

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

綠竹及綠竹筍老化過程中抗氧化機制之角色及其應用性探討(2/2)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2317-B-002-014-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學植物科學研究所

計畫主持人：靳宗洛

共同主持人：楊健志

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 94 年 2 月 2 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 綠竹筍生長與老化機制之探討及相關功能基因之利用—綠竹及綠竹筍 老化過程中抗氧化機制之角色及其應用性探討(2/2)

計畫編號：NSC 92-2317-B-002-014

執行期限：92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

主持人：靳宗洛 國立台灣大學植物學系暨研究所

### 一、摘要

分析綠竹及其竹筍採收後不同部位之 SOD 活性及 SOD 同功酶鑑定，發現綠竹筍主要的 SOD 活性是由 CuZnSOD 及 MnSOD 所構成。與過去所分析過的一百多種植物 SOD 同功酶相比較，綠竹筍之 CuZnSOD、MnSOD 在 Native PAGE 活性染色顯現出極大的差異(Pan et al., 1999)，反應出綠竹 CuZnSOD 基因其複雜性，因此推測綠竹筍 SOD 同功酶分子結構及生化特性可能具其特異性。

目前的研究已完成了在不同組織、不同生長階段、及採收後老化過程中；以及利用綠竹筍的懸浮細胞經處理 UV-B、強光、高溫、低溫及 ABA 等逆境之模擬過程，來分析綠竹筍 SOD 活性及 mRNA 的變化情形。

一方面也成功地選殖出四個綠竹的 CuZnSOD cDNA 及兩個 MnSOD cDNA 全長。但是從 Southern blot 結果預估 CuZnSOD 可能有四到五個基因，MnSOD 可能有四到五個基因。從 MnSOD 3'-end RACE 的結果也顯示有五個不近相同的 3'-end UTR，可能綠竹所擁有 CuZnSOD 及 MnSOD 基因較其他植物多。

現已在大腸桿菌中大量表現並純化三個 GST-CuZnSOD 重組蛋白及兩個 GST-MnSOD 重組蛋白，在 Native PAGE 活性染色下，得到不同的活性染色結果，並將藉由一些生化分析測試，了解其生化特性。

另外也對綠竹 CuZnSOD 及 MnSOD 的 promoter region 進行鈎取，以了解 CuZnSOD 或 MnSOD 的 promoter 是否因為容易受到氧化逆境的誘導，來提高抗氧化力。

未來這些綠竹的 SOD 基因將會被表現在阿拉伯芥中，證明其是否為特定的 CuZnSOD 或是 MnSOD 基因。也將假借阿拉伯芥來測試綠竹的這些 SOD 基因是否能推供良好的抗氧化機能。

**關鍵詞：**SOD、native PAGE、活性染色、氧化逆境、重組蛋白

## Abstract

Activity staining and isozymes identification of SODs in the different part of bamboo shoot and leaf (*Bambusa oldhamii*) indicated that primary SOD activity in green bamboo shoots was composed of MnSOD and CuZnSOD activities. As compared to SOD isozymes from over one hundred plants, green bamboo's CuZnSOD and MnSOD showed great difference in native PAGE activity staining. (Pan et al., 1999), reflecting green bamboo's CuZnSOD gene complexity, therefore inferring possible molecular structures and biochemical activities specificity in green bamboo's SOD isozymes. We have completed the SODs activity and mRNA gene expression assay by Northern blotting using different tissues from various growth stages of green bamboo and suspension cell treated with UV-B, intensive light, heat, cold and ABA. We show that there are 4 to 5 CuZnSOD and MnSOD genes, respectively according to the Southern blotting data. We cloned 4 different full length CuZnSOD cDNAs and 2 full length MnSOD cDNAs. The 3'-RACE sequence results from MnSOD shows 5 different 3'-UTRs sequences, which is in agreement with the data that green bamboo, has more CuZnSOD and MnSOD gene families. Now we have conducted 3 GST-CuZnSOD and 2 GST-MnSOD recombinant proteins expression in *E. coli* and acquired different native PAGE activity stain patterns. In the future, we will express these genes in Arabidopsis and analyze these recombinant protein's biochemical activities *in vitro*.

**Keywords:** SOD · native PAGE · activity stain · oxidative stress · recombinant protein

## 二、緣由與目的

目前在臺灣栽種面積最廣的品種為綠竹 (*Bambusa oldhamii*)，其竹筍質地細嫩，味道甜美，深受國內外人士喜愛，為高經濟價值的食用作物。

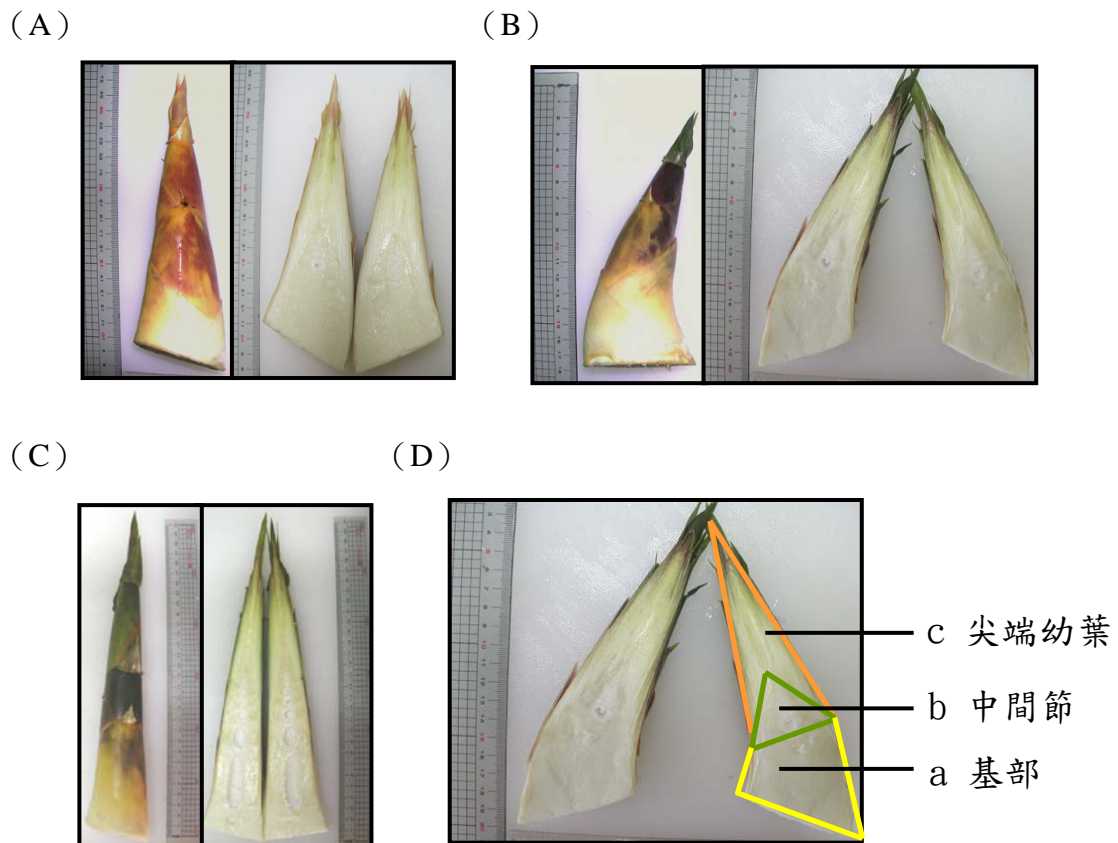
竹筍生長快速，然而採收後竹筍切面易產生褐化並迅速木質化而變老，使其保存及銷售受到影響。竹的生長、開花與老化現象在植物界中也獨具特色。成長中的竹筍生長速率極快，以剛竹 (*Phyllostachys bambusoides*) 為例，一天內可生長約 90 公分。雖然綠竹生長較剛竹慢，其生長量也有 10 公分，其生長速度較生長最快速的一般樹木快上 100 倍以上。所以推測，竹筍必須能夠解除在快速生長過程中所造成的氧化逆境，進而演化出特殊而有效的抗氧化系統。

竹的開花週期被認為是受到遺傳控制，而強光、乾旱、低溫、臭氧、機械傷害等環境因子所造成之氧化逆境亦可能與誘導竹之開花有關。在竹筍成長的過程或一旦受到創傷、病害等逆境時，其受傷部位之組織會快速纖維化。這種快速老化的現象與竹筍採收時，受到的創傷及水分缺乏所引發之氧化逆境有關 (Kleinhenz et al., 2000)。

超氧自由基，是所有生物在正常有氧代謝過程中自然產生的活性氧分子，會造成氧化逆境，產生連鎖反應，破壞細胞，是老化及疾病的元兇。粒腺體因它是細胞內進行氧化作用產生能量的主要場所，推測有 3 至 5 % 的氧會轉變形成超氧自由，是產生超氧自由基最主要地點，可利用超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 以消除超氧自由基，使它們轉換成無害的水及氧氣。生物具有嚴密的調控機制來控制生長發育過程中體內活性氧分子的含量，以及因應氧化逆境所產生的大量活性氧分子。竹類生長快速的現象顯示其能具有特殊及有效的抗氧化系統，才能解除快速生長過程所造成的氧化逆境。本計畫將研究綠竹筍的抗氧化機制，探討竹筍在對抗快速生長的氧化逆境及採收後老化過程中所 SOD 所扮演的角色，以期能由增加竹筍的抗氧化能力解決此快速老化現象。

### 三、結果與討論

#### 3.1 綠竹筍的外觀、不同組織、不同生長階段



圖一、綠竹筍的外表型、不同組織、及不同生長階段。

(A) 未出土的綠竹筍，左-外表型；右-縱切面。

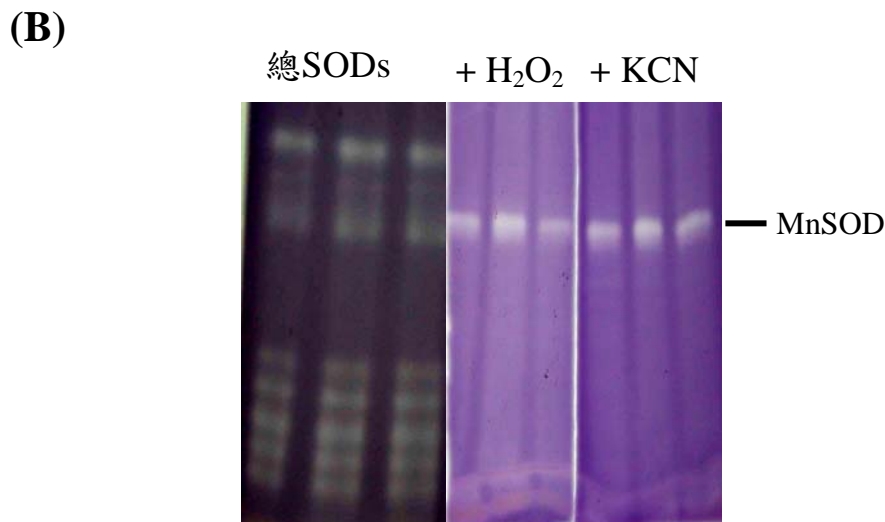
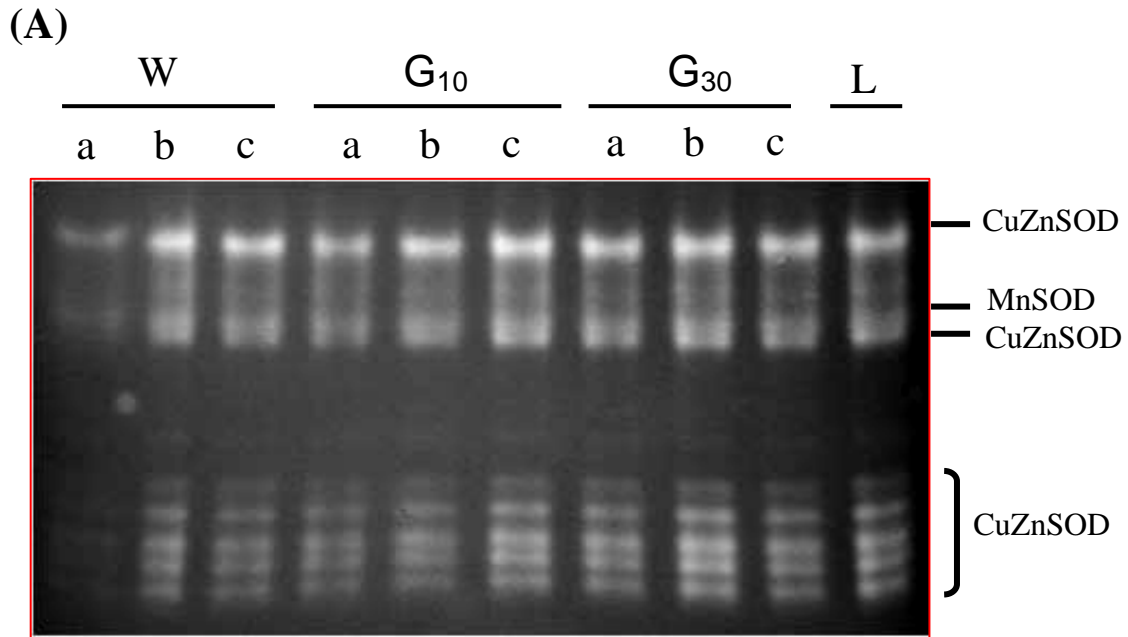
(B) 出土10 cm (總長17 cm) 的綠竹筍，左-外表型；右-縱切面。

(C) 出土30 cm (總長35 cm) 的綠竹筍，左-外表型；右-縱切面。

(D) 綠竹筍的縱切面， a-基部； b-中間節； c-尖端幼葉。

### 3.2 綠竹筍之不同生長階段總 SODs 活性分析及綠竹 SODs 之 SOD 同功酶的鑑定

由圖二(A)顯示，綠竹筍在出土後會快速誘導 SODs 活性表現，而且在出土 30 公分的快速生長延長部分，有更強的 SODs 活性表現。由綠竹 SODs 同功酶的鑑定，發現綠竹 SODs 活性由 CuZnSOD 及 MnSOD 構成。

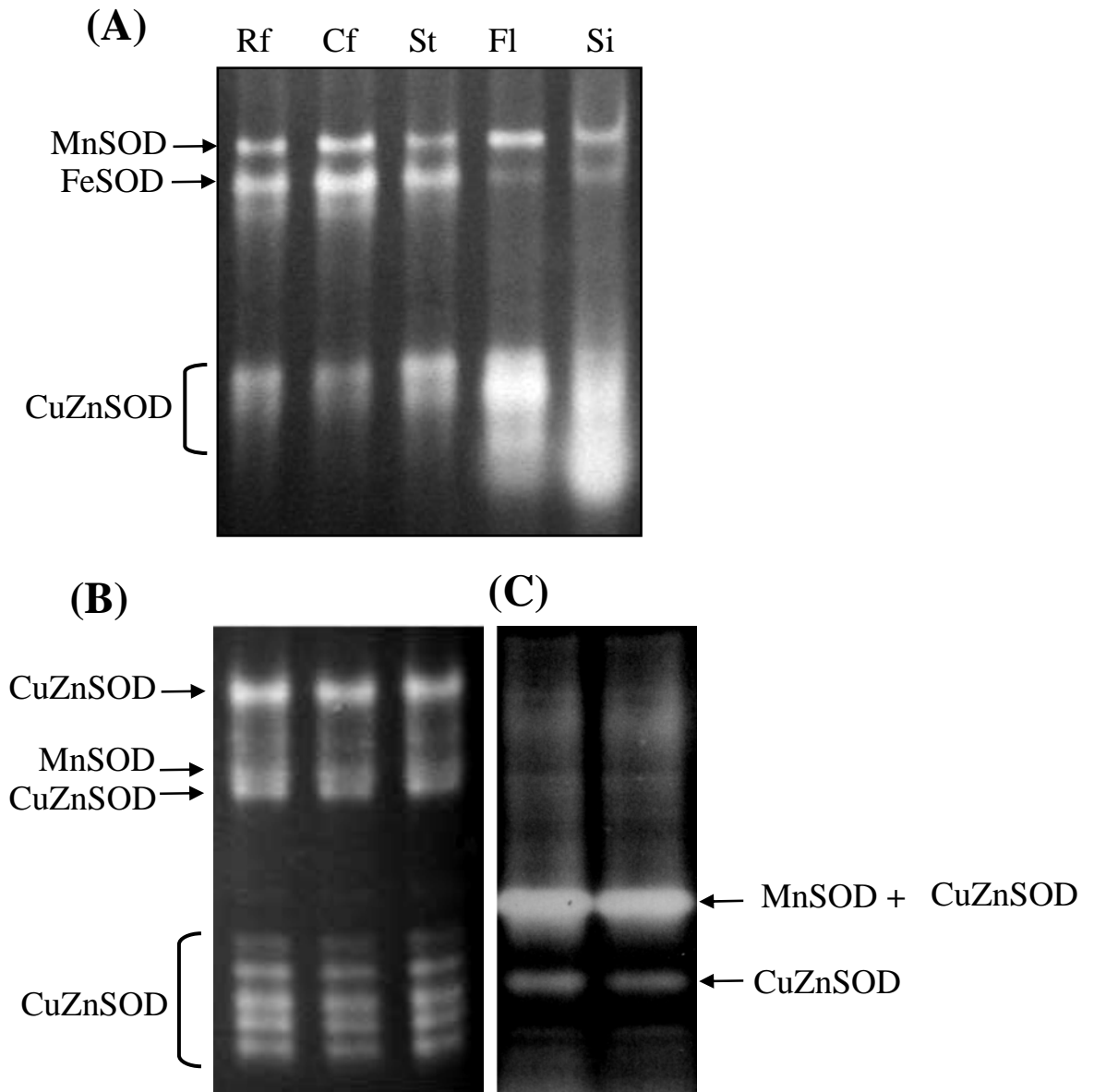


圖二：綠竹筍之不同生長階段：未出土 (W)、出土10公分 (G<sub>10</sub>)、出土30公分 (G<sub>30</sub>) 等不同組織的尖端 (c)、中間 (b)、底部 (a) 及葉子 (L) 之總SODs同功酶活性分析。

等量的綠竹筍蛋白質 (10 μg) 在 12 % native polyacrylamide 膠體中進行電泳分析之後，(A) 進行總SODs活性分析；(B) SODs之各種不同同功酶的鑑定，並無法鑑定出有FeSOD的存在。

### 3.3 綠竹與其他物種總 SODs 活性比較

相較於阿拉伯芥及水稻的 SODs 活性染色的結果，綠竹具有更多的活性條帶，顯示其 SODs 在基因群或是分子層次方面，更具複雜性。



圖三：阿拉伯芥、綠竹筍及水稻總SODs同功酶活性之比較。

(A) 阿拉伯芥不同組織總SODs同功酶活性，Rf: rosette leaf, Cf: cauline leaf, St; stem, Fl: flower, Si: silique。(B) 為綠竹筍及 (C) 水稻中總SODs同功酶活性分析。箭頭處為各種不同之SOD。

### 3.4 由 3',5'RACE 所得到的第一條綠竹 CuZnSOD cDNA 全長

#### --- *BoCZSOD1*

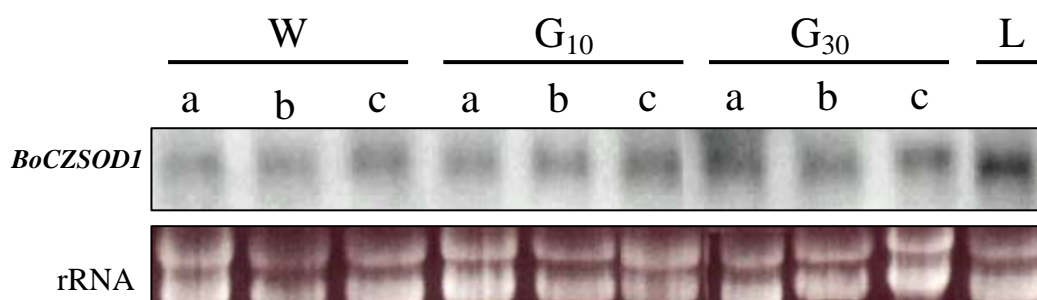
	ACGCGGGGAGGACACAGGGAGTCGGGAACCTTCCAGAAGCGCAA	
	GATTCCAAGGTCGTCGCCGCTCCTCCTCGTCACAGGGGTCGCCTGAGAACACATAAACA	
105	ATGGTGAAGGCTGTTGCTGTGCTTGCTAGCAGCGAGGGTGTAAAGGGCACCATCTACTTT	164
1	M V K A V A V L A S S E G V K G T I Y F	20
165	GTCCAAGAGGGAGATGGTCCGACCACTGTGACCGAAGCGTCTCTGGCCTCAAGCCTGGT	224
21	V Q E G D G P T T V T G S V S G L K P G	40
225	CTCCATGGGTTCCATGTGCATGCACTGGGTGACACCACAAATGGCTGCATGTCAACTGGA	284
41	L H G F H V H A L G D T T N G C M S T G	60
285	CCACATTTCAATCCTGCGGGTAAGGAACATGGGGCACCAGAAGATGAGAACCGCCATGCT	344
61	P H F N P A G K E H G A P E D E N R H A	80
345	GGTGATCTTGAAACGTGACGGCCGGAGCAGATGGTGTGCTAATGTCAATGTTGTGCGAC	404
81	G D L G N V T A G A D G V A N V N V V D	100
405	AGCCAGATCCCCCTTACTGGACCACAGTCAATCATTGGCCGAGCTGTTGTTGCCATGCT	464
101	S Q I P L T G P Q S I I G R A V V V H A	120
465	GATCCTGATGATCTTGCAAAGGTGGACATGAGCTTAGCAAGAGCACTGGAAACGCTGGT	524
121	D P D D L G K G G H E L S K S T G N A G	140
525	GGACGTGTTGCTTGTGGGATCATTGGGCTCCAGGGTTAGACGTCGTCCTTCTTCGCTGGCC	584
141	G R V A C G I I G L Q G *	153
	AACAGACAGATCTGGGCACCTTCAGACAAGCTGTTCCGGTACCCTTATCCAACATACTTG	
	GCGTGGCTATTTAA <u>ATAAGCACCTGATCTATGATCACTGATCAGTGTACCATTTCGCATC</u>	
	ATTTCTATATGCTACTCTTGAACATTGCATAACTGCCATTTGGTTTGAATGCATAGTGT	
	CTGTTTTGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

圖四、*BoCZSOD1* cDNA 之核苷酸序列與推行之胺基酸序列。胺基酸序列以單一字母呈現在核苷酸序列之下；數字代表核苷酸的數目；粗黑體字為 cDNA 的 poly (A) tail；核苷酸序列底下劃線者為 polyadenylation signal 的位置；星號代表 stop codon。



### 3.5 在不同生長階段觀察 *BoCZSOD1* mRNA 的表現量

*BoCZSOD1* mRNA 的表現量也隨著綠竹筍生長而增加。

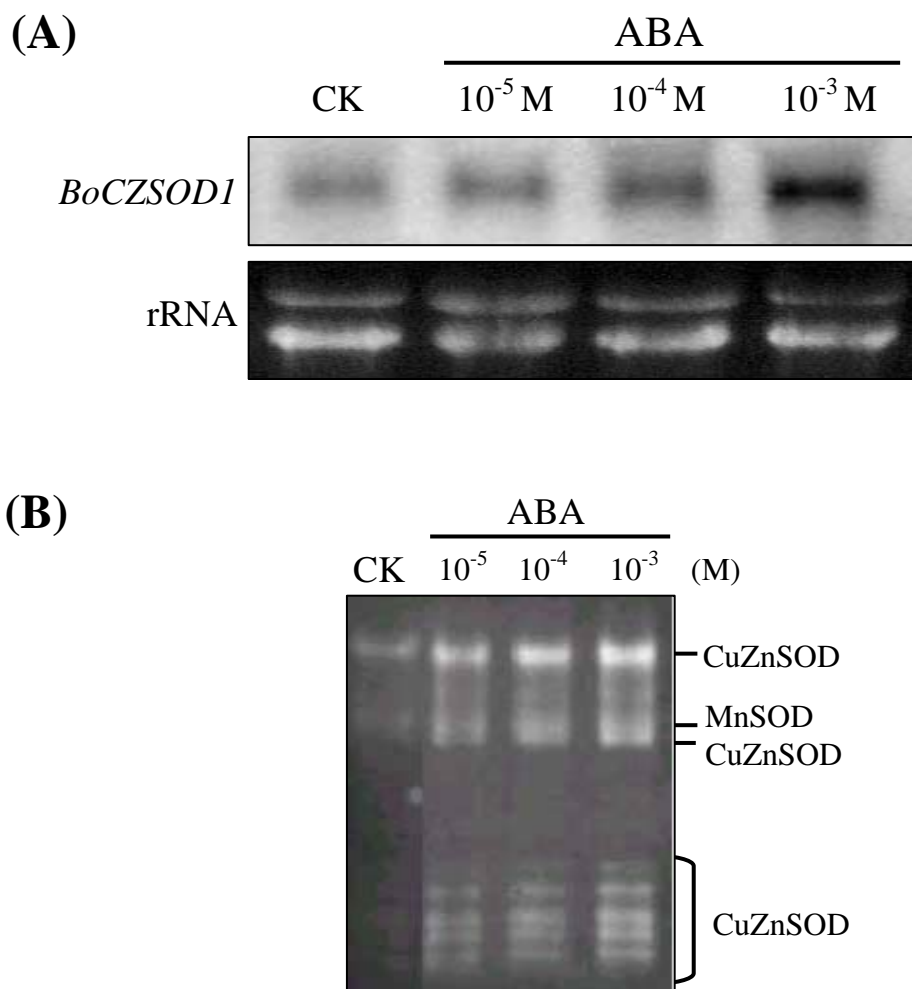


圖五：綠竹筍之不同生長階段：未出土 (W)、出土10公分 (G<sub>10</sub>)、出土30公分 (G<sub>30</sub>) 等不同組織的尖端 (c)、中間 (b)、底部 (a) 及葉子 (L) 之 *BoCZSOD1* 基因之表現。

北方氏雜合分析，等量的綠竹筍RNA (12  $\mu$ g) 在甲醛洋菜膠體中進行電泳，再轉印到尼龍膜上，利用 261 bp 之 *BoCZSOD1* cDNA 部分片段作為探針，與尼龍膜上的綠竹筍 total RNA 進行雜合反應。以 EtBr 染色的 rRNA 量作為 loading control。

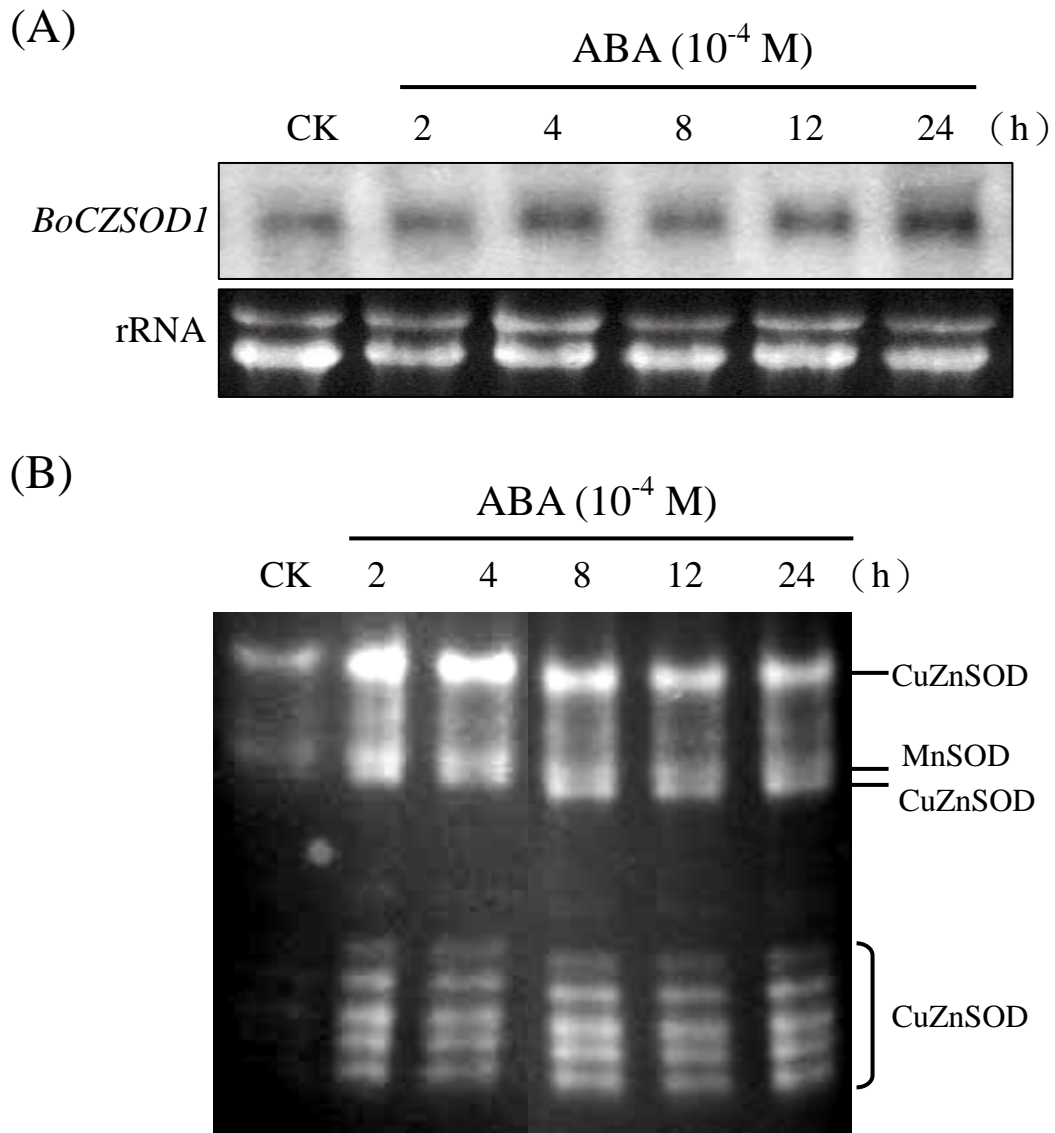
### 3.6 觀察綠竹懸浮細胞在ABA處理下，對於 *BoCZSOD1* mRNA表現量及總SODs活性的影響

由圖六(A)、(B)可得到ABA處理可誘導*BoCZSOD1* mRNA表現量及總SODs活性的增加，並且在加入ABA後4小時得到最高表現，圖七(A)、(B)。



圖六：ABA不同濃度對綠竹筍懸浮細胞*BoCZSOD1*的基因表現及總SODs同功酶活性的影響。

懸浮細胞以含0 M、 $10^{-5}$  M、 $10^{-4}$  M、 $10^{-3}$  M ABA之MS液體培養基在25 °C避光培養24小時，不以ABA處理當作對照組(CK)。(A) 北方氏雜合分析。以 $^{32}$ P標定261 bp *BoCZSOD1* cDNA 序列當作探針，EtBr染色的rRNA當作loading control。(B) 處理後的懸浮細胞總SODs同功酶活性分析。

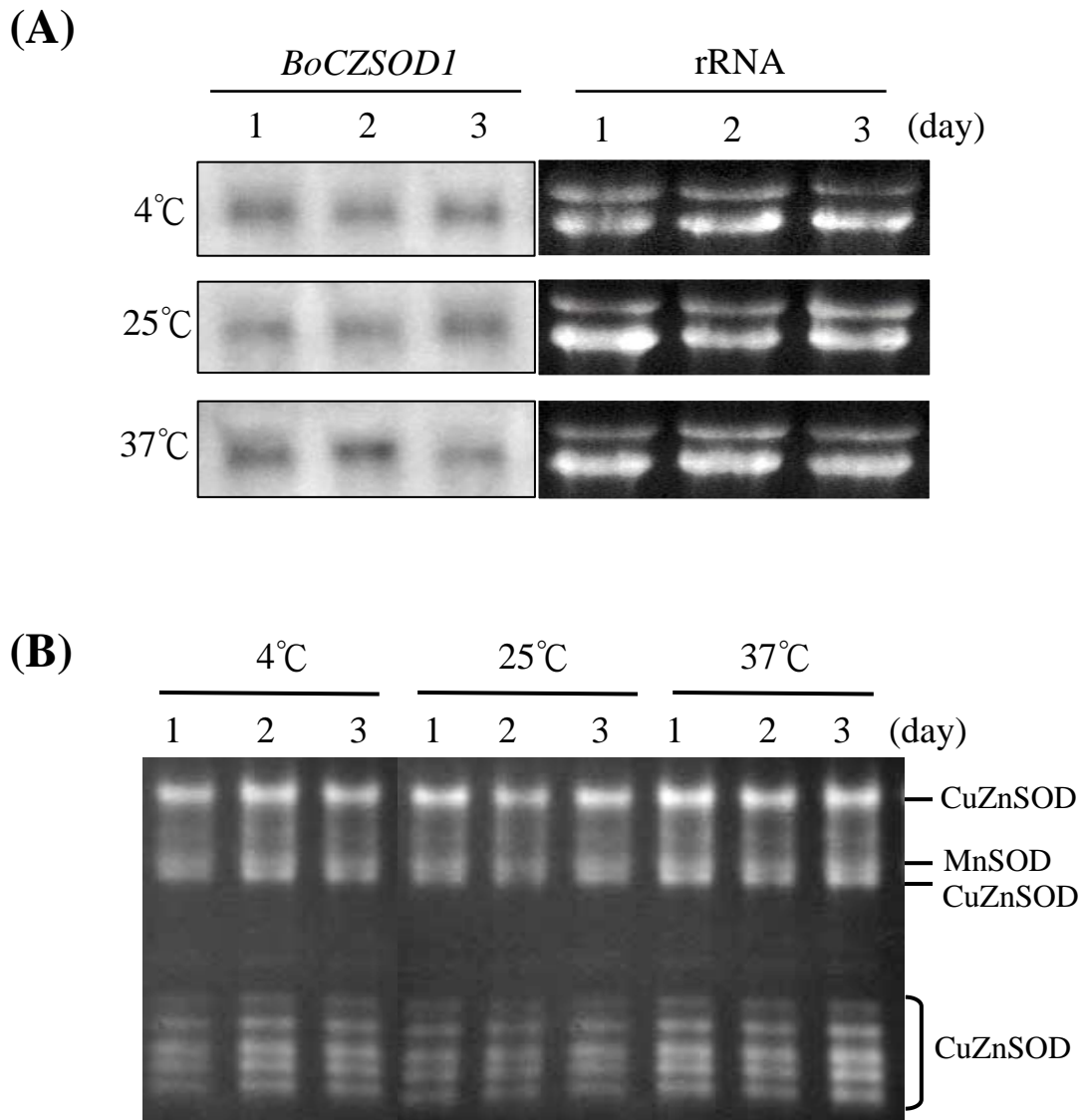


圖七： $10^{-4}$  M ABA處理後不同培養時間對綠竹筍懸浮細胞*BoCZSOD1*的基因表現及總SODs同功酶活性的影響。

懸浮細胞以含 $10^{-4}$  M ABA之MS液體培養基在 $25^{\circ}\text{C}$ 避光培養0小時、2小時、4小時、8小時、12小時、24小時；培養細胞不含ABA處理當作對照組(CK)。(A) 北方氏雜合分析。以 $^{32}\text{P}$ 標定的261 bp *BoCZSOD1* cDNA 序列當作探針；EtBr染色的rRNA 當作loading control。(B) 處理後的懸浮細胞總SODs同功酶活性分析。

### 3.7 觀察綠竹懸浮細胞在高低溫逆境處理下，對於 *BoCZSOD1* mRNA表現量及總SODs活性的影響

高低溫都會誘導*BoCZSOD1* mRNA表現量及總SODs活性的增加，圖八(A)、(B)。

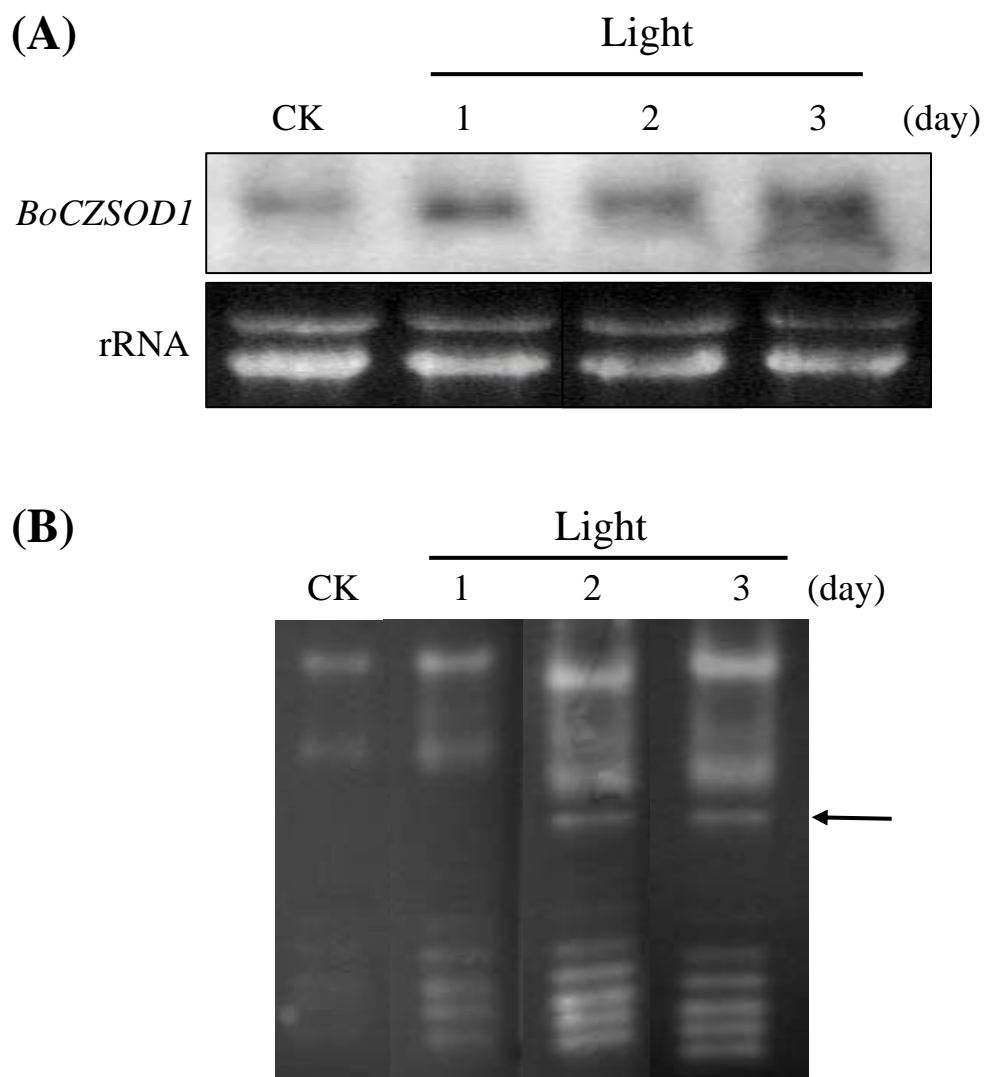


圖八：不同溫度及處理天數對綠竹筍懸浮細胞*BoCZSOD1*基因表現及總SODs同功酶活性之影響。

懸浮細胞在MS液體培養基避光處理後分別在 4°C、25°C、37°C 各培養1至3天。(A) 北方氏雜合分析，以<sup>32</sup>P標定的261 bp *BoCZSOD1* cDNA序列當作探針；EtBr染色的rRNA當作loading control。(B) 處理後的懸浮細胞總SODs同功酶活性分析。

### 3.8 觀察綠竹懸浮細胞在強光處理下，對於 *BoCZSOD1* mRNA表現量及總SODs活性的影響

強光處理並未造成*BoCZSOD1* mRNA表現量增加，圖九(A)。但是在總SODs活性染色結果，發現有不同的活性條帶被誘導出來，圖九(B)。

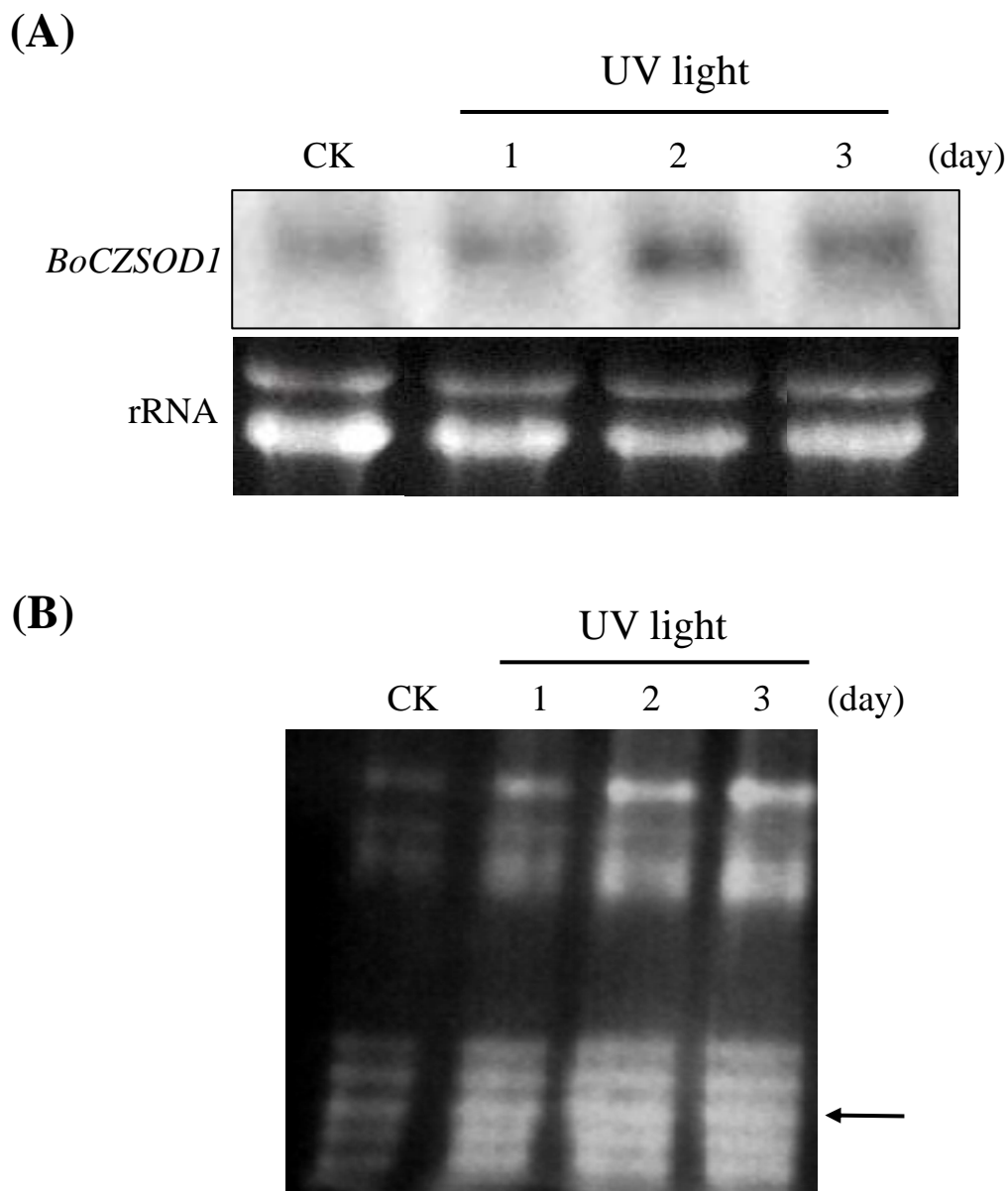


圖九：強光照對綠竹筍懸浮細胞*BoCZSOD1*基因表現及總SODs同功酶活性之影響。

懸浮細胞在MS液體培養基(25°C)以強光( $60 \mu \text{mol/m}^2\text{s}^{-2}$ )照射1至3天。不光照處理當作對照組(CK)。(A) 北方氏雜合分析，以 $^{32}\text{P}$ 標定的261 bp *BoCZSOD1* cDNA序列當作探針；EtBr染色的rRNA當作loading control。(B) 處理後的懸浮細胞總SODs同功酶活性分析。箭頭處為新誘導之SOD，推測為葉綠體型之SOD。

### 3.8 觀察綠竹懸浮細胞在UV-B處理下，對於 *BoCZSOD1* mRNA表現量及總SODs活性的影響

由圖十(A)可發現，*BoCZSOD1* mRNA表現量在處理第二天達到最高。但是在活性染色結果，圖十(B)。發現活性到第三天仍有提高。和強光處理的結果比較，可知被強光或UV-B所誘導的SOD各有不同

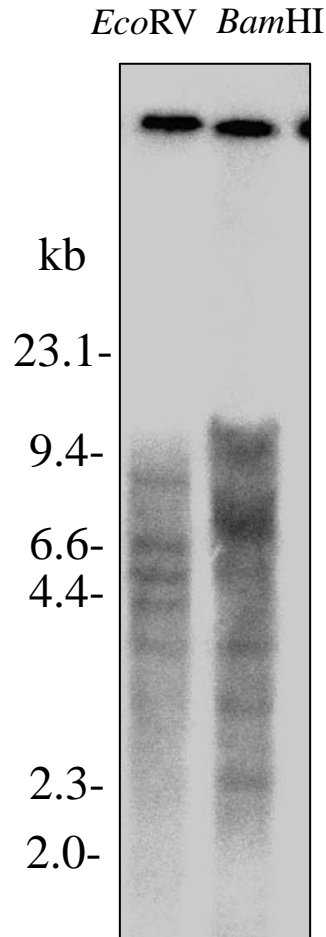


圖十： UV-B對綠竹筍懸浮細胞*BoCZSOD1*基因表現及總SODs同功酶活性之影響。

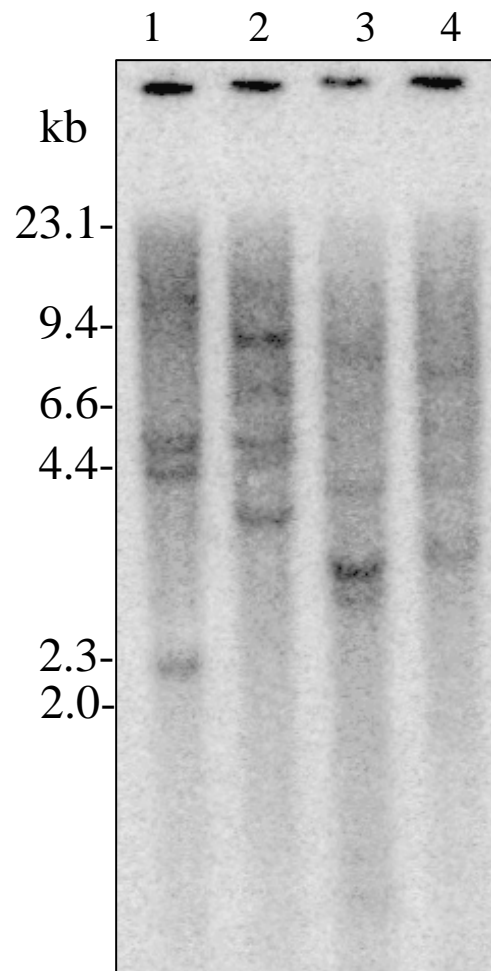
懸浮細胞在MS液體培養基25°C以UV-B光照射1至3天。不光照處理當作對照組(CK)。(A) 北方氏雜合分析。以<sup>32</sup>P標定的261 bp *BoCZSOD1* cDNA序列當作探針; EtBr染色的rRNA當作loading control。(B) 處理後的懸浮細胞總SODs同功酶活性分析。箭頭處為增強表現之SOD。

### 3.9 綠竹 genomic DNA Southern blot

由圖十一、十二的結果推論，綠竹 *CuZnSOD* 可能有 4~5 個基因，*MnSOD* 可能也有 4~5 個基因，相較其他物種，其 *SODs* 基因群可能更複雜。



圖十一：綠竹筍 *CuZnSOD* 基因之南方氏雜合分析，預估可能有五個基因。綠竹筍 genomic DNA (15  $\mu$ g) 經由 *EcoRV* 及 *BamHI* 限制酶處理後，在 0.8 % TAE 膠體中進行電泳，再轉印到尼龍膜上，利用 261 bp 的 *BoCZSOD1* cDNA 部分片段作為探針，與尼龍膜上的綠竹筍 genomic DNA 雜合。左邊標示為  $\lambda$  / *Hind* III DNA marker 之各片段大小。

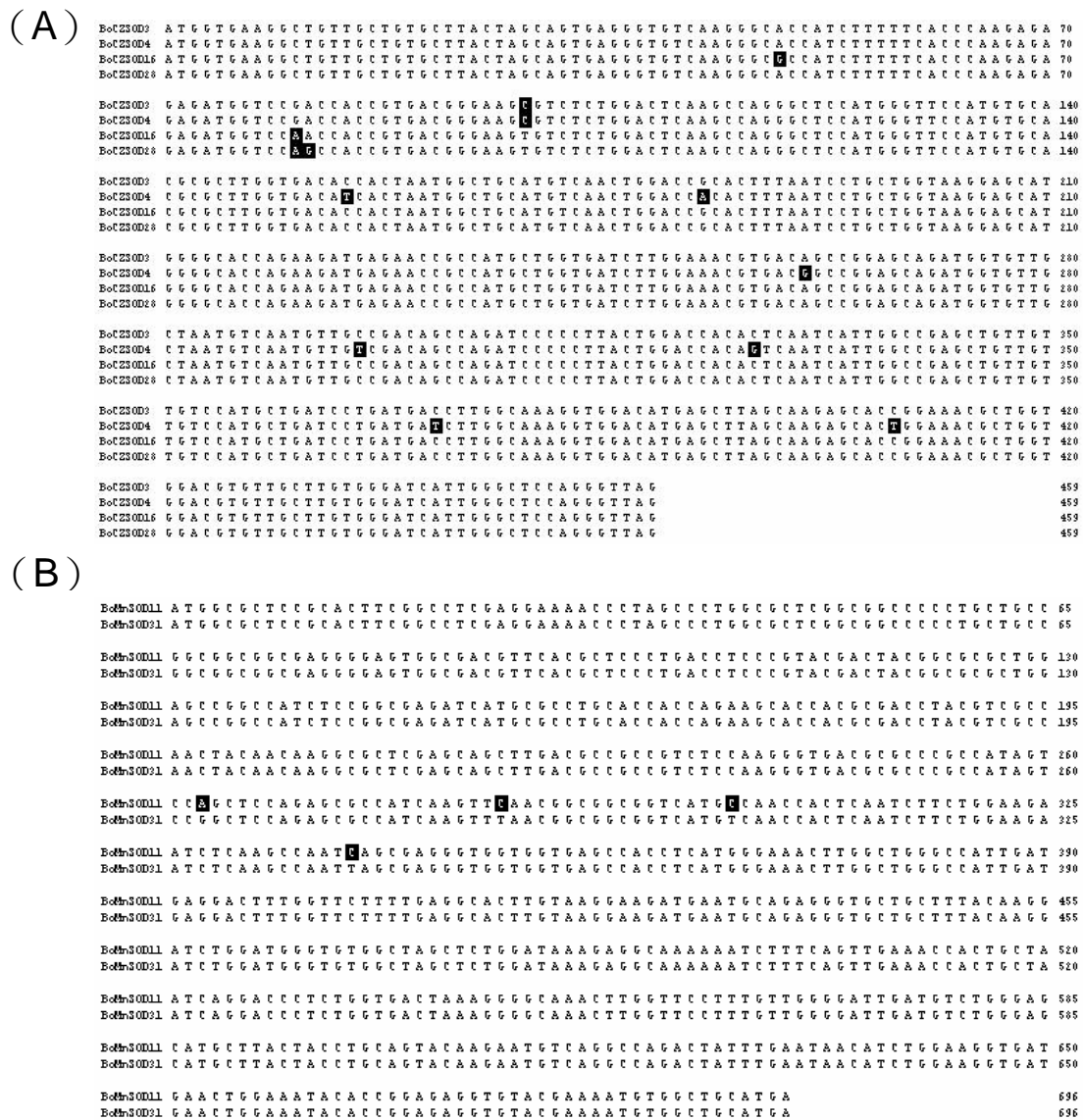


圖十二：綠竹筍MnSOD基因之南方氏雜合分析，預估可能有四至五個基因。綠竹筍 genomic DNA (15  $\mu$ g) 經由1: *Bam* HI, 2: *Eco* RV, 3: *Hind* III 及 4: *Xba* I 限制酶處理後，在0.8 % TBE膠體中進行電泳，再轉印到尼龍膜上，利用 306 bp 的 MnSOD cDNA部分片段作為探針，與尼龍膜上的綠竹筍 genomic DNA 雜合。左邊標示為  $\lambda$  / *Hind* III DNA marker之各片段大小

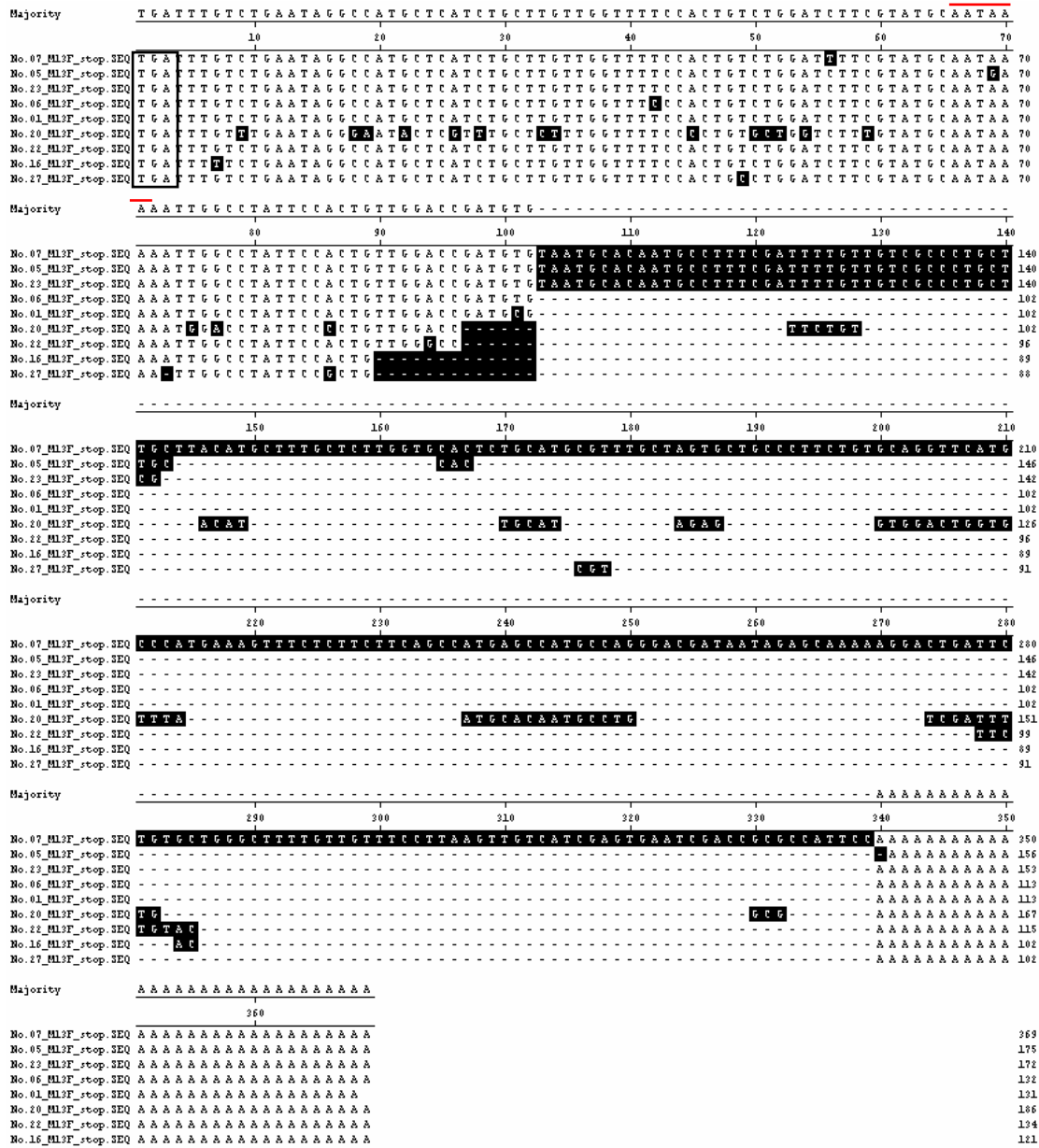


### 3.10 由 3',5'RACE 得到的 4 個 CuZnSOD , 2 個 MnSOD cDNA coding regions 以及 MnSOD 3'UTR 的序列比對

經 DNA STAR 軟體比對結果，發現 4 個 CuZnSOD 及 2 個 MnSOD 的 cDNA 序列，都具有很高的相似度，圖十三(A)、(B)。在 MnSOD 3'UTR 的比對結果，圖十四。也顯示其很可能有更多 MnSOD 基因，儘管 coding region 相似度很高。



圖十三：經由3',5'RACE所得到的(A)四個綠竹CuZnSOD基因之cDNA Coding region及(B) 兩個MnSOD基因之cDNA coding region，經由DNA STAR軟體比對結果



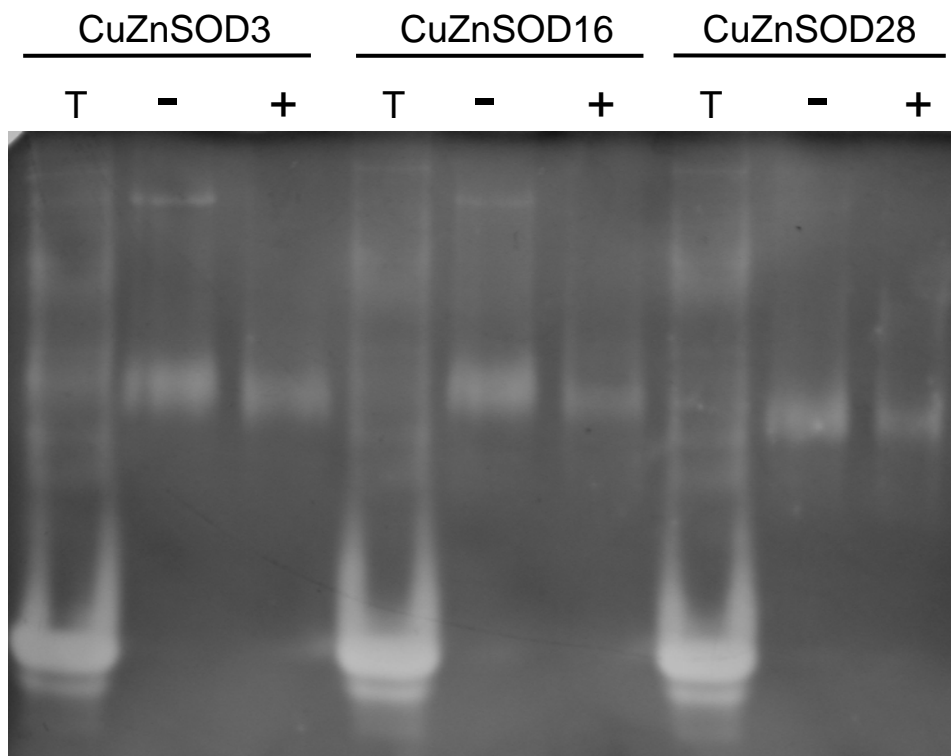
圖十四：MnSOD cDNA 序列在其 5'端設計專一性引子與 SMART RACE cDNA synthesis kit 中所付之 primers 進行 3'-end RACE 後，經 TA cloning，任選 10 clones 進行 sequencing，經 DNASTar 軟體比對之結果。此部份序列為由 stop codon (TGA)至 poly(A)- tail 比對結果。

### 3.11 大量表現 GST-CuZnSOD 及 GST-MnSOD 重組蛋白於大腸桿菌中，純化並進行活性染色

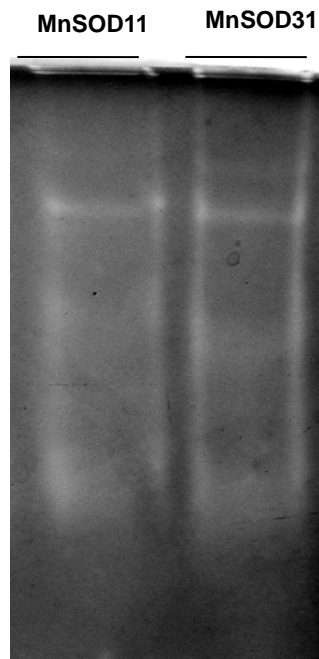
純化後的 GST-CuZnSOD 經活性染色的結果，圖十五(A)，觀察到重組蛋白具有 SOD 活性，並且能受到 CuZnSOD 的抑制劑所抑制，證明其應為

CuZnSOD。並發現 cDNA 相似度極高的重組蛋白，在 Native PAGE 上 SOD 活性條帶的位置，和活性強度各有不同。另外，純化的 GST-MnSOD 也在 Native PAGE 上有 SOD 活性表現。往後更可以進一步研究這些重組蛋白的生化特性。

(A)



(B)



圖十五：(A)大量表現三個綠竹CuZnSOD基因的GST-CuZnSOD重組蛋白在大腸桿菌(BL21-DE3)中，經純化後做活性染色及抑制劑處理(T) 經誘導大量表現重組蛋白的大腸桿菌的總蛋白，(-)4 $\mu$ g的重組蛋白(+) $4\mu$ g的重組蛋白，經40mM DDC處理, 37 $^{\circ}$ C, 1hr (DDC:Diethyldithiocarbamate)  
(B)大量表現二個綠竹MnSOD基因的GST-MnSOD重組蛋白在大腸桿菌(BL21-DE3)中，經純化後做活性染色, loading量皆為5 $\mu$ g

### 3.12 未來研究方向

對於 CuZnSOD、MnSOD 重組蛋白的生化特性分析；鈎取 CuZnSOD、MnSOD promoter region 並轉殖到阿拉伯芥中，觀察其是否易受逆境誘導？受何種逆境誘導？轉殖綠竹 SOD 基因到阿拉伯芥中，能否提高其抵抗逆境能力？

#### 四、參考文獻

- 陳銘坤。1998。阿拉伯芥表現水稻超氧歧化酶之研究。國立台灣大學植物學研究所碩士論文。
- 廖民惠。2003。綠竹筍 CuZnSOD cDNA 之選殖及生化特性之研究。國立台灣大學植物學研究所碩士論文。
- Alscher, R. G., Erturk, N., and Heath, L. (2002). Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Botany*. 372: 1331-1341.
- Bannister, W.H., Bannister, J.V., Barra, D., Bond, J., and Bossa, F. (1991) Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Radical Res. Commun.* 12-13, 349-361.
- Baum, J.A., and Scandalios, J.G. (1981) Isolation and characterization of the cytosolic and mitochondrial superoxide dismutases of maize. *Arch. Biochem. Biophys.* 206: 249-64.
- Beauchamp, C.O., and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
- Bordo, D., Djinovic, K., and Bolognesi, M. (1994) Conserved patterns in the Cu, Zn superoxide dismutase family. *J. Mol. Bio.* 238: 366-386.
- Bowler, C., Van Camp W., Van Montagu, M., and Inzé, D. (1994) Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 199-218.
- Cadenas, E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 79-110.
- Cannon, R.E., White, J.A., and Scandalios, J.G. (1987) Cloning of cDNA for maize superoxide dismutase 2 (SOD2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 179-83.
- Casareno, R.L.B., Waggoner, D. and Gitlin, J. D. (1998). The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 273: 23625-23628.
- Chen, C.N. and Pan, S.M. (1996). Assay of superoxide dismutase activity by combining electrophoresis and densitometry. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 37: 107-111.
- del Río, L.A., Pastori, G.M., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Jiménez, A., López-Huertas, E, and Hernández, A.J. (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* 116: 1195-2000.
- del Rio, L.A., Sandalios, L.M., Palma, J.M., Bueno, P., and Corpas, F.J. (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free*

- Radic. Biol. Med. 13: 557-80.
- Foster, J.G., and Edwards, G.E. (1980) Localization of superoxide dismutase in leaves from C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Plant Cell Physiol.* 21: 895–906.
- Fridovich I. (1986) Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 58: 61–97.
- Halliwell, B. (1987) Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem. Phys. Lipids.* 44: 327-340.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford.
- Hernandez, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F., and del Rio, L.A. 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.* 105: 151-167.
- Hibino, T., Masumura, T., Sasaki, Y., and Tanaka, K. (1990) Nucleotide sequence of cDNA for the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase from spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Nucleic Acids Res.* 18: 4923-4927.
- Hindges, R., and Slusarenko, A. (1992) cDNA and derived amino acid sequence of a cytosolic Cu, Zn superoxide dismutase from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Plant Mol. Biol.* 18: 123-125.
- Jackson, C., Dench, J., Moore, A.L., Halliwell, B., Foyer, C.H., and Hall, D.O. (1978) Subcellular localization and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. *Eur. J. Biochem.* 91: 339–344.
- Kanematsu, S., and Asada, K. (1979) Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 195: 535–545.
- Karpinski, S., Wingsle, G., Olsson, O. and Hallgren, J.E. (1992) Characterization of cDNAs encoding CuZn-superoxide dismutases in Scots pine. *Plant Mol. Biol.* 18: 545-555.
- Keegstra, K., Olsen, L.J., and Theg, S.M. (1989) Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 40: 471-502.
- Kleinhenz, V., Gosbee, M., Elsmore, S., Lyall, T.W., Blackburn, K., Harrower, K. and Midmore, D.J. (2000). Storage methods for extending shelf life of fresh, edible bamboo shoots (*Bambusa oldhamii* (Munro)). *Postharvest Biol. Tech.* 19: 253-264.
- Kliebenstein, D. J., Monde, R., and Last, R. L. (1998) Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol.* 118: 637-650.

- Lamb, A. L., Torres, A.S., O'Halloran, T.V. and Rosenzweig, A.C. (2000 a). Heterodimer formation between superoxide dismutase and its copper chaperone. *Biochemistry* 39: 14720-14727.
- Lamb, A.L., Wernimont, A.K., Pufahl, R.A., O'Halloran, T.V. and Rosenzweig, A.C. (2000 b). Crystal structure of the second domain of the human copper chaperone for superoxide dismutase. *Biochemistry* 39: 1589-1595.
- McKersie, B.D., Bowley, S.R. and Jones, K.S. (1999). Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 119: 830-847.
- Mehdy, M.C. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472.
- Miao, Z., and Gaynor, J. J. (1993). Molecular cloning, characterization and expression of Mn-superoxide dismutase from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Mol. Biol.* 23: 267-277.
- Ogawa, K., Kanematsu, S., and Asada, K. (1997) Generation of superoxide anion and localization of CuZn superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiol.* 38, 1118–1126.
- Ogawa, K., Kanematsu, S., and Asada, K. (1996) Intra- and extra-cellular localization of 'cytosolic' CuZn superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* 37: 790–799.
- Pan, S.M., Chen, M.K., Chung, M.H., Lee, K.W. and Chen, I.C. (2001). Expression and characterization of monocot rice cytosolic CuZnSOD protein in dicot *Arabidopsis*. *Transgenic Res.* 10: 343-351.
- Pan, S.M., Hwang, G.B. and Liu, H.C. (1999). Over-expression and characterization of copper/zinc-superoxide dismutase from rice in *Escherichia coli*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 275-281.
- Perl-Treves, R., and Galun, E. (1991) The tomato Cu-Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol.* 17: 745-760.
- Perl-Treves, R., Nacmias, B., Aviv, D., Zeelon, E.P. and Galun, E. (1988) Isolation of two cDNA clones from tomato containing two differential superoxide dismutase sequences. *Plant Mol. Biol.* 17: 745-760.
- Petrovic, N., Comi, A. and Ettinger, M.J. (1996). Identification of an apo-superoxide dismutase (Cu,Zn) pool in human lymphoblasts. *J. Biol. Chem.* 271: 28331-28334.
- Pitcher, L.H., and Zilinskas, B.A. (1996). Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to



- ozone-induced foliar necrosis. *Plant Physiol.* 110: 583-588.
- Pitcher, L.H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperaman, J.M., and Zilinskas, B.A. (1991). Overproduction of petunia chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 97: 452-455.
- Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C. and O'Halloran, T.V. (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-808.
- Rao, M.V., Paliyath, G. and Ormrod, D.P. (1996). Ultraviolet-B- and Ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 125-136.
- Sandalio, L.M., and del Rio, L.A. (1987) Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*: functional implications in cellular metabolism. *J. Plant Physiol.* 127: 395-409.
- Scandalis J G (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101: 7-12.
- Schmidt, P.J., Rae, T.D., Pufahl, R.A., Hamma, T., Strain, J., O'Halloran, T.V. and Culotta, V.C. (1999). Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 274: 23719-23725.
- Sen Gupta, A., Heinen, J.L., Holaday, A.S., Bruke, J.J., and Allen, R.D. (1993 a). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1629-1633.
- Sen Gupta, A., Webb, R.P., Holaday, A.S., and Allen, R.D. (1993 b). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.* 103, 1067-1073.
- Tepperman, J.M., and Dunsmuir, P. (1990). Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol. Biol.* 14: 501-511.
- Tzeng, YC. and Pan, S.M. (1999). Expression and characterization of rice manganese superoxide dismutase in *E. coli*. *Taiwania* 44: 479-490.
- Van Camp, W., Bowler, C., Villarreal, R., Tsang, E. W. T., Van Montagu, M. and Inze, D. (1990) Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9903-9907.
- Van Camp, W., Willekens, H., Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D., Reupold-Popp, P., Sandermann, J.H. and Langebartels, C. (1994). Elevated levels of superoxide

dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Biotechnology* 12: 165-168.

White, D.A., and Zilinskas, B.A. (1991) Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding pea cytosolic Copper/zinc superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 96: 1391-1392.

Wu, G., Wilen, R.W., Robertson, A.J., and Gusta, L.V. (1999) Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiol.* 120: 513–520.

Zhu, D., and Scandalios, J.G. (1993) Maize mitochondrial manganese superoxide dismutases are encoded by a differentially expressed multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9310–9314.

Zhu, H., Shipp, E. Sanchez, R.J., Liba, A. Stine, J.E., Hart, P.J., Gralla, E.B., Nersissian, A.M. and Valentine, J.S. (2000). Cobalt(2+) binding to human and tomato copper chaperone for superoxide dismutase: implications for the metal ion transfer mechanism. *Biochemistry* 39: 5413-5421.