

光对豌豆细胞色素氧化酶活性的影响(简报)

王异星

李明启

(暨南大学生物系, 广州 510632) (华南农业大学农业生物系, 广州 510642)

EFFECTS OF LIGHT ON THE ACTIVITIES OF CYTOCHROME OXIDASE IN PEA

Wang Yixing

(Dept. of Biology, Jinan University, Guangzhou 510632)

Li Mingqi

(Dept. of Agricultural Biology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

分类号 Q946.5

我们已经报道: 光对叶片线粒体呼吸耗氧有促进作用, 但其中偶联呼吸耗氧受到抑制, 交替途径耗氧增加^[1]。交替途径的运行是受细胞色素途径控制的^[2]。因此光对叶片线粒体不同呼吸途径耗氧的影响, 可能是通过影响细胞色素途径而影响到交替途径的。细胞色素氧化酶是所有高等生物呼吸链中的末端氧化酶, 其催化的将电子从细胞色素 C(cyt c) 传到 O₂ 的反应是能量代谢中的主要不可逆步骤, 是线粒体呼吸控制中的主要部位^[3]。在动物和植物线粒体中都观察到光对细胞色素氧化酶特性有影响^[4,5], 但都没有涉及到光对酶活性的影响。有人研究动物线粒体中光的效应, 推测光对线粒体耗氧的影响, 其光的受体可能是细胞色素氧化酶^[6]。鉴于细胞色素氧化酶在控制电子传递中的重要作用, 我们研究了光对植物细胞色素氧化酶活性的一些影响, 探讨光对植物线粒体耗氧影响中细胞色素氧化酶是否可以作为光的直接受体。

1 材料和方法

植物材料 萌发种子: 豌豆 (*Pisum sativum* L.) 种子洗净, 浸泡 12 h 后置培养皿中于 25℃ 黑暗中发芽 24 h。黄化苗: 将萌发种子栽于瓦盆内蛭石中, 置 25℃ 黑暗培养室, 约 5-7 d 后取用。绿叶: 取正常光照条件下生长 1 周的幼苗顶端第一位叶。以上取材均分别取三次重复。

细胞色素氧化酶活性测定 取 1 g 材料加 5 ml 提取介质 (1 μl ml⁻¹ 巯基乙醇, 5 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-柠檬酸缓冲液, pH8.0) 在冰浴中研磨 1-2 min, 200 目尼龙布过滤, 滤液于 12 000 × g 4℃ 离心 10 min, 上清液为粗酶液。在光径 1 cm 的玻璃比色杯中加入 2 ml 测定介质 (0.2 mol/L 蔗糖, 20 μmol/L 还原型 cyt c, 50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.1), 然后加入 20 μl 酶提取液, 用 BECKMAN DU-7 型分光光度计测定 550 nm 处光密度下降值。酶活

性以每分钟氧化 $1 \mu\text{mol}$ 还原型细胞色素 c 作为一个酶活力单位。测定温度 25°C 。每次测三个重复, 取平均值。

蛋白质含量测定 用考马斯亮蓝法^[7]测定。

2 结果与讨论

2.1 豌豆萌发种子、黄化苗、绿叶细胞色素氧化酶活性比较

实验结果表明, 细胞色素氧化酶比活性在绿叶中最低, 为 $3.65 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$, 在萌发种子中较高, 为 $6.82 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$, 在黄化苗中最高, 为 $13.72 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$, 相当于绿叶的 3.76 倍。细胞色素氧化酶活性与线粒体供能作用在该组织细胞中的重要性有关。在绿叶中, 能量绝大部分由光合作用提供, 线粒体供能作用相对来说不那么重要, 其细胞色素氧化酶活性最低。在刚萌发种子中, 最为活跃的是贮藏物质的分解, 对能量的需要量相对较少, 细胞色素氧化酶活性也不很强。黄化苗中由于叶绿体不能很好发育, 功能不全, 维持细胞活动的能量来源完全依赖于线粒体呼吸, 此时作为供能主要途径的细胞色素氧化酶途径在细胞的生命活动中占绝对重要的地位, 因此在黄化苗中细胞色素氧化酶活性远远高于绿叶。此外, 在不进行光合作用的黄化苗中, 细胞色素氧化酶活性高于能进行光合作用的绿叶, 也反映了线粒体功能在这两种组织中的差异。这一实验结果说明, 在光合细胞中线粒体功能确实受到抑制, 呼吸的电子传递显著受光和光合作用的调节。

2.2 光对离体的细胞色素氧化酶活性的影响

从豌豆中提取细胞色素氧化酶的粗酶液, 经照光处理后发现光对其活性没有明显影响, 萌发种子、黄化苗和绿叶的情况相似。改变光强均不能影响酶活性(表 1)。虽然有实验表明细胞色素氧化酶的 Raman 光谱特性在照光时有所改变^[4], 但光对离体酶活性的影响未见报道。至于细胞色素氧化酶在光对线粒体耗氧影响中的作用, 只有人推论其可能作为光的受体影响线粒体耗氧^[6], 但未有实验依据。

根据上述实验结果, 我们认为光对植物线粒体偶联呼吸的控制不是直接通过细胞色素氧化酶实现的, 因为暗-光转换不能引起细胞色素氧化酶活性变化; 虽然种子和叶片线粒体对光的反应不同^[8], 但两者的细胞色素氧化酶活性对光都不能作出应答。因此细胞色素氧化酶至少单独不能作为光的受体直接

对光作出应答, 进而控制呼吸。虽然光的长期作用对此酶活性有影响, 如黄化苗与绿叶中的情况那样, 但光对绿叶细胞内线粒体偶联呼吸的快速影响不能单独通过细胞色素氧化酶来实现。

表 1 光对豌豆三种组织细胞色素氧化酶活性的影响
Table 1 Effects of light on the activities of cytochrome oxidase in three tissues of pea

处理 Treatment	细胞色素氧化酶比活性 ($\text{U mg}^{-1} \text{ protein}$) Specific activities of cytochrome oxidase		
	绿叶	萌发种子	黄化苗
	Green leaves	Germinated seeds	Etiolated seedlings
暗 Dark	3.65	6.82	13.72
* 光 Light(1 000lx)	3.74	7.00	13.30
* 光 Light(10 000lx)	3.67	6.84	13.45
* 光 Light(40 000lx)	3.81	6.89	13.69

* 粗酶液照光 10 min, Crude enzyme extract was illuminated for 10 min.

参考文献

- 1 王异星, 李明启. 照光条件下豌豆叶片细胞原生质体的线粒体偶联呼吸. 中国科学院华南植物研究所集刊, 第八集, 北京: 科学出版社, 1992, 147-154
- 2 Bahr J T, Bonner W D Jr. Cyanide-insensitive respiration. II. Control of the alternative pathway. *J Biol Chem*, 1973, 248:3446-3450
- 3 Kcedenbach B. Regulation of respiration and ATP synthesis in higher organism: Hypothesis. *J Bioenerg Biomembr*, 1986, 18:39-54
- 4 Babcock G T, Salmeen I. Resonance raman spectra and optical properties of oxidized cytochrome oxidase. *Biochem*, 1979, 18:2493-2498
- 5 Denis M. Structure and function of cytochrome-c oxidase. *Biochim*, 1986, 68:459-470
- 6 Kato M, Shinzawa K, Yoshikawa S. Cytochrome oxidase is a possible photoreceptor in mitochondria. *Photochem Photobiophys*, 1981, 2:263-269
- 7 李琳, 焦新之. 应用蛋白染色剂考马斯蓝 G-250 测定蛋白质的方法. *植物生理学通讯*, 1980, (6):52-55
- 8 王异星, 李明启. 光对绿豆种子和叶片分离线粒体耗氧的影响. *华南植物学报*, 1992, 试刊 I:53-59