降^[25]。

植物体受到重金属(Fe、Mn、Se、Sb、Cd 等)胁迫后,可以引起植物细胞超微结构变化^[26],抑制酶活性^[27],诱导产生大量的 ·O₂⁻, ·O₂⁻ 能损伤主要的生物大分子(如蛋白质和 DNA)及引起膜脂过氧化^[28],而植物中的多种抗氧化防卫系统能够清除 ·O₂⁻,保护细胞免受氧化胁迫的伤害,这也是植物忍耐重金属胁迫的主要机理之一。重金属胁迫能诱导 Ubiquitin、热休克蛋白(HSP)、DnaJ-like 蛋白、几丁质酶、 β -1, 3 葡聚糖酶、富含脯氨酸细胞壁蛋白(PRP)、富含甘氨酸细胞壁蛋白(GRP)和病原相关蛋白(PR)等基因的表达。这些胁迫蛋白基因能响应多种重金属胁迫而表达,在重金属胁迫下,这些胁迫蛋白质协同作用可能在清除重金属变性蛋白质、维持细胞的正常代谢和提高细胞的重金属抗性方面有重要作用^[25]。

在本研究中,加入低浓度的外源 Fe²⁺、Mn²⁺、Se²⁺、Sb²⁺、Cd²⁺,都能使 Cu · Zn-SOD 活性产生不同程度的降低。随着加入的外源重金属离子浓度的不断增大,所引起的 Cu · Zn-SOD 活性变化趋势不同,其原因可能是由以下 3 种机制造成的:

第一,重金属离子具有空轨道,容易和酶蛋白的

氨基酸作用产生配合物,使部分酶的空间结构发生变化而失去活性。荧光猝灭的动力学分析表明重金属与酶形成的配合物由两个独立步骤完成:第一步是双分子快速缔合过程,形成了结构疏松的配合物,第二步是单分子慢速过程,即松散的配合物“异构化”成为结合紧密的配合物。同时,使用红外光谱(FTIR 谱)和圆偏光二向色性谱(CD 谱)证实相互作用过程伴随了蛋白质二级结构的变化(主要是 α -螺旋和 β -折叠)^[29]。

第二,有些重金属离子(如 Fe²⁺、Mn²⁺),因其金属特征与 Cu · Zn-SOD 活性中心的 Cu²⁺、Zn²⁺ 的金属特征相似,能够进入活性中心以取代因透析等原因而丢失的部分 Cu²⁺、Zn²⁺,使得部分因无中心离子而丧失的酶活性的 Cu · Zn-SOD 重新恢复活性^[30]。

第三,由于 Cu · Zn-SOD 是诱导酶,在重金属离子的胁迫下, ·O₂⁻ 的产生会增多^[31],从而诱导了 Cu · Zn-SOD 活性的增强。但过多的 ·O₂⁻ 又会抑制酶活性。

总之,外源重金属离子 Fe²⁺、Mn²⁺、Se²⁺ 等直接作用于离体的酶时,可能通过以上 3 种机制对酶的活性产生影响。当酶活性提高的程度与降低的程度相等时,所表现出来的酶的总活性为零;当酶活性提高的程度逐渐大于降低的程度时,所表现出来的酶的总活性逐渐提高;当酶活性提高的程度逐渐小于降低的程度时,所表现出来的酶的总活性逐渐降低。而在重金属离子胁迫下的植物体,SOD 酶活性发生变化可能是因为进入植物体的重金属离子参与了氧化还原循环^[32],引起活性氧的变化,在一定浓度范围内,活性氧作为信

号分子^[33],可能促进 SOD 酶活性。但随着 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 等离子浓度的增大,当活性氧浓度达到一定临界值时,抑制了 SOD 酶活性^[34]。

3 结论

硫酸铵盐析分级分离、乙醇-氯仿沉淀除杂、丙酮再沉淀分级,得到主要含 $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 的酶液。在浓度为 0~100 mg/L 范围内,低浓度的重金属离子 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Se^{2+} 、 Sb^{2+} 、 Cd^{2+} 都能使 $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 活性降低。随着重金属离子浓度的提高,不同种重金属离子使 $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 活性变化趋势不同: Se^{2+} 能使酶活性急剧降低,而 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Sb^{2+} 、 Cd^{2+} 能使酶活性逐渐升高。就敏感性而言, $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 对 Mn^{2+} 、 Se^{2+} 比较敏感, Fe^{2+} 、 Cd^{2+} 次之,而对 Sb^{2+} 最不敏感。

参考文献

- [1] 雷丽萍,郭荣君,缪作清,等.微生物在烟草生产中应用研究进展[J].中国烟草学报,2006,12(4):47-51.
- [2] 邓小华,周冀衡,陈新联,等.烟叶质量评价指标间的相关性研究[J].中国烟草学报,2008,14(2):1-8.
- [3] 崔喜艳,陈展宇,于鸣,等.土壤 pH 值对烤烟叶片膜脂过氧化及保护酶活性的影响[J].中国烟草学报,2004,10(5):34-37.
- [4] 赵丽英,邓西平,山仑.活性氧清除系统对干旱胁迫的响应机制[J].西北植物学报,2005,25(2):413-418.
- [5] Alscher R G, Erturk N, Heath L S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants[J]. J Exp Bot, 2002, 53(372): 1331-1341.
- [6] Luo A L, Liu J Y, Ma D Q, et al. Increment of antioxidant activity of transgenic tobacco with betaine aldehyde dehydrogenase [J]. Chin Sci Bull, 2001, 46(6): 492-495.
- [7] 欧阳自远.中国西南喀斯特生态脆弱区的综合治理与开发脱贫[J].世界科技研究与发展,1998,20(2):53-56.
- [8] 蔡立梅,马瑾,周永章,等.东莞市农业土壤重金属的空间分布特征及来源解析[J].环境科学,2008,29(12):3496-3502.
- [9] 李航,肖唐付,双燕,等.云南金顶铅锌矿区水系沉积物中镉的地球化学分布及其环境质量[J].环境化学,2008,29(10):2894-2898.
- [10] 徐晓燕,李东亮,李卫芳,等.镉对烟叶膜脂过氧化及体内保护系统和钾吸收的影响[J].中国烟草学报,2002,8(2):6-10.
- [11] Stewart R R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. Plant Physiol, 1980, 65(2): 245-248.
- [12] 盛良全,刘少民,宋增涛,等.烟草 CuZnSOD 同工酶分离纯化与鉴定[J].分析测试学报,2004,23(1):23-27.
- [13] 章艺,刘鹏,史锋,等.微高铁胁迫对大豆叶片体内保护系统及膜脂过氧化的影响[J].中国油料作物学报,2004,26(2):65-68.
- [14] 蔡妙珍,罗安程,林咸永,等. Ca^{2+} 对过量 Fe^{2+} 胁迫下水稻保护酶活性及膜脂过氧化的影响[J].作物学报,2003,29(3):447-451.
- [15] 彭诚,丁莉.硒对莖叶碎米芥 SOD 活性等生理特性的影响[J].安徽农业科学,2007,35(12):3502-3504.
- [16] 鲍思伟.叶面施锰对豌豆生物效应的影响[J].江西师范大学学报(自然科学版),2005,29(1):77-80.
- [17] 周国庆.几种微量元素配施对杂交早稻秧苗的效应[J].作物研究,2000(1):12-14.
- [18] 李涛,于贤昌.营养液 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度对低温胁迫下黄瓜幼苗叶片 SOD 活性的影响[J].中国农业科学,2008,41(3):772-778.
- [19] 黄玉山,罗广华.镉诱导植物的自由基过氧化损伤[J].植物学报,1997,39(6):522-526.
- [20] 强维亚,杨晖,陈拓,等.镉和增强紫外线-B 辐射复合作用对大豆生长的影响[J].应用生态学报,2004,15(4):697-700.
- [21] 强维亚,冯虎元.重金属镉(Cd)和增强 UV-B 辐射复合作用对大豆生长和生理代谢的影响[J].西北植物学报,2003,23(2):236-238.
- [22] 陈宏,徐秋曼,王葳,等.镉对小麦幼苗脂质过氧化和保护酶活性的影响[J].西北植物学报,2000,20(3):399-403.
- [23] 邹国林,裘名宜,朱彤.超氧化物歧化酶研究的历史、现状及应用前景[J].氨基酸杂志,1991,(3):28-32.
- [24] Boden N, Holmes M C, Knowles P F. Binding of water to "Types I and II" Cu^{2+} in proteins[J]. Biochim biophys Res Commun, 1974, 57(3), 845-848.
- [25] 张玉秀,柴团耀, Gerard Burkard.植物耐重金属机理研究进展[J].植物学报,1999,41(5):453-457.
- [26] 彭鸣,王焕校,吴玉树. Cd, Pb 诱导的玉米幼苗细胞超微结构的变化[J].中国环境科学,1991,11(6):426-431.
- [27] Van Assche F, Clijsters H. Effects of metal on enzyme activity in plants[J]. Plant Cell Environ, 1990, 13(3): 195-206.
- [28] Luna C M, Gonzalez C A, Trippi V S. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves[J]. Plant Cell Physiol, 1994, 35(1): 11-15.
- [29] 盛良全,郑晓云,童红武,等. Cu^{2+} 和铜锌超氧化物歧化酶作用的光谱学研究[J].化学学报,2005,63(18):1759-1764.
- [30] 邓家军,胡继伟,张勇,等.重金属离子对烟叶 SOD 活性的影响.湖北农业科学,2009,48(5):1171-1175.
- [31] 张治安,王振民,徐克章. Cd 胁迫对萌发大豆种子中活性氧代谢的影响[J].农业环境科学学报,2005,24(4):670-673.
- [32] Van Camp W, Van Montagu M, Inze D. H_2O_2 and NO: Redox signals and disease resistance[J]. Trends Plant Sci, 1998, 3(9): 330-334.
- [33] Di Giulio R T. Indices of oxidative stress as biomarkers for environmental contamination[J]. Aquat Toxicol Risk Assessment, 1991, 14: 15-31.
- [34] Xu N, Shi G X, Zeng X M, et al. Damage to primary structure and antioxidant enzymes in Lemna minor included by Hg^{2+} [J]. Acta Phytoecol Sin, 2003, 27(3): 299-303.