

铬对烟草中超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性及其同工酶的影响

宋 威¹, 张 芹², 李桂玲¹, 赵 敏¹

(1. 河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 河南省水产科学研究院, 河南 郑州 450044)

摘要: 利用不同质量浓度的 $K_2Cr_2O_7$ 溶液处理烟草种子, 对烟草幼苗的超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化物酶(POD)活力和同工酶进行研究。结果表明, 随着 Cr^{6+} 质量浓度的不断增加, 烟草幼苗中抗氧化酶的活性均呈现先升高而后降低的趋势。 Cr^{6+} 胁迫对SOD及POD活性的影响表现为低质量浓度促进, 高质量浓度抑制。在 Cr^{6+} 胁迫下, POD同工酶主要是表达量的变化, 在低质量浓度 Cr^{6+} 的诱导下, 酶的表达量增多, 当 Cr^{6+} 质量浓度较高时, 酶的表达量减少。SOD同工酶除了表达量的变化外, 还有酶带数目的变化。当 Cr^{6+} 质量浓度较低时, 同工酶表达被激活, 有新的酶带出现, 一部分酶分子表达量增多; 而当 Cr^{6+} 质量浓度较高时, 同工酶表达被抑制, 新的酶带消失, 酶分子的表达量减少。

关键词: 铬; 烟草; 萌发; 超氧化物歧化酶; 过氧化物酶

中图分类号: S572 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)07-0061-03

The Effects of Hexavalent Chromium on POD and SOD Enzyme Activities and Isozyme of Tobacco

SONG Wei¹, ZHANG Qin², LI Guiling¹, ZHAO Min¹

(1. School of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China

2. Henan Academy of Fishery Science, Zhengzhou 450044, China)

Abstract: The present study was conducted to analyze the change of enzyme activity and isoenzyme of SOD and POD in tobacco dealing with $K_2Cr_2O_7$ under different concentrations. The enzyme activities increased at the beginning and then decreased with the increasing of Cr^{6+} concentration. The enzyme activities could be promoted with low concentration of Cr^{6+} , and be inhibited with high concentration of Cr^{6+} . The expression level of POD isoenzyme increased, followed by decreased, under the chromium stress. The activity of SOD isoenzyme changed under the chromium stress, including the expression level and the band number. When the concentration of Cr^{6+} was low, new band appeared and the expression of isoenzyme was increased. When the concentration of Cr^{6+} was high, new band disappeared and the expression of isoenzyme was reduced.

Key words: Chromium; Tobacco; Germination; SOD; POD

Cr^{6+} 作为工业“五毒”之一, 是环境中一种具有潜在危害性的污染物, 其中 Cr^{6+} 因其氧化性和对皮肤的高渗透性, 是一种毒性很强的对人和动物致畸、致癌剂^[1]。重金属对植物的毒害主要表现在导致植物体内活性氧大量积累, 膜质过氧化产物大量增加,

导致膜结构的破坏。植物在长期进化过程中形成抗氧化酶保护系统, 在清除活性氧的过程中起重要作用, 从而使植物在一定程度上能耐、减缓或抵抗逆境胁迫。烟草是我国重要的经济作物之一, 也是重要的模式作物之一, 国内外已经有许多人开展了

Cr^{6+} 对植物生长发育的影响作用的研究工作, 但 Cr^{6+} 对烟草萌发种子中过氧化物酶活性影响的研究还不多。为此, 研究了烟草抗氧化酶在 Cr^{6+} 胁迫下的变化, 从而实现对 Cr^{6+} 污染的预测、评价和防治, 对于保证烟草产量、品质, 防止 Cr^{6+} 的危害及废弃物的处理有一定意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试烟草品种为豫烟 6 号。选取粒大、饱满、未萌发、不染霉菌的烟草种子。

1.2 试验方法

1.2.1 烟草种植方法和 Cr^{6+} 胁迫处理 用 5% 的双氧水消毒 5 min, 蒸馏水冲洗 3~4 次, 加蒸馏水超过种子最上层 2 cm 左右, 浸种 3 d。然后将烟草种子分散排列在铺有滤纸的培养皿中, 每皿 100 粒。加入不同质量浓度的 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液(1、2、4、6、8、9、10、12、14、16 mg/L) 各 5 mL, 对照用蒸馏水培养, 每个处理 3 次重复。置室温自然光照下发芽, 处理 15 d。每天补液, 保持滤纸湿润。

1.2.2 酶液的提取 培养 4 d 后, 取发芽烟草, 吸干水分, 称质量。置研钵中, 加入 1 mL 4℃预冷的磷酸缓冲液(pH 7.8)和少量石英砂研磨成匀浆后, 转入 5 mL 离心管中, 将离心管至 4℃冰箱中静置 10 min, 8000 r/min 离心 30 min, 上清液 4℃下保存备用^[2]。

1.2.3 酶活测定的方法 参照文献[3-4]进行测定。超氧化物歧化酶(SOD)活性采用 NBT 光化还原法测定, 以抑制 NBT 光化还原 50% 为 1 个酶活单位。过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法测定, 以每分钟 A470 变化 0.01 为 1 个 POD 活性单位。

1.2.4 同工酶测定方法 采用 PAGE 法, 分离胶质量浓度为 10%, 浓缩胶质量浓度为 4%, 在 80~100 V 稳压下电泳约 2 h。POD 采用联苯胺染色法测定, SOD 采用氮蓝四唑(NBT)法染色测定。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度 Cr^{6+} 处理后烟草 SOD 和 POD 活性的变化

在 Cr^{6+} 作用下, 烟草幼苗中 SOD 活性随质量浓度增加呈先升高而后降低的趋势(图 1)。添加低质量浓度的 Cr^{6+} 后, SOD 活性大于对照, 并且随着 Cr^{6+} 增加活性逐渐增加, 当 Cr^{6+} 为 8 mg/L 时酶活性达到峰值, 随后酶活性逐渐下降。 Cr^{6+} 质量浓度

大于 10 mg/L 时, 酶活性低于对照组。可以看出, Cr^{6+} 胁迫对 SOD 活性的影响表现为低质量浓度促进, 高质量浓度抑制。

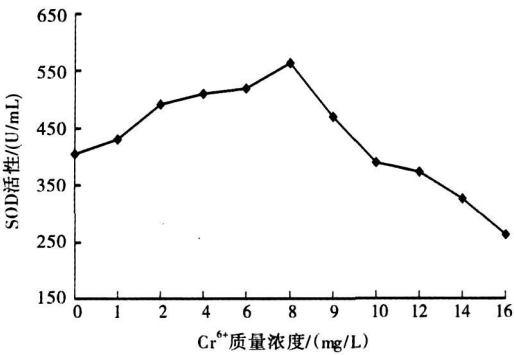


图 1 不同质量浓度 Cr^{6+} 对烤烟 SOD 活性的影响

从图 2 可以看出, 随着 Cr^{6+} 质量浓度的不断变化, 烟草幼苗叶片 POD 活性, 呈现出先升高而后降低的趋势, 从添加低质量浓度的 Cr^{6+} 离子开始, POD 活性逐渐增加, Cr^{6+} 质量浓度为 8 mg/L 时酶活达到峰值, 而后酶活逐渐下降, 当 Cr^{6+} 质量浓度大于 12 mg/L 时, 酶活低于对照水平。 Cr^{6+} 胁迫对 POD 活性的影响表现为低质量浓度促进, 高质量浓度抑制。

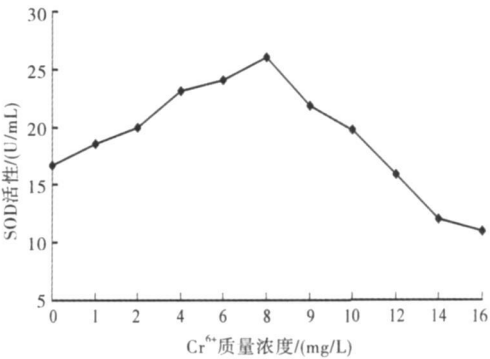
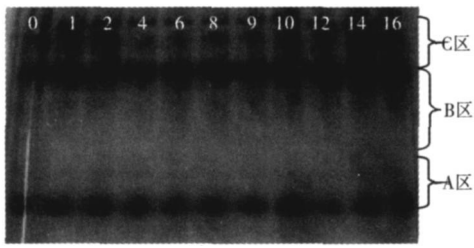


图 2 不同质量浓度 Cr^{6+} 对烤烟 POD 活性的影响

2.2 不同质量浓度 Cr^{6+} 处理后烟草 POD 和 SOD 同工酶的变化

从图 3 可以看出, A 区和 B 区都只有 1 条带, 在不同质量浓度 Cr^{6+} 组和对照组之间没有明显差异; C 区有 2 条带, 添加低质量浓度(1~2 mg/L)的 Cr^{6+} 后, 条带的颜色加深, Cr^{6+} 质量浓度继续增加, 在 4~9 mg/L 时条带的颜色变浅, 随着 Cr^{6+} 质量浓度的进一步加大, 10~16 mg/L 时, 条带的颜色比对照组和低浓度组的颜色更深。由此可知, 在 Cr^{6+} 胁迫下, POD 同工酶主要是表达量的变化。

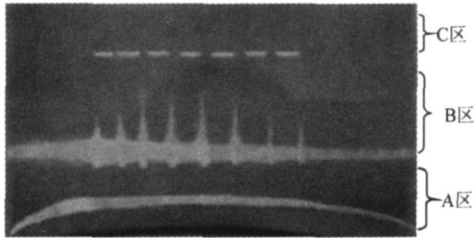
从图 4 可以看出, 在 A 区和 B 区各有 1 条带, 条带在对照组与处理组中都存在, 添加低质量浓度的 Cr^{6+} 后, 谱带逐渐变深变亮, 随着 Cr^{6+} 质量浓度



从左向右 Cr^{6+} 质量浓度依次为 0、1、2、4、6、8、9、10、12、14、16 mg/L

图3 不同质量浓度 Cr^{6+} 处理对烟草中 POD 同工酶活性的影响

的继续增加, 谱带逐渐变窄变暗, Cr^{6+} 质量浓度在 2~6 mg/L 时, 谱带的亮度最大, 宽度也最大; C 区对照组和 1 mg/L 处理组没有条带, 2~12 mg/L 处理组有 1 条明亮条带, 14~16 mg/L 处理组也没有该条带。在 Cr^{6+} 胁迫下, SOD 同工酶除表达量改变以外, 还有新的酶带出现。



从左向右 Cr^{6+} 质量浓度依次为 0、0、1、2、4、6、8、9、10、12、14、16、16 mg/L

图4 不同质量浓度 Cr^{6+} 处理对烟草中 SOD 同工酶活性的影响

3 讨论

植物在长期的系统进化过程中, 细胞内形成了防御活性氧、自由基毒害的保护机制。当烟草受到 Cr^{6+} 胁迫时, 细胞内启动了包括超氧化物歧化酶、过氧化物酶等的保护酶系统^[5-6]。 Cr^{6+} 对植物的毒害可使植物中的过氧化氢酶等的活性发生明显变化^[7]。本试验中, 在 Cr^{6+} 胁迫下, 随着 Cr^{6+} 质量浓度的增高, 抗氧化酶的活性出现先升后降的趋势。在低质量浓度的 Cr^{6+} 刺激下, 烟草体内活性氧大量增加, 促使细胞分泌更多的抗氧化酶, SOD 清除细胞超氧阴离子, 而 POD 则清除 SOD 分解产生的 H_2O_2 , 在酶的协同作用下清除体内过多的活性氧, 此时检测到的是酶活性的不断升高, 也就是低质量浓度的 Cr^{6+} 对 SOD 及 POD 活性有促进作用。当 Cr^{6+} 增加到一定范围后, 抗氧化酶的活性逐渐下降,

可能是 Cr^{6+} 胁迫下产生过量的活性氧自由基对酶蛋白的破坏所致。在高质量浓度 Cr^{6+} 胁迫下, 抗氧化物酶系(SOD、POD) 的活性很低^[8], 保护酶系统对活性氧的清除能力大大削弱, 已不能阻止自由基在细胞内的积累, 使膜脂发生氧化, 膜透性增加, 导致膜系统的伤害, 对植物生长产生抑制效应甚至毒害作用。

Cr^{6+} 胁迫下黑小麦及小麦幼苗和根内的 POD 及 SOD 同工酶谱带颜色深浅和条数均有变化^[9]。本研究中, SOD 及 POD 同工酶在 Cr^{6+} 胁迫下均发生不同程度的改变。POD 同工酶主要是表达量的变化, 在低质量浓度 Cr^{6+} 的诱导下, 酶分子的表达量增多, 当 Cr^{6+} 质量浓度较高时, 酶分子的表达量减少。SOD 同工酶除了表达量的变化外, 还有酶带数目的变化。当 Cr^{6+} 质量浓度较低时, 同工酶表达被激活, 有新的酶带出现, 一部分酶分子表达量增多; 而当 Cr^{6+} 质量浓度较高时, 同工酶表达被抑制, 新的酶带消失, 酶分子的表达量减少。

参考文献:

- [1] 寇琰, 于素芳. 六价铬化合物对肺细胞的毒作用表现[J]. 预防医学论坛, 2004, 10(6): 718-720.
- [2] 刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 223-232.
- [3] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1990.
- [4] 李仕飞, 刘世同, 周建平, 等. 分光光度法测定植物过氧化氢酶活性的研究[J]. 安徽农学通报, 2007, 21(2): 364-366.
- [5] 白永富, 焦芳婵, 卢秀萍, 等. 烟草种子萌发过程中呼吸强度与过氧化物酶活性变化研究[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(5): 672-675.
- [6] Marcel Zamocky, Franz Koller. Understanding the structure and function of catalase: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis[J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2008, 72: 59-66.
- [7] 赵晖, 吕金印. Cr^{6+} 对高丹草幼苗生理特性与根尖细胞有丝分裂的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(4): 761-765.
- [8] Cervantes C, Garcia J C, Devars S, et al. Interactions of chromium with micro-organisms and plants[J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 25: 335-347.
- [9] 马文丽, 韩棋. 镉胁迫对黑小麦 POD 及 SOD 同工酶的影响[J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2009, 9(10): 414-417.