

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620141152461

UDC\_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

水稻 *OsOT* 基因的功能研究

Functional Analysis of rice *OsOT*

張 檀

指导教师姓名: 陈亮教授

专业名称: 微生物学

论文提交时间: 2017 年 5 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 6 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2017 年 5 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 目录

摘要.....	1
Abstract.....	3
缩略词.....	5
第一章 前言 .....	6
1.1 氧化还原酶研究进展 .....	6
1.2 植物抗氧化作用机制 .....	7
1.2.1 活性氧的来源.....	8
1.2.2 活性氧的生物学效应.....	10
1.2.3 植物抗氧化系统.....	11
1.3 mRNA 选择性剪接概述 .....	17
1.4 本研究的目的和意义 .....	19
第二章 材料与方法 .....	21
2.1 实验材料 .....	21
2.1.1 水稻材料.....	21
2.1.2 质粒和菌株.....	21
2.1.3 主要试剂和仪器.....	22
2.1.4 常用溶液.....	24
2.1.5 常用培养基.....	24
2.2 实验方法 .....	26
2.2.1 生物信息学分析.....	26
2.2.2 实验所用引物及构建的质粒图谱.....	26
2.2.3 常用实验技术.....	29
2.2.4 遗传表达载体的构建.....	36
2.2.5 水稻材料的生长.....	40
2.2.6 水稻遗传转化.....	41
2.2.7 转基因水稻的鉴定.....	42
2.2.8 GUS 组织化学分析.....	42
2.2.9 亚细胞定位分析.....	43
2.2.10 转基因水稻抗氧化酶活性检测.....	45
2.2.11 抗氧化酶同工酶基因的检测.....	47

2.2.12 OsOT.1 蛋白酵母实验 .....	47
<b>第三章 结果与分析 .....</b>	<b>49</b>
3.1 水稻中的 <i>OsOT</i> 基因及其编码的蛋白序列分析 .....	49
3.2 <i>OsOT</i> 基因表达模式分析 .....	53
3.2.1 组织定位载体的构建 .....	53
3.2.2 组织定位转基因水稻的鉴定 .....	54
3.2.3 qRT-PCR 分析 <i>OsOT</i> 基因组织表达模式 .....	55
3.2.4 <i>OsOT</i> 基因组织表达模式分析 .....	55
3.3 <i>OsOT</i> 蛋白亚细胞定位分析 .....	56
3.3.1 亚细胞定位表达载体的构建 .....	56
3.3.2 <i>OsOT</i> 蛋白的亚细胞定位 .....	57
3.4 CRISPR/Cas9 基因编辑分析 .....	58
3.4.1 CRISPR/Cas9 基因编辑载体的构建 .....	58
3.4.2 CRISPR/Cas9 转基因植株的鉴定 .....	60
3.4.3 CRISPR/Cas9 转基因水稻的突变类型分析 .....	60
3.5 <i>OsOT</i> 基因在水稻氧化胁迫中的功能探究 .....	63
3.5.1 <i>OsOT</i> 基因超量表达载体的构建 .....	63
3.5.2 <i>OsOT</i> 基因超量表达转基因水稻的鉴定 .....	64
3.5.3 qRT-PCR 检测超量表达转基因水稻中 <i>OsOT</i> 基因的表达水平 .....	64
3.5.4 <i>OsOT</i> 转基因水稻中抗氧化酶活性分析 .....	65
3.5.5 <i>OsOT</i> 转基因水稻中活性氧清除相关基因的表达分析 .....	66
3.6 <i>OsOT.1</i> 蛋白酵母杂交实验 .....	68
3.6.1 <i>OsOT.1</i> 蛋白 BD 载体的构建 .....	68
3.6.2 <i>OsOT.1</i> 蛋白自激活分析 .....	69
3.6.3 <i>OsOT.1</i> 蛋白酵母杂交实验 .....	70
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>71</b>
4.1 <i>OsOT</i> 蛋白的组织定位 .....	71
4.2 <i>OsOT</i> 基因在水稻氧化胁迫调控中的作用 .....	71
<b>第五章 总结与展望 .....</b>	<b>74</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>75</b>
<b>附录 .....</b>	<b>82</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>84</b>

## Contents

<b>Abstract( In Chinese )</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract( In English )</b> .....	<b>3</b>
<b>Abbreviations</b> .....	<b>5</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Research overview of oxidoreductase</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 The mechanism of plant antioxidant system</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 The sources of ROS .....	8
1.2.2 The biological effect of ROS .....	10
1.2.3 Plant antioxidant system .....	11
<b>1.3 Overview of mRNA alternative splicing</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4 The purpose and significance of the research</b> .....	<b>19</b>
<b>Chapter 2 Materials and methods</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 Materials</b> .....	<b>21</b>
2.1.1 Rice materials.....	21
2.1.2 Vectors and strains .....	21
2.1.3 Reagents and apparatus.....	22
2.1.4 Solution.....	24
2.1.5 Medium.....	24
<b>2.2 Methods</b> .....	<b>26</b>
2.2.1 Bioinformatics analysis.....	26
2.2.2 Primers and plasmid profiles .....	26
2.2.3 General techniques of molecular cloning .....	29
2.2.4 Vector construction .....	36
2.2.5 Rice culture .....	40
2.2.6 Rice genetic transformation .....	40
2.2.7 Identification of transgenic rice .....	42
2.2.8 GUS histochemical analysis .....	42
2.2.9 Subcellular localization analysis.....	42
2.2.10 Antioxidases activity test in transgenic rice.....	45
2.2.11 Analysis of ROS scavenging related genes.....	47
2.2.12 OsOT.1 yeast assay .....	47
<b>Chapter 3 Results and analysis</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1 Characteristics and sequence analysis of <i>OsOT</i> and its coding sequence</b> .....	<b>49</b>

<b>3.2 Analysis of <i>OsOT</i> gene expression pattern.....</b>	<b>53</b>
3.2.1 Vector construction for tissue expression .....	53
3.2.2 Identification of tissue expression transgenic rice .....	54
3.2.3 Identification of <i>OsOT</i> gene expression levels in rice by qRT-PCR.....	55
3.2.4 Analysis of <i>OsOT</i> gene expression pattern .....	55
<b>3.3 Analysis of OsOT protein subcellular localization.....</b>	<b>56</b>
3.3.1 Vector construction for subcellular localization .....	56
3.3.2 OsOT protein subcellular localization .....	57
<b>3.4 Analysis of CRISPR/Cas9 for <i>OsOT</i> gene.....</b>	<b>58</b>
3.4.1 Vector construction for CRISPR/Cas9 .....	58
3.4.2 Identification of <i>OsOT</i> CRISPR/Cas9 transgenic rice.....	60
3.4.3 Analysis of mutant types in CRISPR/Cas9 transgenic rice .....	60
<b>3.5 Functional research of <i>OsOT</i> gene in rice antioxidative system .....</b>	<b>63</b>
3.5.1 Vector construction for over-expressing .....	63
3.5.2 Identification of <i>OsOT</i> over-expressing transgenic rice .....	64
3.5.3 Identification of <i>OsOT</i> gene expression levels in transgenic rice by qRT-PCR .....	64
3.5.4 Analysis of antioxidase activity in <i>OsOT</i> gene transgenic rice.....	65
3.5.5 Analysis of ROS scavenging related genes expression levels in <i>OsOT</i> gene transgenic rice .....	66
<b>3.6 OsOT.1 protein in yeast assay .....</b>	<b>68</b>
3.6.1 BD vector construction for OsOT.1 protein.....	68
3.6.2 Analysis of OsOT.1 protein activation validation.....	69
3.6.3 Yeast hybrid assay of OsOT.1 protein.....	70
<b>Chapter 4 Discussion .....</b>	<b>71</b>
4.1 Tissue localization of OsOT protein .....	71
4.2 Functions analysis of OsOT gene in rice antioxidative system .....	71
<b>Chapter 5 Summary and prospect .....</b>	<b>74</b>
<b>Reference.....</b>	<b>75</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>82</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>84</b>

## 摘要

为了维持正常的生长发育，植物体内时刻都在进行氧化还原反应，包括光合作用、氧化代谢以及糖类、脂质和蛋白质的合成等。由于是固着生物，植物无法通过自身的移动避免外界伤害与胁迫，因此便进化出了由多种氧化还原电子对和氧化还原酶组成的复杂氧化还原网络来适应环境变化。活性氧（ROS）是氧化还原网络中首要的信号分子，细胞中 ROS 积累会造成氧化胁迫，破坏氧化还原稳态，从而影响细胞的正常生理功能甚至导致细胞死亡。因此，分离和鉴定氧化还原酶基因并研究其功能、探究其在氧化还原网络所处的地位具有重要意义。

RGAP 水稻数据库信息显示，*OsOT* 基因编码一种氧化还原酶，包括 4 种可变剪接体 *OsOT.1-OsOT.4*，在本实验中扩增出了新的一种可变剪接体，将其命名为 *OsOT.5*。利用 InterproScan 在线工具对这 5 种可变剪接体编码的蛋白进行结构域预测，发现均包含一段 Non-haem dioxygenase N-terminal 区域、部分 2-OG Fe(II) dioxygenase 结构域以及一段 Isopenicillin N synthase-like 结构域。

本实验构建了 *OsOT.1* 和 *OsOT.5* 两种可变剪接体的亚细胞定位载体，PEG 介导的水稻原生质体瞬时转化实验显示，*OsOT.1* 和 *OsOT.5* 两种蛋白分布在原生质体细胞质中，在细胞核中可能也有分布。利用转基因技术获得了 *OsOT* 基因组织定位转基因植株，GUS 染色结果表明 *OsOT* 基因仅在水稻一叶期的地上部分、幼胚、胚芽、茎和颖壳中有所表达，而且在不同发育时期的颖壳中表达量存在差异。基因芯片数据显示 *OsOT* 基因在水稻不同生长时期表达量均不高，在各组织器官中的表达量也较低，仅在胚芽鞘、胚以及茎间表达量较高，这与 GUS 染色结果较为一致，然而与 *OsOT* 基因的组织表达谱（qRT-PCR）存在差异。

此外，还利用转基因技术获得了 *OsOT* 基因 CRISPR/Cas9 植株，以及 *OsOT.1* 超量表达植株。选取 5 株 CRISPR/Cas9 植株并对其中 *OsOT* 的突变情况进行分析，结果显示 5 株水稻中目的基因均发生突变，突变类型包括碱基的插入、置换和染色体片段缺失，造成了移码突变；在蛋白结构上造成的影响包括氨基酸的缺失和结构域的截短。

对野生型水稻植株、*OsOT.1* 超量表达植株以及 CRISPR/Cas9 植株叶片中 SOD、CAT 和 POD 三种抗氧化酶的活性进行检测。总体而言，SOD、POD 和



CAT 的活性在超量表达植株中与野生型植株并无明显差异，在 CRISPR/Cas9 植株中存在上调的情况，且上调水平存在个体差异性，说明 *OsOT* 基因的缺失，可能对水稻造成了一定程度的氧化胁迫，从而使抗氧化酶活性升高。选取相同水稻材料，对参与清除 ROS 的 8 种抗氧化酶同工酶基因表达水平进行 qRT-PCR 检测，结果发现 *OsAPX3* 在两种转基因植株中表达水平均低于野生型中的水平；*OsAPX4* 在三种植株中表达水平无明显规律；*OsCSD3* 在超量表达植株中的表达量低于野生型植株，但在不同的 CRISPR/Cas9 植株中表达存在差异；除了 OE-7 植株，3 种 CAT 同工酶基因在其余 7 株转基因植株中的表达量不变或低于野生型植株，且 *OsCATA* 在 Cas9 植株中的表达水平下调程度低于超量表达植株；*OsGPX1* 在除 OE-7 外的水稻中的表达水平均低于野生型植株，*OsGPX4* 在 3 种植株中的表达无明显规律。

综上所述，*OsOT* 基因可以对水稻氧化还原稳态作用的维持起到一定作用，其表达可能存在时空特异性，具体机制仍有待于进一步的研究。

**关键词：**水稻；*OsOT*；氧化还原酶；可变剪接体

## Abstract

In order to maintain normal growth condition and development, redox reactions including photosynthesis, oxidative metabolism and biosynthesis of carbohydrate, lipid and protein happen all the time in plant cells. To avoid external damage and stress, the plant has developed an intricate network comprised of a variety of redox couples and redox enzymes since the sessile organism cannot move freely. Reactive oxygen species (ROS) are the primary signal molecules in redox network. Because an accumulation of ROS in cells can lead to oxidative stress and the redox homeostasis will be disturbed which can result in defective physiological function or even uncontrolled cell death. Therefore, it is important to isolate and identify oxidoreductase genes and to study their functions in redox network.

RGAP database shows that *OsOT* gene encodes a oxidoreductase, including four alternative splicings named from *OsOT.1* to *OsOT.4* respectively. In this experiment, a new alternative splicing was identified which was named *OsOT.5*. Using the InterProScan online tool to predict the proteins encoded by these five alternative splicings, it was found that they both had the N-terminal region of a non-haem dioxygenase, part of the 2-OG Fe(II) dependent dioxygenase domain as well as an Isopenicillin N synthase-like domain.

In this study, we constructed the subcellular localization vector of *OsOT.1* and *OsOT.5* respectively, the results of PEG-mediated protoplast transient transformation showed that both *OsOT.1* and *OsOT.5* proteins distributed in cytoplasm of rice protoplasts, and maybe the nucleus as well. Genevestigator database shows that the expression level of *OsOT* is not high in different stages, different tissues and organs in rice. Besides, we obtained *OsOT*pro::*GUS* transgenic plants whose GUS staining results indicated *OsOT* is mainly expressed in coleoptile, embryo, internode and blade, which were consistent with the database analysis but not the result of qRT-PCR.

Moreover, we obtained *OsOT.1* over-expressing transgenic plants and CRISPR/Cas9 transgenic plants by genetic transformation. Five CRISPR/Cas9 transgenic plants were chosen to be sequenced and they all mutated but in different

ways. The mutation types included base insertions, substitutions, and chromosome fragment deletions, which resulted in one amino acid deletion, and truncation of OsOT protein.

The activity of SOD, CAT and POD in leaves were detected in wild-type (*Nipponbare*), *OsOT.1* over-expressing plants and CRISPR/Cas9 plants. The results showed that SOD, POD and CAT activity in CRISPR/Cas9 plants increased differentially, while there was no significant change in *OsOT.1* over-expressing plants. It is suggested that the knockout of *OsOT* could induce a certain degree of oxidative stress to rice which increased the activities of antioxidases.

qRT-PCR assay of 8 ROS scavenging related genes showed that the expression of *OsAPX3* in two transgenic plants was lower than that in wild plant, and the expression level of *OsAPX4* in three types of plants behaved irregularly. The expression level of *OsCSD3* in over-expressing plants was lower than that in wild plants but varied in different CRISPR/Cas9 plants. In general, the expression of three *OsCAT* homologues in all transgenic plants except OE-7 was lower than or the same as that of wild plant. What's more, the expression level of *OsCATA* in CRISPR/Cas9 plants was higher than that of over-expressing plants. The expression of *OsGPX1* in all transgenic plants except OE-7 was lower than that of wild plant, and the expression level of *OsAPX4* in three types of plants behaved irregularly.

In conclusion, the expression of *OsOT* gene may be temporal/spatial-specific and may play a role in the maintenance of rice redox homeostasis, but the concrete and detailed mechanism remains to be further studied.

**Keywords:** rice; *OsOT*; oxidoreductase; alternative splicing

## 缩略词

缩略词	英文名称	中文名称
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
POD	Peroxidase	过氧化物酶
APX	Ascorbic acid oxidase	抗坏血酸过氧化物酶
GPX	Glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
CAT	Catalase	过氧化氢酶
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GUS	$\beta$ -Glucuronidase	葡萄糖苷酸酶
qRT-PCR	Real-time quantitative RT-PCR	实时荧光定量 RT-PCR
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
Hyg	Hygromycin	潮霉素抗性基因
Cef	cefotaxime Sodium	头孢霉素
Carb	carbenicillin	羧苄青霉素钠
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide	十六烷基三甲基溴化胺
pfam	Protein family	蛋白家族
2-OG	2-oxoglutarate	2-氧化戊二酸
DAB	3,3'-diaminobenzidine	二氨基联苯氨
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
CDS	Coding DNA sequence	DNA 编码区
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇

## 第一章 前言

### 1.1 氧化还原酶研究进展

植物体内每时每刻都在进行各种各样的氧化还原反应，包括光合作用、氧化代谢以及糖类、脂类和蛋白质的合成等。自然环境中或多或少存在着各种逆境胁迫，但作为固着生物，植物无法通过移动避免外界伤害与胁迫，为了适应外界环境的变化，并及时采取措施来维持自身的生长与发育，植物进化出了复杂的氧化还原调控网络。

氧化还原网络是由众多氧化还原电子对和抗氧化酶共同参与作用，维护细胞氧化还原平衡所形成的复杂调控网络<sup>[1]</sup>。ROS 是氧化还原网络中首要的信号分子，它的过度积累会造成氧化胁迫。正常情况下氧化电势被严格维持在一定范围内，一旦调节网络被破坏，氧化还原平衡就被打破，从而转向更高的氧化状态。此外，细胞中高强度的还原状态也会造成还原胁迫。所以，不论是氧化态还是还原态的异常，都会使细胞氧化还原稳态遭受破坏，从而影响细胞的正常生理功能甚至导致细胞死亡<sup>[2,3]</sup>。因此，植物细胞氧化还原稳态的维持对植物正常生长发育和代谢至关重要，对氧化还原网络调控氧化还原平衡的机制进行研究也显得尤为必要。

氧化还原酶属于国际酶学委员会 (IEC, International Electrotechnical Commission) 所分六大酶类中的一类，催化生物体内底物的氧化或还原，反应需要电子供体或受体，有时还需要辅酶。根据习惯分类法，可将氧化还原酶分为四个亚类<sup>[4]</sup>：

#### 1. 脱氢酶 催化： $RH+R'\rightleftharpoons R+R'H$

大部分脱氢酶需要还原型辅酶 I (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD(H)) 和还原型辅酶 II (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP(H)) 作为辅因子。不同脱氢酶对其专一性要求不同，NAD(H) 一般作为参与分解代谢的脱氢酶的辅酶，而 NADP(H) 则作为参与合成代谢的脱氢酶的辅酶。

#### 2. 氧化酶 催化： $RH+O_2\rightleftharpoons R+H_2O_2$ or $H_2O$

根据催化得到底物的不同，可将氧化酶分为两类。第一类氧化酶以黄素核苷酸 (flavin mononucleotide, FMN) 或黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine

dinucleotide, FAD) 为辅因子, 催化得到的产物之一为  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。由于酶蛋白和辅因子结合比较紧密, 故氧化酶有时又被称为黄素蛋白, 葡萄糖氧化酶即属于此类。第二类氧化酶催化得到的产物之一是  $\text{H}_2\text{O}$  而非  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 包括两种类型, 一类为金属蛋白, 如含铜离子的抗坏血酸氧化酶; 另一类为细胞色素氧化酶, 以血红素为辅因子, 与脱氢酶和电子传递体等组成呼吸链, 在生物氧化和氧化磷酸化等生物过程中起到重要的作用。

### 3. 过氧化物酶类

此类酶催化以  $\text{H}_2\text{O}_2$  为氧化剂的氧化还原反应, 存在于高等生物的过氧化物酶体中。其中包括以血红素为辅因子的过氧化物酶和过氧化氢酶, 以 FAD 为辅因子的 NAD(P)H 过氧化物酶, 以硒为辅因子的部分谷胱甘肽过氧化物酶, 以及以金属离子为辅基的超氧化物歧化酶。以上提到的几种酶类对细胞氧化还原平衡的维持和正常生理功能的行使起到关键作用, 后面会进一步探讨和说明。

### 4. 氧合酶

和氧化酶不同, 氧合酶催化氧原子直接渗入有机分子。酶委员会根据反应系统中氢供体的数目将其分为两个“亚亚类”, 每个亚亚类中又可以根据氧原子渗入的个数进一步分类。

除了以上 4 类主要的氧化还原酶外, 还有一类被称为“中间电子传递体”(electron transfer or transport system) 的物质, 通过自身的氧化还原将脱氢酶和氧化酶连接起来组成呼吸链, 在生物氧化和氧化磷酸化中起到重要作用。铁硫蛋白、细胞色素 b 和细胞色素 c, 以及辅酶 Q 等属于此类<sup>[4]</sup>。

## 1.2 植物抗氧化作用机制

氧气作为重要的无机分子, 对植物维持正常生命活动和能量代谢不可或缺, 但是在反应过程中会生成一些副产物, 包括分子氧受到激发形成的单线态氧以及在各种氧化还原反应中接收电子形成的活性氧中间物, 如羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ )、过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 和超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 等, 人们将其统称为活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) <sup>[5,6,7]</sup>。这些代谢副产物具有极强的氧化能力, 会对各种细胞组分造成氧化伤害。植物在正常生理代谢的情况下, 各种活性氧分子含量很低, 而且可以通过抗氧化系统维持在一个相对恒定的水平。如在叶绿体中,  $\text{H}_2\text{O}_2$  的

含量通常被维持在  $0.5\mu\text{M}$  左右，但在逆境胁迫的情况下， $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度可上升至  $10\text{-}15\mu\text{M}$  左右<sup>[8]</sup>。高温、高盐、紫外损伤、病原菌感染等多种生物以及非生物逆境均会导致植物体内产生大量活性氧，造成氧化损伤<sup>[6,9,10,11]</sup>。但除此之外，活性氧可以作为信号分子，参与植物响应逆境胁迫信号调控<sup>[11,12]</sup>。

### 1.2.1 活性氧的来源

植物在正常的生理代谢过程中，氧气分子接收电子或者受到光能激发后，以及在一些酶促反应中，都会生成 ROS。在植物体内，产生 ROS 的主要细胞器包括叶绿体的光反应中心、线粒体、过氧化物酶体等<sup>[13-16]</sup>。

叶绿体 (chloroplast) 是光合作用的场所，类囊体上的光反应中心 PS I 和 PS II 是 ROS 的主要产生位点。早在 1951 年，Mehler 在研究叶绿体中光反应机理时发现在 PS I 中， $\text{O}_2$  被还原为  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[17]</sup>。Asada 在 1974 年进一步发现， $\text{O}_2$  的第一个还原产物是  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ， $\text{O}_2^{\cdot-}$  通过歧化反应生成  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2$ <sup>[18]</sup>，在  $\text{Fe}^{2+}$  或  $\text{Cu}^{2+}$  的存在下，还可以催化  $\text{O}_2^{\cdot-}$  与  $\text{H}_2\text{O}_2$  发生 Haber-Weiss/Fenton 反应产生  $\cdot\text{OH}$ <sup>[19]</sup>；在 PS II 中，处于基态的  $\text{O}_2$  在受到激发光的刺激后，被叶绿素反应中心 P680 激活成单线态氧<sup>[14,18]</sup>。

线粒体 (mitochondrion) 是呼吸作用的主要场所，在代谢的过程中也可以产生 ROS。最早描述线粒体呼吸链产生 ROS 的报道始于 1966 年，随后 Chance 等发现离体的线粒体可以产生  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[20,21]</sup>。多年的研究逐步揭示了线粒体中 ROS 的产生途径。电子在线粒体电子传递链 (ETC) 传递的过程中，酶复合体 I (NADH 脱氢酶) 和复合体 III (泛醌-细胞色素) 均可以将  $\text{O}_2$  还原为  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，而后者可以通过线粒体膜间隙和线粒体基质中的铜锌超氧化物歧化酶和锰超氧化物歧化酶歧化为  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。 $\text{H}_2\text{O}_2$  可以被线粒体中的过氧化氢酶催化分解为  $\text{H}_2\text{O}$  或者通过谷胱甘肽过氧化物酶等过氧化物酶类的催化还原为  $\text{H}_2\text{O}$ <sup>[22,23,24]</sup>，亦或者通过 Fenton 反应生成活跃的  $\cdot\text{OH}$ 。

过氧化物酶体 (peroxisome) 是一种广泛存在于真核生物细胞中的亚细胞器，由单层膜包被，含有丰富的代谢酶类，参与多种生理生化反应，也是产生 ROS 的重要细胞器。产生的 ROS 包括过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、超氧阴离子 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 和单线态氧 ( $^1\text{O}_2$ )。1966 年，De Duve 等人首次对一种过氧化物酶体中

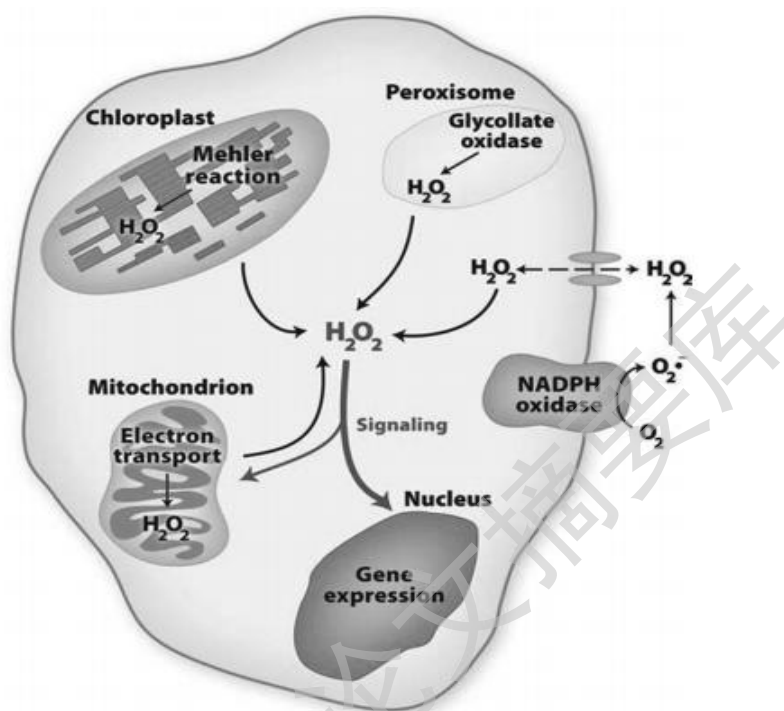
图 1-1: 植物细胞中 ROS 产生的示意图<sup>[25]</sup>

Figure 1-1: Diagram of ROS production in plant cell

的呼吸作用途径进行了描述<sup>[26]</sup>，在该途径中， $O_2$  得到代谢物质的电子，歧化生成  $H_2O_2$ ，随后  $H_2O_2$  被进一步还原为  $H_2O$ 。 $H_2O_2$  的产生涉及多种代谢途径，包括光呼吸循环中乙醇酸氧化酶对乙醇酸的催化，脂肪酸的  $\beta$  氧化，以及氨基酸代谢等<sup>[27]</sup>。 $O_2^-$  可以通过过氧化物酶体膜上的还原型辅酶 I 或还原型辅酶 II 催化产生，在过氧化物酶体基质中黄嘌呤氧化酶催化黄嘌呤转化为尿酸的过程也可以产生<sup>[28]</sup>；过氧化物酶体中的血红素、非血红素含铁蛋白及抗坏血酸盐可以通过 Fenton 反应产生  $\cdot OH$ ；此外，Mor 等利用荧光探针传感器发现 Fenton 反应也可以产生单线态氧<sup>[29]</sup>。

除此之外，细胞质膜上的 NADPH 氧化酶和醌氧化酶、内质网中依赖于 NAD(P)H 的电子传递过程及定位于细胞壁的某些酶类也可以通过特定的化学反应催化生成 ROS<sup>[30,31,32]</sup>。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库