

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC94-01

計畫名稱：利用生物技術法製造抗氧化酵素

執行期間：94年1月1日至94年12月31日

<input checked="" type="checkbox"/> 整合型計畫	<input type="checkbox"/> 個別型計畫
計畫總主持人：陳榮秀	計畫主持人：
子計畫主持人：洪偉章	

中華民國 95 年 2 月 27 日

一、摘要：

游離自由基(free radicals)的產生是因為氧分子或氫氧化合物上有一些不成對的電子，例如 $\cdot\text{O}_2^-$ (superoxide anion radical) 和 $\cdot\text{OH}$ (hydroxyl radical) 等，皆會對細胞產生毒害；另尚有一些活化態氧化物 (ROS, reactive oxygen species) 也會影響細胞的代謝而造成其加速老化，如 H_2O_2 。若能將一些抗氧化酶加入化粧品之產品中，如超氧歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、過氧化氫酶(Catalase)、抗壞血酸過氧化酶(APX, Ascorbate peroxidase) 等，將可有效防止自由基及過氧化物對細胞產生嚴重的傷害而導致其老化或死亡，目前已選殖出一段 1063 bps 長度之小球藻 SOD 基因，可轉譯出 203 個胺基酸的蛋白質，此 SOD 酵素的分子量約為 22.3 kDa，其 DNA 和胺基酸序列都與單胞藻有最高之相似度，分別有 73.5% 及 70.5% 之相似度。

關鍵字：游離自由基、活化態氧化物、超氧歧化酶、過氧化氫酶、
抗壞血酸過氧化酶。

二、研究計畫內容：

(一) 研究計畫之背景及目的

一般如果生物體內活性氧(activated oxygen)過多時，體內的

抗氧化系統與活性氧分子就無法維持平衡(oxidative balance)，因而產生氧化壓力(oxidative stress)，引起老化及其他病變。天然抗氧化劑，除了維生素C、維生素E、及類胡蘿蔔素(carotenoid)之外，還有類黃酮(flavonoid)與多酚類(polyphenol)等亦具有抗氧化的能力。

(a) 自由基定義

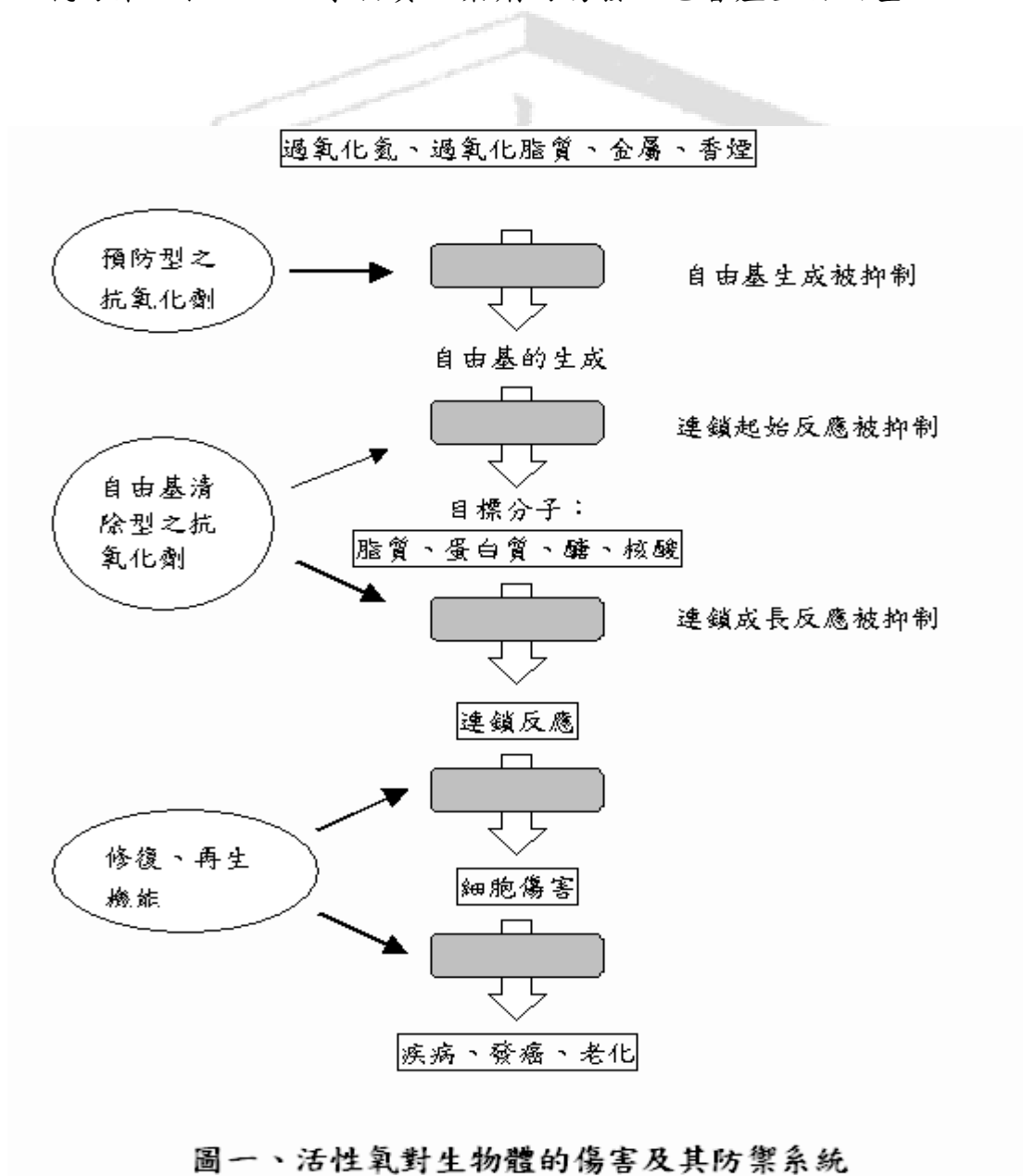
自由基(free radical)含有一個或多個不成對電子的原子、分子或離子(Halliwell and Gutteridge, 1989)，化性大部分處於極不穩定的狀態，反應性較其他分子高，會搶奪鄰近分子的電子形成電子對，使其達到穩定的狀態，被搶奪電子的分子則會變得不穩定，若又具有高度的活動性則會造成連鎖反應(chain reaction)，促使自由基的產生(Halliwell *et al.*, 1992)。

(b) 活性氧定義

氧(oxygen)以安定的三重態氧(triplet state oxygen, $3O_2$)存在於大氣中。氧可經由電子轉移及能量轉移活化成為反應性較強的含氧分子稱為活性氧(activated oxygen)。包括單重態氧(singlet oxygen, 1O_2)、超氧陰離子(superoxide anion, $(\cdot O_2^-)$)、氫氧自由基(hydroxyl radical, $(\cdot OH)$)、過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)、烷氧自由基(alkoxyl, $RO\cdot$)等。

(c) 自由基與活性氧產生途徑

自由基的產生是因體內的抗氧化防禦系統未能達到平衡狀態而造成壓力，稱作氧化壓力(oxidative stress)(Sies, 1991)。在生物體中，抗氧化物減少、活性氧產生之增加及游離態過渡金屬的增加，都會造成氧化壓力(Chen *et al.*, 1998)。外在環境中的離子輻射、空氣污染、抽煙、化學物質及藥劑的誘發，也會產生自由基。



圖一、活性氧對生物體的傷害及其防禦系統

(d) 抗氧化酵素和抗氧化物

抗氧化防禦系統(包括抗氧化物或抗氧化酵素)可以減低活性氧及自由基的產生。抗氧化物有維生素E(vit E)、維生素C(vit C)、胡蘿蔔素(β -carotene)、尿酸(uric acid)，植物體內的抗氧化物質，如類黃酮、多酚類等。類黃酮的解釋是植物性黃色素，不同的結構會產生不同的物性和化性，植物體中的類黃酮需要光線照射，種植於溫室的植物其類黃酮含量會降低。多酚類在植物體內的功能是防禦紫外線、抑制植物體過氧化作用。抗氧化酵素包括：超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)，麩胱苷過氧化酶(glutathione peroxidase, GSH Pxs)以及過氧化氫酶(catalase)等。SOD會進行歧化反應(dismutation reaction)($2\cdot O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)，反應中所產生的 H_2O_2 會被GSH Pxs 及catalase 代謝成 H_2O 。SOD 是一種金屬酵素(metalloenzymes)，大致可分三類：銅/鋅型、鐵型及錳型SOD。GSH Pxs 在生物體內負責清除 H_2O_2 ，其將 H_2O_2 或 $ROOH$ 還原成 H_2O 或 ROH ($2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ 或 $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH$)。catalase 利用 H_2O_2 做雙分子的歧化作用($2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$)。

本研究目的為選殖具有抗氧化功能的基因，進而利用生物技術方法，大量表現與製造其抗氧化活性蛋白質，且開發應用於化粧品產業中。

(二) 研究方法、進行步驟

1. 訊息 RNA (mRNA) 之萃取：

將培養的綠藻細胞加入含有 4 M Guanidine isothiocyanate , 10 mM Na₂EDTA , 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 和 8 % β -mercaptoethanol 的裂解緩衝液 (lysis buffer) 中均質化 , 以 11,000x g 離心 15 分鐘 , 去除不溶的物質 , 總 RNA (total RNA) 以 4 M LiCl 在 4°C 下過夜沈澱下來 , 經過 3 M LiCl 清洗後 , 最後的 RNA 沈澱再以 RNA 可溶緩衝液 (0.1 % SDS , 10 mM Tris-HCl , pH 7.5 , 1 mM EDTA) 回溶 , 回溶的 RNA 以 phenol 和 chloroform 各萃取一次 , 最後用 isopropanol 沈澱 RNA 。接著將 poly (A)⁺RNA 以 oligo (dT) -cellulose 管柱 (Gibco BRL) 層析分離下來。

2. 反轉錄酶-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) ：

將由上述步驟所獲得的訊息 RNA , 於混合試劑中含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 、 75 mM KCl 、 3 mM MgCl₂ 、 20 mM DTT 、 500 μ M dNTPs 、 0.1 g/ μ l BSA 、 100 ng/ μ l primer 、 1 U/ μ l RNase inhibitor 、 2.5 U/ μ l MMLV 逆轉錄酶 , 經由 MMLV 逆轉錄酶合成第一股 cDNA , 將合成之第一股 cDNA 直接當作模

版(templates)，進行聚合酶連鎖反應(PCR)快速複製目標基因之 DNA 片段，此聚合酶連鎖反應的混合試劑中含有 1X reaction buffer、合成之第一股 cDNA、5 mM 5' - & 3' -primers、200 μ M dNTPs、2.5 U Taq DNA polymerase；其反應的條件為 94°C 5 min, 1 cycle、94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 2 min, 35 cycles、72°C 10min, 1 cycle，經 PCR 放大之 DNA 片段以 1.5% agarose gel 進行電泳分析並觀察實驗結果。

3. 快速複製 5' -cDNA 端系統 (5' -RACE) (*Rapid Amplification of cDNA Ends kit, GIBCO BRL*)

第一股 cDNA 合成是將 total RNA (1-5 μ g)、FeSOD 基因特定引子(2.5 pmoles, 5' -TCT TGC TCT CAA GGT TAC TG-3') and DEPC-處理水混合均勻後，在 70°C 反應 10 分鐘後放在冰上 1 分鐘，然後加入下列成分混合，在 42 °C 進行反應 1 分鐘：1 \times PCR reaction buffer、25 mM MgCl₂、10 mM dNTP mix 和 0.1M DTT，再加 1 μ l (200U) SuperScript II reverse transcriptase 在 42°C 反應 50 分鐘。經純化管柱純化後再以 70% 酒精沉澱，最後加 50 μ l 在 65°C 預熱過的無菌水，以 13,000 \times g 離心沖提 cDNA，取 10 μ l cDNA 以 2 mM dCTP、1 \times tailing buffer 在 94°C 反

應 3 分鐘，放在冰上 1 分鐘 再加 1 μ l terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 在 37°C 反應 10 分鐘，所得 tailed cDNA 當作以後大量複製 DNA 反應之模板。

4. 快速複製 3' -cDNA 端系統(3' -RACE system)

第一股 cDNA 合成完後，取 5 μ l 第一股 cDNA 與 3 μ l 之 2.5 mM dNTP、5 μ l 之 10 \times PCR reaction buffer、2 μ l 之 10 μ M oligo-d(T)₁₈ primer、2 μ l 之 10 μ M FeSOD specific primer (5' -CTG GTG GAG GAG AGC AAG AC-3') 與 0.5 μ l of *Taq* DNA polymerase (TaKaRa)，加無菌水最後體積到達 50 μ l，PCR 反應的條件為變性溫度 94°C 反應 1 分鐘、粘合溫度 45°C 反應 1 分鐘、延伸溫度 72°C 反應 2 分鐘，共 35 個循環週期。

三、完成之成果

已選殖出一段 1063 bps 長度之小球藻 SOD 基因(見圖一)，可轉譯出 203 個胺基酸的蛋白質，此 SOD 酵素的分子量約為 22.3 kDa，其 DNA 和胺基酸序列都與單胞藻 Fe-SOD 有最高之相似度，分別有 73.5 % 及 70.5 % 之相似度(見圖二、三)，因此其屬於鐵型 SOD 形式。另外，在表一可觀察到此 SOD 基因與雙子葉植物，如阿拉伯芥和菸草亦

分別有 62.6 % 與 62 % 之相似度；與單子葉植物，如稻米有 57 % 之相似度；與細菌，如 *Cyanobacteria* 有 59 % 之相似度；與昆蟲，如 *Babesia bovis* 有 56.5 % 之相似度；與真菌類則有 53.5 % 之相似度。

此 SOD 基因與錳型 SOD 也有 55 % 之相似度，可見鐵型與錳型 SOD 基因有一半以上之序列相同存在，在生物之基因演化上有很高關連性。除此之外，從以往之研究得知其重要之酵素催化區即鐵離子結合區位於 His27、His79、Asp163 與 His167 等四個胺基酸上。

圖一、 The full length of cDNA sequence of FeSOD gene from *C. pyrenoidosa*.

Accession number is DQ183067.

The two codons in block represent the start and stop position of the open reading frame, respectively. The codons underlined are 5' and 3'-untranslated regions, and boldface of amino acid letters are the predictive positions for iron binding sites at the enzyme active center. ←, a specific primer of 5'-RACE system ; →, a specific primer of 3'-RACE system.

TCAAACGTCTGCATCGTACTTGTACAGGTGAAAGCTCCTTGGAACAGATCCTTGTAGACTCTTCCTTT
 CTTCTTGCACCATG CCA TTC CAG CTG CCC CCT CTT CCG TAT GCT ATA AAT GCT TTG
 M P F Q L P P L P Y A I N A L
 GAG CCC CAC ATG TCT CAG AAG TCG CTG GAG TTT CAT TAT GGC AAG CAC CAT CAG
 E P H M S Q K S L E F **H** Y G K H H Q
 ACA TAC TTG GAT AAT ATG AAC AAG CGG ATT GCT GGC AGT AAC CTT GAG AGC AAG
 T Y L D N M N K R I A G S N L E S K
 ACC CTT GAG GAG GTT ATC AAG GAG AGT TGG AAC AAT GGC AGC CCT ACA GCA GTG
 T L E E V I K E S W N N G S P T A V
 TTC AAC AAT GCT GCT CAG GTC TGG AAC CAC ACA TTC TTT TGG GAG AGC ATG AAA
 F N N A A Q V W N **H** T F F W E S M K
 CCC AAT GGT GGT GGT GCA CCC AGC GGC AAA CTA GCA GAG GCC ATC AAT GCA GCT
 P N G G G A P S G K L A E A I N A A

TCT GGC AGT CTG GAT GAC TTT AAG GCA CAG TTC AAG AAT GCA GGT GCT ACT CAG
 S G S L D D F K A Q F K N A G A T Q
 TTT GGC TCT GGC TGG GCA TGG CTT GTG ACT GAC AAG TCT GGC AAG TTG TCT ATT
 F G S G W A W L V T D K S G K L S I
 GAG AAG ACC CCC AAT GCC GTG ACA CCC CTG GTG GAG GAG AGC AAG ACA CCC ATT
 E K T P N A V T P L V E E S K T P I
 CTG ACG ATG GAT GTC TGG GAG CAT GCA TAC TAC CTG GAT GTG CAG AAC AGG AGG
 L T M **D** V W E **H** A Y Y L D V Q N R R
 CCT GAC TAC ATG ACG ACA TTT GTT GAC AGC CTC ATT GAC TGG GAC AAC GTG GGC
 P D Y M T T F V D S L I D W D N V G
 AAG CGC TAT GAG GCT GCA ACT GCC **TGA** GGCCTCAGGCAACCTAAGTTGCAACGGGGGCCTTG
 K R Y E A A T A *
TCAAGCGCTGGTGTCTCAGTAGCTCGGCATGCTTGAAGCTGCTGAATATTCAGCATATTAATATGTTTCAT
GATGCAGTTTTGGCACCATCAATCGGTAATGCGTCAAAGGAGACAATTGAGTATAATGTGCATGCATAT
GGCCCCCTTGGTGGCATGTATGAGAAACATGTTTCTGTACTGCTGTCTCAGTACCATCATGGTCCGGACAGTT
GCTGCTGTCTAGGCATGGACATFACTCTGCCAGTTGCAGAGCCTACAGCCCCATGCACAGCTGCGACGT
ATGATGAATCTGAGACGCACTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

圖二、A comparison of FeSOD cDNA sequences of *C. pyrenoidosa* (Cp-nt) with that of *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr-nt). 73.5% identity in 596 nt overlap.

	20	30	40	50	60	70
Cp-nt	AGCTGCCCCCTCTTCCGTATGCTATAAATGCTTTGGAGCCCCACATGTCTCAGAAGTCGC					
	:::::	:::	:::	:::	:::	:::
Cr-nt	AGCTGAAGTCTCCCCCTACGCTCTGGATGCTCTGGAGCCCCACATGAGCAAGCAGACCC					
	110	120	130	140	150	160
	80	90	100	110	120	130
Cp-nt	TGGAGTTTCATTATGGCAAGCACCATCAGACATACTTGGATAATATGAACAAGCGGATTG					
	:::::	:::	:::	:::	:::	:::
Cr-nt	TGGAGTTCCACTGGGGCAAGCACCACCGCCTACGTGGATAACATGAACAAGCAGGTGC					
	170	180	190	200	210	220
	140	150	160	170	180	190
Cp-nt	CTGGCAGTAACCTTGAGAGCAAGACCCTTGAGGAGGTTATCAAGGAGAGTTGGAACAATG					
	:::::	:::	:::	:::	:::	:::
Cr-nt	CTGGCACTCCCCCTGGACGGCAAGTCGCTGGAGGAGATCGTCCTGGCCAGCTGGAACAATG					

230 240 250 260 270 280

200 210 220 230 240 250

Cp-nt GCAGCCCTACAGCAGTGTTCACAACGCTGCTCAGGTCTGGAACCACACATTCTTTTGGG
 :: :: :: : :::::::::::::: :: :::::::::::::: :::::::::::::: ::::::::::::::

Cr-nt GCCAGCCCACCCCGGTGTTCACAACGCCGCTCAGGTCTGGAACCACACTTTCTTCTGGG
 290 300 310 320 330 340

260 270 280 290 300

Cp-nt AGAGCATGAAACCCAATGGTGGTGGTGCACCCAGCGGCAAAGTAGCAGAGGCCATCAAT-
 :::::::::::::: :::::: :::::: :::::: :::::: :::::: :: :: ::::::::::::::

Cr-nt AGAGCATGAAGCCCAACGGTGGCGGTGCCCCACCGGCGCGCTGGCTGAGGCCATCACCC
 350 360 370 380 390 400

310 320 330 340 350 360

Cp-nt GCAGCTTCTGGCAGTCTGGATGACTTTAAGGCACAGTTCAAGAATGCAGGTGCTACTCAG
 :: :::::: :::::: :::::: : :: :::::: :::::::::::::: : :: :: :: :: ::

Cr-nt GCGACTTC-GGCAGCCTGGACAAGTTCAAGGAGGAGTTCAAGCAGGCTGGCATGACCCAG
 410 420 430 440 450 460

370 380 390 400 410 420

Cp-nt TTTGGCTCTGGCTGGGCATGGCTTGTGACTGACAAGTCTGGCAAGTTGTCTATTGAGAAG
 :: :::::::::::::: :::::: : :::::: : :::::: :::::: :: :: ::

Cr-nt TTCGGCTCTGGCTGGGCCTGGCTGAACGCCGACAAGACCGGCAAGCTGTTCGATCAGCAAG
 470 480 490 500 510 520

430 440 450 460 470 480

Cp-nt ACCCCCAATGCCGTGACACCCCTGGTGGAGGAGCAAGACACCCATTCTGACGATGGAT
 : :::::: :::::::::: :: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: : ::

Cr-nt TCGCCCAACGCCGTGAACCCCGTGGTGGAGG---GCAAGACCCCATCCTGACTGTTCGAT
 530 540 550 560 570 580

490 500 510 520 530 540

Cp-nt GTCTGGGAGCATGCATACTACCTGGATGTGCAGAACAGGAGGCCTGACTACATGACGACA
 :: :::::::::: :: :::::: : :: :::::::::: : : :: :::::::::: :: ::

Cr-nt GTGTGGGAGCACGCCTACTACATTGACGTGCAGAACCGCCGCCCGACTACATCACCACC
 590 600 610 620 630 640

	550	560	570	580	590	600
Cp-nt	TTTGTGGACAGCCTCATTGACTGGGACAACGTGGGCAAGCGCTATGAGGCTGCAAC					
	::	: ::	: ::	: ::	: ::	: ::
Cr-nt	TTCATGGAGAAGCTGATCAACTGGGACGCCGTTGCTCAGCGCTACGCCCGTGCCAC					
		650	660	670	680	690

圖三、A comparison of FeSOD amino acid sequences of *C. pyrenoidosa* (Cp-aa) with that of *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr-aa). 70.5% identity in 200 aa overlap.

	40	50	60	70	80	90
Cr-aa	LELKSPPYALDALEPHMSKQTFLEFHGKHHRAYVDNMNKQVAGTPLDGKSLEEIVLASWN					
	...	X:	:	:	:	:
Cp-aa	FQLPPLPYAINALLEPHMSQKSLEFHGKHHQTYLDNMNKRIAGSNLESKTLEEVIKESWN					
	10	20	30	40	50	60
	100	110	120	130	140	150
Cr-aa	NGQPTPVFNAAQVWNHTFFWESMKPNGGAPTALAEAI TRDFGSLDKFKEEFKQAGMT					
	:	:	:	:	:	:
Cp-aa	NGSPTAVFNAAQVWNHTFFWESMKPNGGAPSGKLAEA INAAAGSLDDFKAQFKNAGAT					
	70	80	90	100	110	120
	160	170	180	190	200	210
Cr-aa	QFGSGAWL NADKTGKLSISKSPNAVNPVV-EGKTPILTVDVWEHAYYIDVQNRPPDYIT					
	:	:	:	:	:	:
Cp-aa	QFGSGAWLVTDKSGKLSIEKTPNAVTPLVEESKTPILTM DVWEHAYYLDVQNRPPDYMT					
	130	140	150	160	170	180
	220	230				
Cr-aa	TFMEKLINWDAVAQRYARAT					
	:	:	:	:	:	:
Cp-aa	TFVDSLIDWDNVGKRYEAAT					
	190	200				

表一、 A comparison of FeSOD sequence of *Chlorella pyrenoidosa* with those of other species.

Species	FeSOD cDNA length (bps)	Identity (%)	Accession No (NCBI)
Chlorophyceae			
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	1063		DQ183067
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	705	73.5	U22416
Dicotyledon			
<i>Arabidopsis thaliana</i> (type I)	915	62.6	M55910
<i>Arabidopsis thaliana</i> (type III)	786	62.3	AF061852
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> (curled-leaved tobacco)	1035	62	A09032
<i>Cinnamomum camphora</i> (camphor tree)	564	56.4	AF084831
Bacteria			
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	603	62.1	NP_682309
<i>Nostoc commune</i> (Cyanobacteria)	603	60.3	AF177945
<i>Legionella pneumophila</i>	579	60.1	BAA02306
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (Cyanobacteria)	600	59	NC_000911
<i>Bacteroides fragilis</i>	834	56.4	M96560
<i>Propionibacterium shermanii</i>	567	54.3	Y09012
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	636	53	AAK40652
Monocotyledon			
<i>Oryza sativa</i>	1353	57	AB014056
Insect			
<i>Babesia bovis</i>	600	56.5	U70131
<i>Plasmodium ovale</i>	594	55.4	AF139526
Fungi			
<i>Rhodotorula glutinis</i>	732	53.5	AF434197

四、參考文獻：

Chen, H. Y. and Yen, G. C. 1998. Free Radicals, Antioxidant Defenses and Human Health. *Nutrition Sciences Journal*. 23:105-121.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., and Cross, C. E. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *The journal of laboratory and clinical Medicine*. 119: 598-620.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1989. *Free Radicals in Biology and Medical*. Oxford University Press.

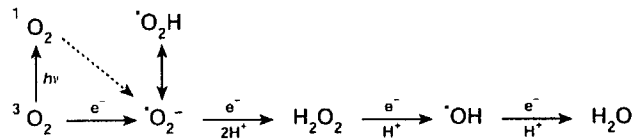
Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.

Sies, H. 1991. Natürliche und syntetische antioxidanten. *Atemw Lunngenkrkh* 17 Suppl 1: 16.

Wojtaszek, P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322: 681-692.

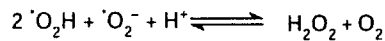
附錄圖一、(a) Interrelationships between molecular oxygen and ROS generated in reactions likely to occur in living plant cells and (b) chemical equations depicting major reactions determining the fate and possible interconversions of reactive oxygen species in plants. (Wojtaszek, 1997)

(a)



(b)

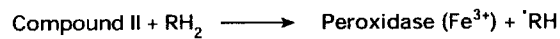
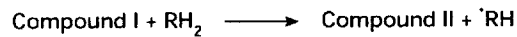
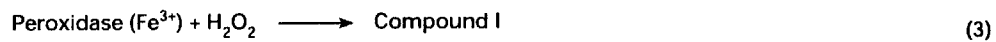
Superoxide disproportionation



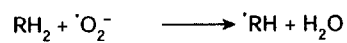
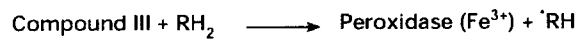
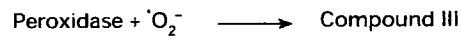
Catalase



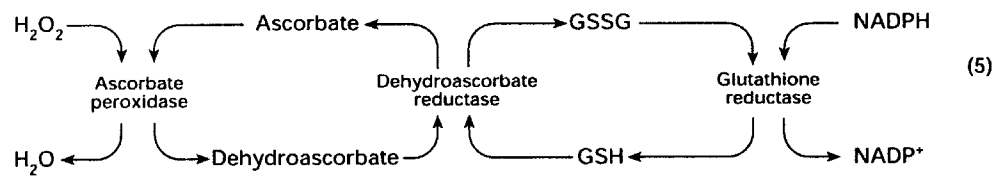
Peroxidase



Generation of H_2O_2



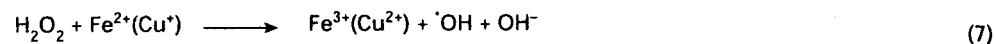
Halliwell-Asada pathway:



Haber-Weiss reaction:



Fenton reaction:



附錄圖二

表1. 植體內發生的活性氧化物(Reactive oxygen species: ROS)

產生機制	存在之胞器位置	ROS 種類
Photosynthesis : electron transport PS I or PS II	Chloroplast	O_2^-
Respiration : electron transport	Mitochondria	O_2^-
Glycolate oxidase	Peroxisome	H_2O_2
Excited chlorophyll	Chloroplast	O_2^1
NADPH oxidase	Plasma membrane	O_2^-
Fatty acid β - oxidation	Peroxisome	H_2O_2
Oxalate oxidase	Apoplast	H_2O_2
Xanthine oxidase	Peroxisome	O_2^-
Peroxidase, Mn^{2+} and NADH	Cell wall	H_2O_2
Amine oxidase	Apoplast	H_2O_2

資料來源：Mittler, R. 2002.

附錄圖三

表2. 植體內存在之抗氧化酵素及抗氧化物

酵素或抗氧化物	存在之胞器位置	作用之 ROS 種類
Superoxide dismutase	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria, Peroxisome, Apoplast	O_2^-
Ascorbate peroxidase	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria, Peroxisome, Apoplast	H_2O_2
Catalase	Peroxisome	H_2O_2
Glutathione peroxidase	Cytosol	H_2O_2 , ROOH
Peroxidase	Cell wall, Cytosol, Vacuole	H_2O_2
Thioredoxin peroxidase	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria	H_2O_2
Ascorbic acid	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria, Peroxisome, Apoplast	H_2O_2
Glutathione	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria, Peroxisome, Apoplast	H_2O_2 , O_2^-
α -Tocopherol	Membrane	ROOH, O_2^1
Carotenoids	Chloroplast	O_2^1

資料來源：Mittler, R. 2002.