

植物抗坏血酸过氧化物酶的作用机制、酶学及分子特性

孙卫红 王伟青* 孟庆伟**

山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018

Functional Mechanism and Enzymatic and Molecular Characteristic of Ascorbate Peroxidase in Plants

SUN Wei-Hong, WANG Wei-Qing*, MENG Qing-Wei**

College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018

摘要 介绍叶绿体中 H_2O_2 的产生和清除, 抗坏血酸过氧化物酶(APX)的酶学和分子特性, APX 同工酶在植物体内的分布和功能及其相互之间的区别, APX 与细胞色素 C 过氧化物酶(CPX)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)等一些在不同生物中的 H_2O_2 清除酶的异同之处, 以及有关 APX 基因工程的研究进展。

关键词 抗坏血酸过氧化物酶(APX); H_2O_2 ; 清除; 叶绿体

过氧化氢 (H_2O_2) 是一种活性氧, 若不及时清除, 它会通过金属催化的 Haber-Weiss 反应生成高度活泼的羟基自由基 ($\cdot OH$)。·OH 能氧化几乎所有的细胞组分, 并引起细胞的破坏^[1]。因此, 对所有的好氧生化过程, 及时清除 H_2O_2 和有机过氧化氢物质对于维持植物正常的生理功能很重要。抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX) 是利用抗坏血酸 (ascorbic acid, AsA) 为电子供体的 H_2O_2 的清除剂。在细胞内它的同工酶定位于 4 个不同的区域: 叶绿体中的基质 APX (sAPX)、类囊体膜 APX (tAPX)、微体 APX (mbAPX) 和胞质 APX (cAPX)。目前, 有多种植物的 APX 基因已克隆并应用于提高植物的抗逆性。

1 叶绿体中 H_2O_2 的产生和清除及 APX 的作用机制

H_2O_2 是叶绿体中光合电子传递和某些酶学反应的天然产物及对植物具有毒害作用的一种活性氧。活性氧是需氧生物正常代谢的产物, 已知在逆境伤害、机体损伤、细胞分裂、酶反应等方面都可能涉及到活性氧的作用。活性氧可与 DNA、类脂化合物和蛋白质反应, 引起细胞损伤。在植物组织中, 活性氧类型主要有 H_2O_2 、·OH、单线态氧 (1O_2) 等。 H_2O_2 的伤害机制, 一方面与其本身的毒害有关, 如它可以抑制 Calvin 循环中的酶, 降低叶绿体中的 AsA 含量, 氧化铁氧还素^[2]。 H_2O_2 的累积可以促进叶绿素的降解, 其原因可能是由于高水平的 H_2O_2 诱导酚特异性过氧化物酶 (PPOD) 的从头合成, 而 PPOD 使酚氧化形

成酚自由基从而攻击叶绿素^[3]所致。另一方面, H_2O_2 与超氧阴离子自由基 (O_2^-) 相互反应形成致命的 ·OH。已证明 ·OH 是活性最强的活性氧, 它可以直接引发脂质过氧化^[4], 严重时导致植物细胞死亡。

一般认为, 叶绿体中双氧分子的光还原产物是 H_2O_2 , 它由定位在基质中的铜锌-超氧化物歧化酶 (CuZn-SOD) 催化的 O_2^- 的歧化反应产生^[5]:



在光照下的叶绿体中, 双氧分子是由光系统 I (PSI) (反应中心 X 和/或反应中心 A/B) 还原侧电子载体和铁氧还蛋白还原而成的^[6], 其光还原速率 [$15 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}(\text{chl}) \cdot \text{h}^{-1}$] 仅是饱和光下由 CO_2 的同化速率所观察到的电子传递速率的 10%, 其原因尚不清楚^[7]。 H_2O_2 攻击的主要目标是果糖-1, 6-二磷酸酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶和 5-磷酸核酮糖激酶, 因此及时清除 H_2O_2 对于维持叶绿体的光合能力是必要的^[1]。

植物叶绿体和胞质中, 一个主要的 H_2O_2 清除系统称为抗坏血酸-谷胱甘肽 (AsA-GSH) 循环, 其中 APX 是关键酶^[8]。叶肉细胞的过氧化物酶体

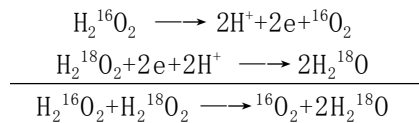
收稿 2004-12-06 修定 2005-01-04

资助 国家重点基础研究发展规划 (G1998010100) 和国家自然科学基金 (30370854)。

* 现在青岛中国海洋大学就读博士学位。

** 通讯作者 (E-mail: qwmeng@sdau.edu.cn, Tel: 0538-8249606)。

内广泛分布着过氧化氢酶(catalase, CAT),但在叶绿体中尚未发现CAT的存在,也未发现清除 H_2O_2 的GSH、细胞色素c或吡啶核苷酸,而且APX对 H_2O_2 有更高的亲和力^[9],故认为叶绿体中的 H_2O_2 是由APX清除的。例如, $H_2^{18}O_2$ 及 $^{18}O_2$ 的实验证明,添加 $H_2^{18}O_2$ 后,照光的菠菜叶绿体释放的是 $^{16}O_2$ 而不是 $^{18}O_2$,由于叶绿体中不存在CAT,故认为 $H_2^{18}O_2$ 是由APX分解的^[10]。



当无 CO_2 而提供 $^{18}O_2$ 时,照光的完整叶绿体能以相同速率吸收 $^{18}O_2$,释放 $^{16}O_2$,没有 $H_2^{18}O_2$ 积累,表明叶绿体产生的内源 H_2O_2 也是通过APX分解的。 H_2O_2 从叶绿体扩散到过氧化物酶体后由CAT清除是不可能的,因为叶绿体中 H_2O_2 的清除是利用类囊体中产生的光化还原剂作为电子供体的^[2,10]。Foyer和Hailiwell^[11]首先确认此种过氧化物酶催化反应的电子供体是AsA。APX催化AsA与 H_2O_2 反应而使 H_2O_2 分解:

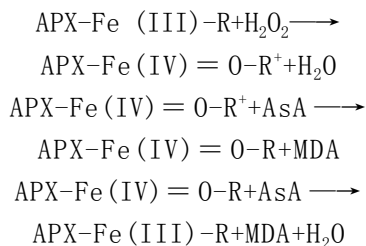


只要AsA能够再生,APX就能充分进行催化反应,从而保护叶绿体维持正常的光合能力。

2 APX的反应机制

Foyer和Hailiwell^[11]于1976年发现了以AsA为电子供体的一种过氧化物酶,1981年Nakano和Asada^[2]正式确定此酶为APX,存在于叶绿体的基质中。

2.1 APX的反应机制 APX的催化循环属于过氧化物酶的乒乓机制,反应如下^[12](R表示卟啉或保守Trp残基,MDA为单脱氢抗坏血酸):

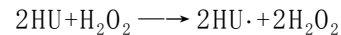


APX首先被 H_2O_2 氧化成中间复合物,此种中间复合物接着氧化抗坏血酸双电子氧化物形成2个分子的MDA。当AsA未为复合物利用时,APX失活。

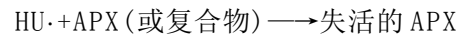
2.2 抑制剂及抗坏血酸的作用 APX作为一种血红

蛋白,通过与血红素铁的连接作用而受氰化物或叠氮化物抑制。巯基试剂也能通过阻断 H_2O_2 与血红素的氧化作用而使APX失活。

APX还有更多的特异性抑制剂,如巯基、双胺苯、羟基脲和羟胺。这些化合物本身并不能抑制APX,但在 H_2O_2 存在时,它们则使APX失活。例如,由APX催化的羟脲(HU)能被 H_2O_2 氧化形成它的氨基离子(HU·),尽管它的反应速度与抗坏血酸相比并不高。



反应中心形成的HU·能与APX或中间复合物发生反应,从而使APX失活。



当AsA存在时,HU·的酶促产物与AsA竞争,HU·被AsA产生的MDA所捕捉。通过这个机制,AsA保护了由自杀性抑制剂引起的APX的失活^[13]。AsA的浓度低于 $20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,APX即失活,这主要是由中间复合物的降解引起的。AsA未被中间复合物利用时,APX的血红素就会被 H_2O_2 分解掉,从而使APX失活。tAPX和sAPX的半寿期约是20s,而cAPX的半寿期约是10min,所以叶绿体APX非常不稳定^[9],这也是APX不像谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)那样容易被发现的原因之一。

AsA可直接与活性氧反应而将其还原,又可作为酶的底物在活性氧的清除过程中起作用,即在叶绿体类囊体表面作为还原剂参与APX介导的 H_2O_2 的清除。在这一过程中,AsA氧化成MDA。叶绿体中APX发挥正常的催化作用时,需要依赖单二氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)、二氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)、铁氧还蛋白(ferredoxin, Fd)和MDA等参与的4种反应源源不断地再生AsA。如AsA由MDHAR^[14,15]或DHAR^[14]分别利用NAD(P)H或谷胱甘肽(glutathione, GSH)作为电子供体,催化过氧化物酶反应中的氧化产物得以再生,而这两种电子供体又可利用来自类囊体的电子再生^[10]。由于AsA在清除活性氧的过程中发挥作用,故在叶绿体中,它与氧的摄入、APX的功能及分子氧还原相关的过程统称为“米勒-抗坏血酸过氧化物酶光呼吸”^[16]。因为AsA能使APX处于稳定状态^[17],所以在纯化过程中必须

加入 AsA。

3 APX的分子和酶学特征

APX 是一种包含原卟啉 IX 的血红蛋白, 它的分子量大约是 30 kD, 单体存在, 但有几种 cAPXs 则以同二聚体形式存在。人们已根据茶叶^[18]、拟南芥^[19]、大豆^[20]、盐地碱蓬^[21]的 cDNA 推断出 cAPX 的整个氨基酸序列, 它们之间有很高的同源性(77%~85%)。玉米^[22]和菠菜^[23]cAPX 的部分氨基酸序列也已确定, 从茶叶^[24]中亦得到了 sAPX, 从菠菜中得到了 tAPX^[25]的氨基酸序列。

3.1 APX的系统分布及其同工酶之间的异同 在高等植物中, 已报道有 4 种具有不同细胞定位的 APX 同工酶: mbAPX、cAPX、sAPX 以及 tAPX。cAPX 定位于光合和非光合组织的细胞质中, 已有报道认为逆境胁迫如干旱、热胁迫等能导致 cAPX 的 mRNA 产生, 它在清除 H₂O₂ 和使光氧化伤害处于最低水平中起作用^[26]。mbAPX 位于乙醛酸体和叶片过氧化物酶体的膜上, 以还原从乙醛酸体和叶片过氧化物酶体漏出的 H₂O₂^[27]。叶绿体 APX(chlAPX, 包括 sAPX 和 tAPX) 在叶绿体内清除 H₂O₂, sAPX 以可溶态存在于基质中, tAPX 以结合在膜上的形态存在于类囊体上^[28]。在藻类中也发现了 cAPX, 这表明藻类原始的 cAPX 进一步分化为叶绿体中的 tAPX 和 sAPX 以及被子植物中的 cAPX。APX 同工酶的表达状况受处于各种胁迫条件下的各个细胞区室的分别调控, 而且每种 APX 同工酶的表达在保护各种组织和保持组织最小伤害中起协调作用^[26]。

cAPX 与 chlAPX 在组成、结构、底物特异性和亲和力及纯化中的稳定性不同^[20], 二者特性的差异主要在于^[8, 13]: (1) 两种类型的酶分子是不同的, 各有其特征性序列。目前, 在 cAPX 所测序列中, 半胱氨酸(Cys)-31 被保护起来, 表明它参与了过氧化反应, 而在 tAPX 中未发现相应的 Cys 残基。(2) 分子量不同, chlAPX 为 30 000~34 000 bp, cAPX 约为 57 500 bp。(3) 对 AsA 的敏感性不同, 在不含有 AsA 的介质中, chlAPX 比 cAPX 更快失活, 前者的半衰期为 15~30 s, 后者约为 300 s。(4) 对抑制剂的敏感性不同, chlAPX 对巯基试剂(羟基脲)、氨基苯酚等比 cAPX 更敏感。(5) chlAPX 对电子供体的特异性更高, 它不能以愈创木酚、邻联二茴香胺、邻苯二酚作为电子供体; 而 cAPX 则可以。(6) 植物中存在几

种 cAPX 形式, 有几种 cAPX 以同二聚体形式存在, 目前已知序列的 cAPX 未发现目标转运肽; chlAPX 以单体存在, tAPX 和 sAPX 都发现了向叶绿体转移的转运肽。(7) 最适 pH 值范围不同, chlAPX 的最适 pH 值范围窄于 cAPX。

叶绿体 tAPX 与 sAPX 有相同的分子比率。假设每 430 个叶绿素分子有一分子 P700, 则 tAPX 和 sAPX 与 P700 的分子比率都是 0.5。二者的分子特性差别不大, 有相似的酶特性, 只是 tAPX 的分子量比 sAPX 大 10 kD, 推测这可能是结合在膜上所必需的。而且, tAPX 在碳末端有一个连接到类囊体膜上的额外疏水区域^[29, 30]。除了 tAPX 碳末端的差异之外, 这两种 APX 的氨基酸序列从 N 端到 315 位残基是相同的。

3.2 APX 与 CPX、GPX 的异同 APX 的氨基酸序列测定法等表明, 它与细胞色素 c 过氧化酶(cytochrome c peroxidase, CPX)同属于血红素过氧化酶(class I), 二者的三维结构也相似。CPX 位于线粒体并参与 H₂O₂ 的清除, 这与叶绿体的 APX 类似。尽管 APX 与 CPX 有很高的序列同源性, 但二者反应中间物的稳定性却有很大差异, CPX 的复合物 I 很稳定, 故常用作 H₂O₂ 的微量分析。

APX、GPX 都是血红蛋白, 能通过连接到血红素上而被氰化物和叠氮化物抑制, 都不含任何碳氢化物。APX 起催化作用的机制与 GPX 相同, 都是过氧化物酶的乒乓机制。但植物中典型的 GPX, 如辣根过氧化物酶在氨基酸序列和生理功能上都与 APX 明显不同。

APX、CPX 与 GPX 的不同之处主要表现在: (1) APX 在高等植物和藻类中, CPX 存在于真菌中, 二者都位于细胞器中, 生理功能是清除 H₂O₂; GPX 主要定位于哺乳动物中, 植物中 GPX 的功能不是清除 H₂O₂, 而是参与新陈代谢反应, 如木质素的生化作用, IAA 的分解, 抵御病原体等^[1, 8], 它在植物组织中定位在液泡、细胞壁和胞质中, 叶绿体中几乎没有发现^[2]。(2) APX 与 CPX 之间的同源性比 APX 和植物中的 GPX 更高^[12, 13, 27]。(3) APX 和 CPX 都不能发生糖基化作用, 而 GPX 本身就是一个糖蛋白^[9]。在和 GPX 发生糖基化作用的同样位点上, APX 和 CPX 都未发现天冬酰胺^[23]。(4) APX 能被巯基试剂抑制, 以至于 1 个分子中的 4 个半胱氨酸残基中至少有 2 个不能形成二硫键; 相反, 巯基试剂并不能对 GPX 起作用^[9], 人们根

据这个特性用来分析 APX 和 GPX 的特异性^[31]。(5)氧化介质不同: CPX的氧化介质是Oxy-ferrl 血红素和色氨酸残基, GPX是通过Oxy-ferrl 血红素和卟啉残基起作用^[8]。(6)虽然在蓝藻^[32]、菠菜叶绿体^[2]或其他植物中发现了 GPX, 但它的活性仅是 APX 的 1%^[33], 其表达受到抑制, 而植物却特别地发展了 APX。(7)GPX 和 GSH 是由 NADPH 再生的, NADPH 由谷胱甘肽还原酶催化产生。而 AsA 则是由利用光合的 NAD(P)H 和 GSH 的系统再生的^[8]。

4 APX的基因工程

提高植物体内抗氧化酶活性和增强抗氧化代谢的水平是提高植物抗逆性的有效途径之一。APX 能提高氧化耐受性的作用已在许多植物中有报道, 目前多种植物的 APX 基因已克隆并应用于植物转基因的研究。

人们已从棉花、拟南芥等植物中克隆了 APX 基因, 并进行了部分转基因植物的研究。Kornyevev等^[34]获得了转叶绿体APX基因的棉花植株, APX 在植物体内过量表达, 其叶片中 APX 活性比野生型的提高 5 倍。王庆斌等^[35]获得了转 APX 基因的水稻植株并研究了其功能, 发现 APX 基因植株中可能表达 APX 的相关蛋白, 可以抵抗甲基紫精的氧化胁迫, 有效保护膜系统。Kornyevev 等^[34]将 SOD、tAPX、谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR) 基因分别导入棉花中, 得到过量表达, 所有转基因棉花具有较高的 PSII 光化学活性和抗氧化能力。Wang 等^[36]获得的转 tAPX 烟草植株, 其 APX 活性明显提高, 抗低温的能力也增强。Charles 等^[20] 研究大豆 cAPXs 中观察到, APX 的转录、翻译和翻译后调控可能增强农作物抵抗环境胁迫的能力。

5 结束语

植物氧代谢研究已有 30 多年历史, 这个问题不仅涉及植物生命本质, 也有生产应用价值。人们虽然对活性氧在植物体内的产生和清除以及调控机制已有较深入的认识, 但仍有许多问题有待解决。

哺乳动物和植物体含有相同分量的 GSH, 为什么在长期的进化过程中, 前者选择了 GPX, 而植物却特别地发展了 APX 活性^[8]?

由于植物中许多抗氧化剂参与活性氧的清除过程, 且在氧化胁迫下, 许多细胞组分需要保护, 所以单纯地转化某一个基因使之过量表达难

以达到预期效果。SOD 是植物活性氧代谢的关键酶, 从目前的研究结果来看, 单纯提高 SOD 的活性并不能显著提高植物的抗逆能力。推测在转 SOD 基因植物中, 虽然超氧化物阴离子得到了清除, 但 H₂O₂ 的清除过程又成了限速步骤, 使植物并不能在整体上提高活性氧的清除能力。Choi 等^[37]检测到低温下黄瓜叶片中 H₂O₂ 积累量增加约 3 倍, 因而他们认为 CuSn-SOD 是光冷胁迫的主要靶位。APX 是否是真正的靶位, 我们认为应该验证。如果把 APX 也同时转入植物中, 是否会解决这个问题, 也待进一步验证。

由于各种植物抗氧化胁迫的机制不同, 因此在用基因工程方法增加各种抗氧化酶合成的同时, 应注意 AsA、GSH、VitE 等抗氧化物质代谢产物的生成^[38]。叶绿体中 AsA 浓度对于 APX 的活性有很大的影响, 看来, AsA 再生系统也是非常重要的。怎样提高 AsA 的再生, 也需进一步研究。

在诸如热击、盐渍等逆境条件下, APX 转录水平和酶活性均提高, 但免疫分析显示 APX 蛋白总量却不变。这表明在逆境条件下, APX 的调节至少存在蛋白质从头合成、蛋白质稳定性或酶激活几个方面。其间具体的机制尚不清楚^[38], 今后这方面的研究也需要加强。

逆境胁迫信号和氧胁迫信号之间往往有相关性。如热击转录因子(heat shock factor, HSF)参与胞质 APX2/ 热击 APX 表达的诱导表明, 热胁迫和氧胁迫信号之间有相关性^[39]。但 H₂O₂ 参与的植物逆境胁迫中氧胁迫依赖型 APX 活性的改变问题还未搞清。另外, 目前还没有能同时分析所有 APX 同工酶对胁迫产生不同反应的方法^[30]。这些问题均应探讨。

参考文献

- 1 Asada K, Takahashi M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ(eds). Photoinhibition. Amsterdam, The Netherlands:Elsevier Science Publishers, 1987. 227~287
- 2 Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol, 1981, 22:867~880
- 3 Misako K, Shimizu S. Chlorophyll metabolism in higher plant VI. Involvement of peroxidase in chlorophyll degradation. Plant Cell Physiol, 1985, 26:1291~1301
- 4 蒋明义, 荆家海. 植物体内羟自由基的产生及其与脂质过氧化作用启动的关系. 植物生理学通讯, 1993, 29:300~305
- 5 Asada K, Kiso K, Yoshikawa K. Univalent reduction of

- molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. J Biol Chem, 1974, 249:2175~2181
- 6 Furbank R, Badger M. Oxygen exchange associated with electron transport and photophosphorylation in spinach chloroplasts. Biochim Biophys Acta, 1983, 723:400~409
- 7 Takahashi M, Asada K. Dependence of oxygen affinity for Mehler reaction on photochemical activity of chloroplast thylakoids. Arch Biochem Biophys, 1982, 267:714~722
- 8 Asada K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. Physiol Plant, 1992, 85:235~241
- 9 Chen GX, Asada K. Ascorbate peroxidase in tea leaves occurrence of two isoenzymes and their differences in enzymatic and molecular properties. Plant Cell Physiol, 1989, 30:987~998
- 10 Asada K, Badger MR. Photoreduction of $^{18}\text{O}_2$ and H_2O_2 with a concomitant evolution of $^{18}\text{O}_2$ in intact spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol, 1984, 25:1169~1179
- 11 Foyer CH, Hailiwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta, 1976, 133:21~25
- 12 廖祥儒, 王越. 叶绿体内活性氧产生及清除的酶系统. 生命的化学, 2000, 20(6):260~262
- 13 Chen GX, Asada K. Hydroxyurea and *p*-aminophenol are the suicide inhibitors of ascorbate peroxidase. J Biol Chem, 1990, 265:2775~2781
- 14 Hossain MA, Asada K. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. Plant Cell Physiol, 1984, 25:85~92
- 15 Hossain MA, Asada K. Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. J Biol Chem, 1985, 260:12920~12926
- 16 Dismond CB, Grace SC. Perspective on photoinhibition and photorespiration in the field. J Exp Bot, 1995, 46:1351~1362
- 17 Hossain MA, Asada K. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. Plant Cell Physiol, 1994, 25:1285~1295
- 18 Mittler R, Zilinskas DA. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding tea cytosolic ascorbate peroxidase. FEBS Lett, 1991, 289:257~259
- 19 Kubo A, Saji H, Tanaka K et al. Cloning and sequencing of a cDNA encoding ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol, 1992, 18:691~701
- 20 Charles R, Frank J, Michael B. Identification of two cytosolic ascorbate peroxidase cDNAs from soybean leaves and characterization of their products by functional expression in *E. coli*. Planta, 1998, 204:120~126
- 21 马长乐, 王萍萍, 张慧等. 盐地碱蓬APX基因的克隆及盐胁迫下的表达. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(4):261~266
- 22 Koshiha K. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). Plant Cell Physiol, 1993, 34:713~721
- 23 Tanaka K, Takeuchi E, Kubo A et al. Two immunologically different isozymes of ascorbate peroxidase from spinach leaves. Arch Biochem Biophys, 1991, 286:371~375
- 24 Chen GX, Sanom S, Asada K. The amino acid sequence of ascorbate peroxidase from tea has a high degree of homology to that of cytochrome c peroxidase from yeast. Plant Cell Physiol, 1992, 33:109~116
- 25 Miyake C, Cao WH, Asada K. Purification and molecular properties of thylakoid-bound ascorbate peroxidase from spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol, 1993, 34:881~889
- 26 Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T et al. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiol, 2000, 123:223~233
- 27 Yamaguchi K, Mori H, Nishimura MA. Novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. Plant Cell Physiol, 1995, 36:1157~1162
- 28 Miyake C, Asada K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary product monodehydroascorbate radical in thylakoids. Plant Cell Physiol, 1992, 33:541~553
- 29 Ishikawa T, Sakai K, Yoshimura K et al. cDNA encoding spinach stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase differing in the presence or absence of their 3' coding regions. FEBS Lett, 1996, 384:289~293
- 30 Yamaguchi K, Hayashi M, Nishimura M. cDNA cloning of thylakoid-bound ascorbate peroxidase in pumpkin and its characterization. Plant Cell Physiol, 1996, 37:405~409
- 31 Amako K, Chen GX, Asada K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isoenzymes of ascorbate peroxidase in plants. Plant Cell Physiol, 1994, 35:497~504
- 32 Fahey RC, Sundquist AR. Evolution of glutathione metabolism. Adv Enzymol, 1991, 64:1~53
- 33 Drotar A, Phelps P, Fall R. Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. Plant Sci, 1985, 42:35~40
- 34 Kornyevev D, Dmytro K, Barry A et al. Enhanced photochemical light utilization and decreased chilling-induced photoinhibition of photosystem II in cotton overexpression genes encoding chloroplast-targeted antioxidant enzymes. Physiol Plant, 2001, 133:323~331
- 35 王庆斌, 王方正, 薛庆中等. APX基因转化水稻及其功能的研究. 中国植物生理学会全国学术年会暨成立40周年庆祝大会学术论文摘要汇编, 杭州, 2003. 318
- 36 WANG W-Q, LI Bin, MENG Q-W et al. The sequence of *Lycopersicon esculentum* thylakoid-bound ascorbate peroxidase gene TtAPX. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(6):491~492
- 37 Choi SM, Jeong SW, Jeong WJ et al. Chloroplast CuSn-superoxide dismutase is a highly sensitive site in cucumber leaf chilled in the light. Planta, 2002, 216:315~324
- 38 沈文飏, 黄丽琴, 徐朗莱. 植物抗坏血酸过氧化物酶. 生命的化学, 1997, 17(5):24~26
- 39 Irina IP, Roman AV, Iriedrich S. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 2002, 129:838~853