

超氧阴离子自由基对绿豆黄化幼苗 ACC 合酶的影响

柯德森*, 孙谷畴

(中国科学院华南植物园, 广东广州 510650)

摘要: 以 0.5、5 和 50 mmol/L 的连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)为外源超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)源, 处理 20 min 能明显提高绿豆黄化幼苗 ACC 合酶 (ACC synthase, ACS, EC 4.4.1.14) 的活性。超氧阴离子自由基的特异性清除剂超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和 1,4-二氮杂二环(2,2,2)辛烷[1,4-diazabicyclo(2,2,2) Octane, DABCO] 能抑制 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的这种作用, 显示 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 产生的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 引起了 ACC 合酶活性的升高。但 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理较长时间, ACC 合酶活性开始下降, 处理 60 min 的 ACC 合酶活性明显低于对照, SOD 和 DABCO 的加入有助于抑制 ACC 合酶活性的降低, 表明超氧阴离子自由基对 ACC 合酶活性具有促进和抑制作用并存的“双重性”影响。研究表明, 外源 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理 20 min 能明显降低以 S-腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)为底物的 ACC 合酶的 K_m 值, 处理 60 min 反而提高了 ACC 合酶的 K_m 值, 表明 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 是通过改变 ACC 合酶对底物 SAM 的亲合力, 从而影响其活性的。

关键词: 超氧阴离子自由基; ACC 合酶; 连二亚硫酸钠

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395 (2004) 06-0495-06

The Effect of Superoxide Radical on the ACC Synthase from Etiolated Mungbean Seedlings

KE De-sen*, SUN Gu-chou

(South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: The activity of ACC synthase (ACS, EC 4.4.1.14) from etiolated mungbean seedlings was elevated obviously in treatment for 20 min with 0.5, 5 or 50 mmol/L of sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) which is generally used as an exogenous generator of superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Superoxide dismutase (SOD) or 1,4-diazabicycol (2,2,2) octane (DABCO), a special scavenger of $\text{O}_2^{\cdot-}$, could reduce the increase of ACC synthase activity induced by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, showing the promotion role of superoxide radical on the activity of ACC synthase. However, the activity of ACC synthase decreased as the treatment time extended. The activity of ACC synthase was even lower than the control when treated for 60 min with 5 or 50 mmol/L of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. The decline of activity of ACC synthase could be inhibited by adding SOD or DABCO. These results showed the dual-effect of superoxide radical on the activity of ACC synthase. The further studies indicated that K_m of ACC synthase, which substrate is S-adenosylmethionine (SAM), decreased in treatment for 20 min with exogenous generator of superoxide radical. However, in the treatment for 60 min with exogenous $\text{O}_2^{\cdot-}$, the value of K_m of ACC synthase increased obviously. The results showed that superoxide radical could change the properties of the ACC synthase, i.e., decreased its K_m value, increased the affinity to SAM, and thus, to alter the activity of ACC synthase. This might be the mechanism of the dual effect of superoxide radical on the activity of ACC synthase.

Key words: Superoxide radical; ACC synthase; Sodium dithionite

收稿日期: 2003-12-02 接受日期: 2004-04-05

* 通讯作者 Corresponding author

乙烯是一种重要的植物生长调节物质, 植物体内乙烯水平与种子萌发、植株生长发育、开花结果及成熟衰老等过程密切相关^[1,2]。ACC 合酶(ACC synthase, ACS, EC 4.4.1.14)是植物体内乙烯生物合成过程的关键调控酶, 催化从 S-腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)生成 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)的反应过程, 是乙烯生物合成过程的主要限速步骤。因此, 调节 ACC 合酶的活性是乙烯生物合成过程调控的主要方式^[3-5]。目前最常用的乙烯生物合成调节剂, 如氨基羟乙酸(aminooxyacetic acid, AOA)和氨氧乙烯基甘氨酸(aminoethoxyvinylglycine, AVG), 主要是 ACC 合酶的竞争性抑制剂, 不能满足生产实践上灵活调控乙烯产生的要求^[6]。Baker 等^[6]于 1978 年发现, 1 mmol/L 的超氧阴离子自由基(superoxide radical, O₂⁻) 特异性抑制剂 n-没食子酸丙酯(n-propyl gallate)和苯甲酸钠(sodium benzoate)能明显抑制植物组织中乙烯的产生, 从而提出 O₂⁻可能参与植物乙烯生物合成过程的推论。其后的研究表明, 一定浓度的 O₂⁻ 处理能显著提高植物乙烯的产生水平, 显示 O₂⁻ 作为乙烯生物合成促进剂的可能性^[7-9]。我们最近的研究表明^[10,11], 超氧阴离子自由基处理一定时间对绿豆黄化幼苗的乙烯产生有明显的促进作用, 但高浓度的 O₂⁻ 处理较长时间则表现出抑制作用, 显示 O₂⁻ 对绿豆黄化幼苗的乙烯产生具有明显的“双重性”影响。这个结果表明, 超氧阴离子自由基作为一种新的乙烯调控因素具有更加灵活高效的优点, 但其机制却不是很清楚。目前对 O₂⁻ 的研究主要集中在其破坏性上^[12,13], 对 O₂⁻ 在生物体正常生理代谢过程中的调控作用研究甚少。本文通过研究超氧阴离子自由基对绿豆黄化幼苗 ACC 合酶的活性及酶学特性的影响, 试图阐明超氧阴离子自由基在植物乙烯生物合成过程具有双重性作用的机制。

1 材料和方法

1.1 植物材料

市售绿豆(*Phaseolus radiatus* L.)新鲜种子, 用蒸馏水洗涤干净后浸泡 24 h, 其间用气泵不断充气。然后将吸涨的种子用无菌水泡洗 3 遍, 再置于湿润的滤纸上, 于 25℃ 下在黑暗中萌发。每天用蒸馏水洗涤幼苗一次。萌发 7 d 后选取生长基本一致的幼苗为实验材料。

1.2 ACC 合酶提取

参照 Tsai 等^[14]的方法提取绿豆 ACC 合酶。1 000 g 绿豆黄化幼苗, 加入 1 000 ml 提取液, 于 0℃ 迅速研磨, 提取液含 1.2 mol/L 磷酸钾(pH 8.0)缓冲液, 4 mmol/L 的二硫苏糖醇(dithioerythritol, DTE), 0.5 μmol/L 的磷酸吡哆醛(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)。匀浆液迅速用三层纱布过滤, 滤液于 15 000×g 离心 20 min, 弃沉淀, 收集上清液, 将收集到的清液用 Sephadex G 25 脱盐, 得到 ACC 合酶的粗提液。慢慢加入硫酸铵使达到 40% 的饱和度, 充分搅拌均匀, 0℃ 静置过夜, 4℃ 5 000×g 离心 30 min, 得清液。继续加入 (NH₄)₂SO₄ 使其达到 75% 的饱和度, 静置过夜, 离心得沉淀。沉淀溶于 20 ml 缓冲液中(含 20 mmol/L pH 8.0 磷酸钾缓冲液, 0.4 mmol/L DTE, 0.5 μmol/L 的 PLP), 用同样的缓冲液透析 3 d, 过滤得清液。将清液用 20% (w/w) 的聚乙二醇(PEG6000)透析浓缩, 然后用 DEAE Sephadex A 25 层析, 层析柱(5 cm×30 cm)用缓冲液(20 mmol/L pH 8.0 的磷酸钾缓冲液, 含 0.4 mmol/L DTE, 0.5 μmol/L 的 PLP)平衡, 先用上述缓冲液 200 ml 以 4 ml min⁻¹ 的流速洗脱, 然后用含有 0-200 mmol/L 浓度梯度的 KCl 的上述缓冲液洗脱, 流速 2 ml min⁻¹, 收集洗脱液 150 份, 每份 3 ml, 测量活性并合并有活性的洗脱液, 用 20% 的聚乙二醇(w/w)透析浓缩至 30 ml, 然后用缓冲液透析 2 d, 离心去沉淀得部份纯化的 ACC 合酶(比活性为 400.7 U mg⁻¹ Protein)用于以下实验。

1.3 外源超氧阴离子自由基处理

每份取 0.1 ml (约相当于 25 μg 蛋白) ACC 合酶, 分别加入终浓度为 0.5 mmol/L, 5 mmol/L 和 50 mmol/L 的连二亚硫酸钠(Na₂S₂O₄)作为外源超氧阴离子自由基源, 30℃ 培养 20、40 和 60 min, 然后测量 ACC 合酶活性及酶促反应动力学特性的变化。

1.4 ACC 合酶活性测定

参照 Tsai 等^[14]的方法。8 ml 的带胶塞的标定了体积的试管, 加入 1 ml 反应缓冲液, 其中含 100 mmol/L pH 8.0 磷酸缓冲液, 终浓度为 400 μmol/L 的 SAM, 0.5 μmol/L 的 PLP, 再加入 0.1 ml 的酶提取液, 然后于 30℃ 培养 10 min, 加入 500 μl 预冷的 20 mmol/L 的 HgCl₂ 以终止反应。测定反应前后 ACC 含量的变化, 以 1 h 催化形成 1 nmol/L ACC 的酶量定义为 1 个酶活性单位。

1.5 ACC 含量测定

参照董建国和李振国^[15]的方法。将上述加入了 HgCl₂ 终止反应的试管放入冰浴中预冷 3 min, 用胶塞密封管口, 注入 100 μl 的预冷的 NaOCl-NaOH 混合液 (5% NaOCl: 饱和 NaOH, 2: 1, V/V), 立即在旋涡混合器上振动 5 s, 反应 3 min, 抽取反应后的气样 1 ml 测量乙烯的产生, 以乙烯的生成量计算 ACC 的含量。

1.6 ACC 合酶相对底物 SAM 的米氏常数 Km (SAM) 的计算^[16]

按照以上测量 ACC 合酶活性的方法, 加入 0, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 400 μmol/L 不同浓度的 SAM, 测定不同底物浓度下的反应速度 *v* 值, 以 1/*v* 对 1/[S] 作图, 根据双倒数法, 通过公式 $1/v = (K_m/V_{max})/(1/[S]) + 1/V_{max}$, 求得 30℃ 下 ACC 合酶对 SAM 底物的 Km 值。

1.7 数据处理和统计

每个实验重复 5 次, 取其平均值。利用 Microsoft Excel 2002 的 Stdevp 函数计算基于所得到 5 个数据的标准误差 (SE)。

2 结果和讨论

2.1 超氧阴离子自由基对 ACC 合酶活性的影响

从图 1A 可见, 0.5、5 和 50 mmol/L 的 Na₂S₂O₄ 处理 20 min 能明显提高绿豆黄化幼苗 ACC 合酶的活性。0.5 和 5 mmol/L 的 Na₂S₂O₄ 处理 40 min 的 ACC 合酶活性继续保持较高水平, 而此时 50 mmol/L Na₂S₂O₄ 处理的已开始下降。至 60 min 时, 三种处理的 ACC 合酶活性都不同程度地下降, 其中 5 mmol/L 和 50 mmol/L Na₂S₂O₄ 处理的 ACC 合酶活性甚至低于对照。由于 Na₂S₂O₄ 是超氧阴离子自由基的外源产生剂, 所以它对 ACC 合酶活性的影响可能是通

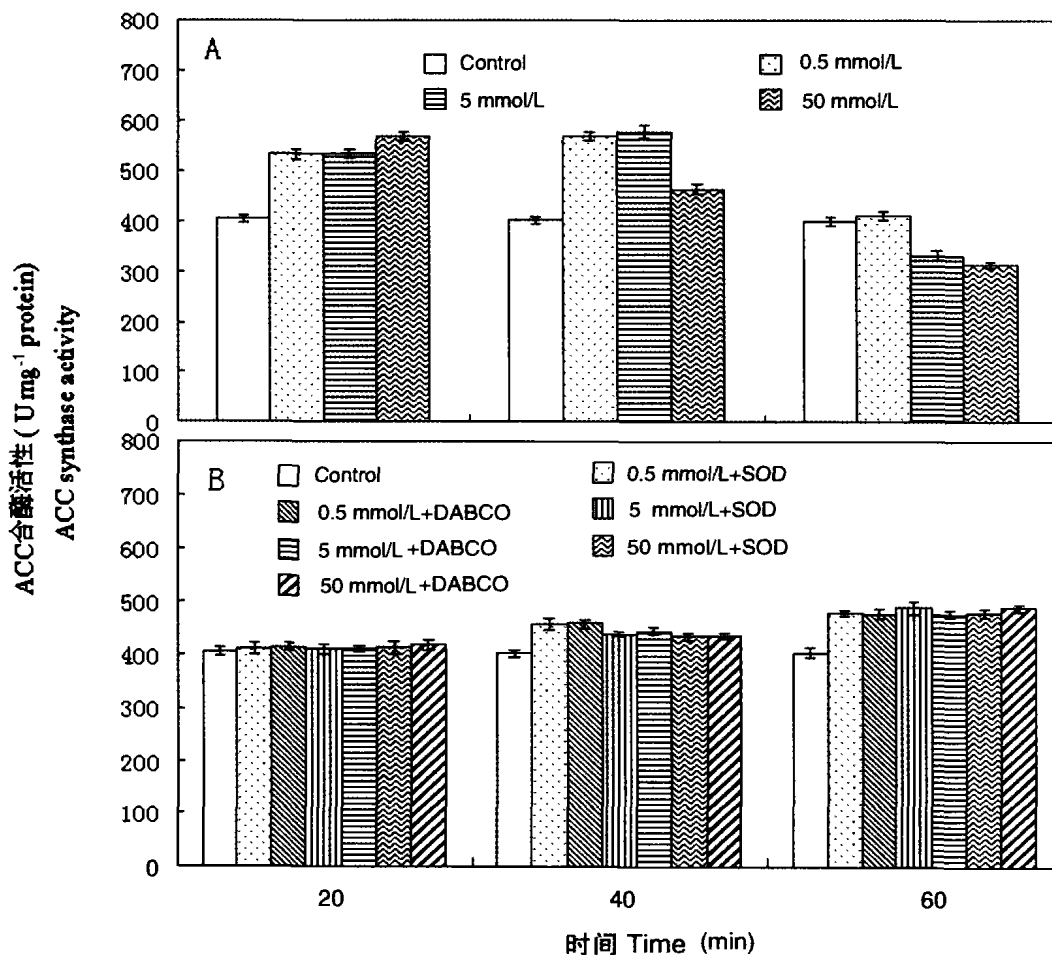


图 1 超氧阴离子自由基对绿豆黄化幼苗 ACC 合酶活性的影响

Fig.1 The effect of superoxide radical on the activity of ACC synthase from etiolated mungbean seedlings

A: Na₂S₂O₄; B: Na₂S₂O₄+SOD or +DABCO

过其产生的 O_2^- 而起作用的。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和 1,4-二氮杂二环 (2,2,2) 辛烷 [1,4-diazabicyclo(2,2,2) Octane, DABCO] 是 O_2^- 的特异性清除剂^[7]。在上述处理中分别加入 30 U ml^{-1} 的 SOD 或 10 mmol/L 的 DABCO 可以明显抵消 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 对 ACC 合酶活性的影响, 几乎完全抑制了 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理 20 min 对 ACC 合酶活性的促进作用, 对处理 40 min 的 ACC 合酶活性的上升也有明显的抑制作用。另一方面, 当外源 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理 60 min 时, 加入 SOD 和 DABCO 处理的 ACC 合酶活性与不加 SOD 和 DABCO 的处理相比, 不仅没有下降, 反而有明显的升高 (图 1B)。这就进一步表明 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 是通过其产生的 O_2^- 来影响 ACC 合酶活性的。由此可见, 一定浓度的超氧阴离子自由基可能有助于提高绿豆黄化幼苗 ACC 合酶活性, 但当超氧阴离子自由基浓度高于一定程度或处理时间较长时, 可能造成 ACC 合酶蛋白结构的破坏, 从而引起 ACC 合酶活性的下降, 显示了 O_2^- 对 ACC 合酶活性的“双重性”影响。

2.2 超氧阴离子自由基对 ACC 合酶酶促反应动力学特性的影响

在 30°C pH 8.0 下, 测量提取的 ACC 合酶催化反应的速率与底物 SAM 浓度的关系。结果显示, 该

酶催化反应速率(v)随底物浓度[SAM]的变化规律符合典型的米氏动力学方程 (图 2A)。通过双倒数法^[9]作图 (图 2B), 利用 Microsoft Excel 的自动统计功能得到 $1/v$ 对 $1/[\text{SAM}]$ 的线性回归方程, 通过计算可得到正常生长条件下绿豆黄化幼苗 ACC 合酶的米氏常数 K_m 值为 $52.32\ \mu\text{mol/L}$ 。从图 2 还可以看到, 0.5 、 5 和 50 mmol/L 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理 20 min 的绿豆黄化幼苗 ACC 合酶催化的酶促反应仍符合典型的米氏动力学方程, 但其 K_m 值却有明显的下降。根据米氏酶促反应动力学理论^[10], K_m 值的大小近似地与酶促反应中酶对底物的亲和力成反比。由此可见, 一定浓度的超氧阴离子自由基处理较短时间有助于提高 ACC 合酶对底物 SAM 的亲和力, 这可能是超氧阴离子自由基能够诱导 ACC 合酶活性上升的原因。分别加入 30 U ml^{-1} 的 SOD 或 10 mmol/L 的 DABCO, 处理 20 min 后绿豆黄化幼苗 ACC 合酶的 K_m 值明显高于不加 SOD 或 DABCO 处理的 (表 1), 结果进一步支持上述结论。图 3 显示, 0.5 、 5 和 50 mmol/L 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理 60 min 的 ACC 合酶催化的酶促反应仍符合典型的米氏动力学方程, 而其 K_m 值却比对照有明显的上升。说明 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理较长时间可能引起 ACC 合酶的损伤, 使 ACC 合酶对其底物 SAM 的亲和力下降, 从而引起 ACC 合酶活性的下降。从表 1 可见,

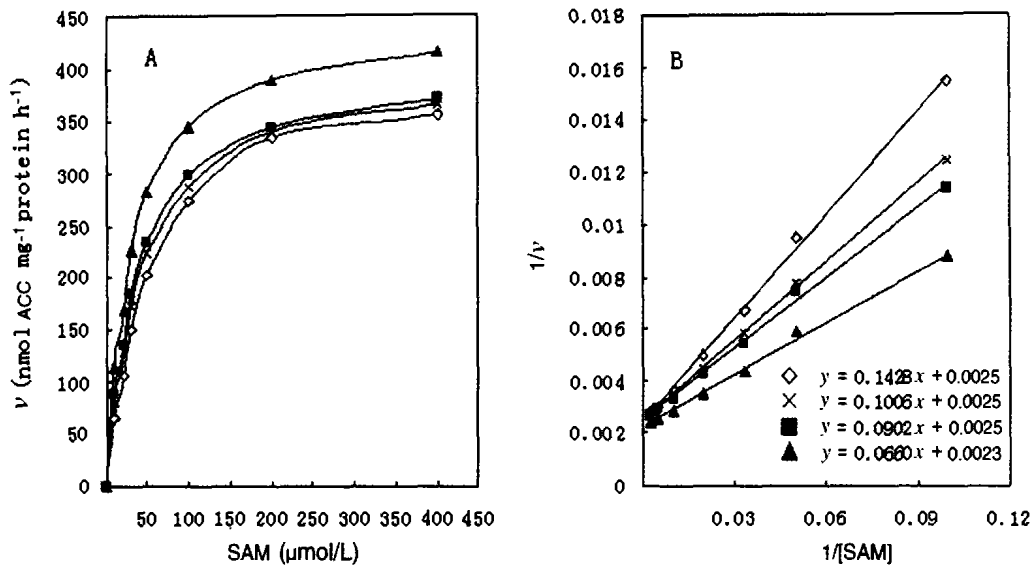


图 2 外源 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理 20 min 的绿豆幼苗 ACC 合酶催化反应速度与底物浓度的关系

Fig. 2 The relationship between reaction rate and substrate concentration for ACS from the etiolated mungbean seedlings treated with exogenous $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ for 20 min

A: ACS 催化反应速度与底物浓度的关系 Reaction rate in relation to SAM concentration;

B: ACS 对 SAM 的米氏常数计算 The estimate of K_m for SAM

◇ Control: $K_m=52.32\ \mu\text{mol/L}$

× 0.5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$: $K_m=40.24\ \mu\text{mol/L}$

■ 5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$: $K_m=36.08\ \mu\text{mol/L}$

▲ 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$: $K_m=27.78\ \mu\text{mol/L}$

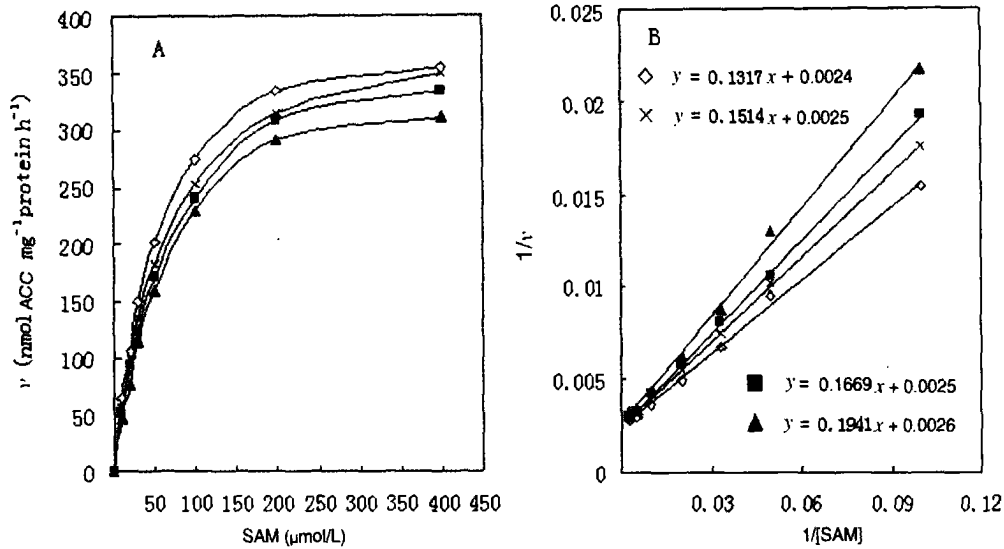


图 3 外源处理 60 min 的绿豆幼苗 ACC 合酶催化反应速度与底物浓度的关系

Fig. 3 The relationship between reaction rate and substrate concentration for ACS from the etiolated mungbean seedlings treated with exogenous $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ for 60 min

A: ACS 催化反应速度与底物浓度的关系 Reaction rate in relation to SAM concentration;

B: ACS 对 SAM 的米氏常数计算 The estimate of K_m for SAM

\diamond Control: $K_m=54.82 \mu\text{mol/L}$ \times 0.5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$: $K_m=60.41 \mu\text{mol/L}$

\blacksquare 5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$: $K_m=66.76 \mu\text{mol/L}$ \blacktriangle 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$: $K_m=74.65 \mu\text{mol/L}$

表 1 SOD 和 DABCO 对绿豆黄化幼苗 ACC 合酶 K_m 值的影响

Table 1 The effect of SOD and DABCO on K_m value for ACC synthase from etiolated mungbean seedlings

处理 Treatments	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	
	20 min	60 min
Control	52.32±1.8	54.82±2.1
0.5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	40.24±1.3	60.41±0.2
0.5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ +SOD	50.06±1.6	48.36±2.6
0.5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ +DABCO	51.22±2.2	47.68±1.8
5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	36.06±0.9	66.74±1.9
5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ +SOD	48.22±1.5	52.95±2.3
5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ +DABCO	47.31±2.4	53.21±3.7
50 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	27.28±0.8	74.65±0.9
50 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ +SOD	41.39±0.9	55.54±3.3
50 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ +DABCO	42.56±2.5	56.63±2.8

30 U ml^{-1} 的 SOD 或 10 mmol/L 的 DABCO 的加入使外源 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理 60 min 的 ACC 合酶的 K_m 值上升幅度减小, 表明外源 O_2^- 特异性清除剂有助于保护 ACC 合酶活性, 保持其对底物的亲和力, 结果进一步证明了是外源 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 产生的 O_2^- 引起了处理后 ACC 合酶 K_m 值的上升。

柯德森等的研究表明^[1], 外源 IAA 处理绿豆黄化幼苗可诱导幼苗植株内 ACC 合酶活性的上升, 并且证明 IAA 是通过诱导产生超氧阴离子自由基

而起作用的。但是, 由于在植物活体内存在着各种代谢过程, 因此该研究结果可能有二种原因, 即 O_2^- 是直接作用于 ACC 合酶, 从而诱导酶活性的提高, 或 O_2^- 作为一种信号启动植物体内的其他代谢过程, 从而间接引起 ACC 合酶活性的升高。本研究利用外源超氧阴离子产生及清除剂直接处理离体的绿豆黄化幼苗 ACC 合酶, 由于在离体状态下不存在感受 O_2^- 信号诱导其他代谢过程的可能, 因此本研究的结果证明了超氧阴离子自由基可直接作用于 ACC 合酶, 从而诱导其活性的变化, 这是超氧阴离子自由基参与乙烯生物合成机制研究的一项非常有意义的发现。上述关于 O_2^- 对 ACC 合酶酶促反应动力学特性影响的研究结果表明, 超氧阴离子自由基处理可直接引起 ACC 合酶酶学性质的变化, 改变其 K_m 值, 诱导酶对其底物 SAM 亲和力的变化, 这可能是 O_2^- 对 ACC 合酶活性具有“双重性”影响的主要机制之一。

参考文献

[1] Nara A, Takeuchi Y. Ethylene evolution from tobacco leaves irradiated with UV-B [J]. J Plant Res, 2002, 115:247-253.
 [2] Tang F Q(汤福强), Liu Y (刘愚). Process of the study on ethylene biosynthesis in plant [J]. Plant Physiol Comm (植物生理学通讯), 1994, 30(1):3-10. (in Chinese)

- [3] Tarun A S, Lee J S, Theologis A. Random mutagenesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase: A key enzyme in ethylene biosynthesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 9796-9801.
- [4] Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1984, 35:155-189.
- [5] Moeder W, Barry C S, Tauriainen A A, et al. Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato [J]. Plant Physiol, 2002, 130:1918-1926.
- [6] Baker J E, Lieberman M, Anderson J D. Inhibition of ethylene production in fruit slices by a rhizobitoxine analog and free radical scavengers [J]. Plant Physiol, 1978, 61:886-888.
- [7] Watanabe T, Seo S, Sakai S. Wound-induced expression of a gene for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and ethylene production are regulated by both reactive oxygen species and jasmonic acid in *Cucurbita maxima* [J]. Plant Physiol Biochem, 2001, 39:121-127.
- [8] Watanabe T, Sakai S. Effect of active oxygen species and methyl jasmonate on expression of the gene for a wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in winter squash (*Cucurbita maxima*) [J]. Planta, 1998, 206:570-576.
- [9] Nandwal A S, Maan A, Kundu B S, et al. Ethylene evolution and antioxidant defense mechanism in *Cicer arietinum* root in the presence of nitrate and aminoethoxyvinylglycine [J]. Plant Physiol Biochem, 2000, 38:709-715.
- [10] Ke D S (柯德森), Sun G C (孙谷畴), Wang A G (王爱国), et al. The role of active oxygen in chilling-induced ethylene production in etiolated mungbean seedlings [J]. J Plant Physiol Mol Biol (植物生理与分子生物学报), 2003, 29(2):127-132. (in Chinese)
- [11] Ke D S, Sun G C, Wang A G, et al. The effect of active oxygen on the activity of ACC synthase induced by exogenous IAA [J]. Acta Bot Sin, 2002, 44(5):551-556.
- [12] Wang A G (王爱国), Luo G H (罗广华), Shao C B (邵从本), et al. Oxygen metabolism of plant and the injury of cells by the activated oxygen [A]. In: Acta Botanica Austro Sinica, Vol.5 [C]. Beijing: Science Press, 1989. 11-24. (in Chinese)
- [13] Zhang W L (张文玲), Wei L Q (魏丽群), Wang L S (王林嵩), et al. Oxidative damage of active oxygen on biomacromolecules [J]. Henan Norml Univ (Natl Sci) (河南师范大学学报), 2000, 28(4): 69-71. (in Chinese)
- [14] Tsai D S, Artega R N, Bachman J M, et al. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from etiolated mung bean hypocotyls [J]. Arch Biochem Biophys, 1988, 264:632-640.
- [15] Dong J G (董建国), Li Z G (李振国). The assay for the intermediate of ethylene biosynthesis, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate and malonate ACC [J]. Plant Physiol Comm (植物生理学通讯), 1983, (6):46-48. (in Chinese)
- [16] Shen T (沈同), Wang J Y (王镜岩), Zhao B D (赵邦悌). Biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 1985. 232-245. (in Chinese)
- [17] Cohen G. The fenton reaction [A]. In: Greenwald R A. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research [M]. Third ed. Boca Raton, Florida; CRC Press, 1987. 55-70.