中 国 科 学
1982 年 11 月　　B 辑　　第 11 期

胰蛋白酶对光系统 II 电子传递和能量分配的影响*

李良璧 周佩珍 翟小京 张正东 马桂芝
(中国科学院植物研究所，北京)

摘　要

本文测定了胰蛋白酶对正常的和经 Tris 洗过的菠菜叶绿体光诱导可变荧光的影响，发现：(1) 酶消化对这两种叶绿体的可变荧光产率有明显的抑制作用；加入 PS-II 电子供体 SMCB 可使抑制作用显著减轻，其荧光的恢复效率在两种叶绿体中接近相等．(2) 在有 DCMU 存在下，酶诱导的上述抑制作用仍很显著，且不受外加受体的影响．

由上述结果得出结论：胰蛋白酶对 PS-II 氧化侧有明显的钝化作用，钝化的部位在水裂解酶系统与 SMCB 插入的位置之间，而水裂解酶系统本身对酶消化不敏感；光合膜上可能有某种控制激发能转移和分配的蛋白质存在．

胰蛋白酶作为一种诱变剂，已被广泛地用于研究光合膜结构与功能之间的关系[1—7]．大量的实验结果已经表明，胰蛋白酶消化诱导光合膜构型或结构改变而使 PS-II 还原侧的电子传递，放 O_2 和光合磷酸化的速率发生变化[1—10]．然而，对酶是否抑制 PS-II 氧化侧的电子传递，及其钝化的部位尚存有争议[2,4—8]．我们实验室早先关于胰蛋白酶消化对电子传递和放 O_2 速度影响的研究已经证实，酶对 PS-II 氧化侧有明显的钝化作用[8—10]，但对其钝化的确切部位尚未阐明．另外，对酶消化影响激发能在两个光系统之间的转移和分配，尚无明确的报道．

据报道[11]，在 DCMU 存在下，PS-II 叶绿素 a 发射的 680 毫微米室温荧光产率的变化，是膜中激发能转化和在两个光系统之间分配的变化的反映．一些导致叶绿体膜状态和结构改变的条件和处理，例如紫外光辐射[1]，红光或远红光预照射[12]和将叶绿体膜悬浮于不同浓度的盐溶液中[13—17]，均能引起叶绿素 a 可变荧光产率发生改变．由于胰蛋白酶消化可诱导可变荧光产率改变，故膜上蛋白质在控制激发能在两个光系统之间分配的作用是值得注意的．

本文通过对胰蛋白酶消化诱导正常的和用 Tris 洗过的菠菜叶绿体膜可变荧光变化的比较，继续探索酶对 PS-II 氧化侧的钝化部位．并对有关的问题进行了简要的讨论．我们的实验结果证明：胰蛋白酶钝化 PS-II 氧化侧的部位是在水裂解酶系统和 SMCB 插入提供电子的位置之间．酶消化对激发能在光合膜光系统内的转移和分配有明显的影响．这表明，在光合

本文 1981 年 9 月 20 日收到．

* 本文使用如下缩写符号：PS-II = 光系统 II，DCMU = 3-(3.4-二氯苯基)-1.1-二甲脲，SMCB = 盐酸氨基脲，Tris = 三羟基氨基甲烷，Fecy = 高铁氰化钾，DCIP = 2.6-二氯酚靛酚．

膜上可能有某种控制能量转移和分配的蛋白质存在.

一、材料和方法

试验用北京市售的冬贮菠菜 (*Spinacia oleroceae*) 叶片为材料. 叶绿体膜按前叙方法[8]制备. 最后悬浮成 300 微克叶绿素/毫升的样品. 测定前置于冰浴, 在暗中适应半小时以上. Tris 洗叶绿体按 Yamashita 等[18]报道的方法, 用 0.8*M* Tris-HCl 缓冲液 (pH7.6) 处理 15 分钟. 5,000×g 离心 10 分钟收集沉淀. 然后悬浮成与正常叶绿体相等的浓度, 并作同样的暗适应处理. 叶绿素的浓度按 Arnon[19] 的方法测定.

胰蛋白酶对叶绿体膜的消化处理按前文[8]所叙方法, 在 25℃ 下进行. 用 10 倍于酶浓度的大豆胰蛋白酶抑制剂终止消化. 并立即用于光诱导可变荧光强度的测定.

作用光诱导叶绿素 a 在 680 毫微米发射的荧光强度, 在室温下用美国凯特林实验室葛培根教授 (Bacon Ke) 协助装配的动力学分光光度计测定. 激发光采用波长为 480 毫微米的间歇光 (100 仟次/秒; 光:暗=1:1), 强度小于 10 尔格/厘米^2·秒. 作用光为间歇白光 (111 次/秒; 1.75 毫秒光; 7.25 毫秒暗), 强度是 5×10^4 尔格/厘米^2·秒.

上述全部操作均在绿色保险灯下进行. 其它实验细节见"实验结果"中各图、表之注解. 胰蛋白酶和胰蛋白酶抑制剂均购自上海东风生化试剂厂.

二、实验结果

菠菜叶绿体膜在 25℃ 保温 1—10 分钟, 激发光诱导的稳态荧光强度 (F_0) 和作用光诱导的可变荧光强度 F_v ($F_m - F_0$) 均有微小的降低, 但它们的比值 F_v/F_0 基本保持恒定. 与此相比较, 在胰蛋白酶消化后, F_v 明显下降, 而 F_0 则不受影响. 因此我们在文中用 F_v/F_0 的比值改变作为酶诱导可变荧光产率变化的指标, 以消除温度的影响.

1. 胰蛋白酶消化对叶绿体膜可变荧光产率的影响

图 1 表示酶消化诱导叶绿体膜可变荧光产率 (F_v/F_0) 改变的时间进程. 图 1a 中的曲线表明, 正常的叶绿体膜在 25℃ 保温, 其可变荧光产率有轻微的下降, 保温 5 分钟后, 下降约 10%. 这可能是由于水裂解酶系统对热的不稳定性造成的[6]. 然而, 在用 10 微克/毫升胰蛋白酶消化后, 可变荧光产率随消化时间的延长逐渐下降, 消化 5 分钟后, 荧光产率下降达 50% 左右.

用 Tris 洗过的叶绿体膜也观察到类似的结果(图 1b). 在我们的实验条件下, 用 0.8*M* Tris (pH7.6) 洗叶绿体膜 15 分钟, 与正常的叶绿体比较, 其光诱导的可变荧光产率降低约 40%. 而且, 这种部分洗除 Mn 的叶绿体膜, 对胰蛋白酶消化更敏感. 消化 5 分钟, 可变荧光产率下降 60% 以上. 这表明, 酶诱导的荧光降低可能与酶消化引起 PS-II 氧化侧的钝化相关. 为了证实这一点, 我们测定了 PS-II 电子供体 SMCB 对这种荧光降低的恢复作用.

2. SMCB 对酶消化诱导荧光产率下降的恢复作用

表 1 表示 SMCB 对胰蛋白酶消化诱导菠菜叶绿体膜可变荧光产率降低的恢复效应. 从表中的数据可以看出, 经 Tris 洗过的叶绿体膜, 其可变荧光产率减少约 35%; 加入 8m *M* SMCB 后, 荧光产率降低可减少至 15%. 可见, SMCB 对 PS-II 氧化侧受损伤引起的荧光产率下降有极好的恢复作用.

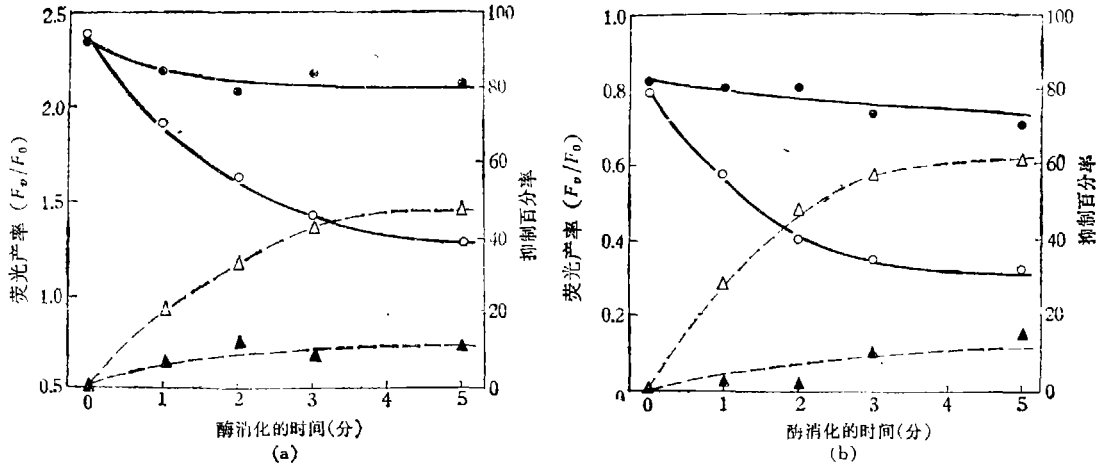

图 1　胰蛋白酶消化抑制正常的 (a) 和 Tris 洗过的 (b) 叶绿体光诱导可变荧光产率的动力学

[叶绿体在用 10 微克/毫升胰蛋白酶在 25℃ 按图中指示的时间保温后，加入 10 倍于酶浓度的大豆胰蛋白酶抑制剂终止消化．然后立即进行光诱导可变荧光强度的测定(叶绿体的最后浓度为 15 微克叶绿素/毫升)．测定条件见"材料与方法"．曲线 ●——● 和 ○——○ 分别表示对照和酶消化叶绿体可变荧光产率的变化；曲线 ▲---▲ 和 △---△ 分别表示对照和酶消化叶绿体荧光受抑制的百分率]

表 1　SMCB 对胰蛋白酶诱导菠菜叶绿体可变荧光下降的"阻滞作用"*

酶消化的时间(分)	正常叶绿体				Tris 洗过的叶绿体			
	−SMCB		+SMCB		−SMCB		+SMCB	
	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值
0	1.40	100	1.39	100	0.91	100	1.19	100
3	0.79	56.4	0.93	66.9	0.38	41.8	0.64	53.8

* 荧光被测定前，将 8m *M* SMCB 加至反应混合物中．其它实验条件与图 1 相同．

从表 1 中的数据还可以看出，正常叶绿体膜经胰蛋白酶消化 3 分钟后，可变荧光产率下降 43.6%，加入 SMCB 可使这种下降减至 33.6%，其中有 10% 的产率得到恢复．用 Tris 洗过的叶绿体膜作同样的测定，观察到极相似的结果．SMCB 可使酶诱导的荧光产率降低从 58.2% 减少到 46.2%，即有 12% 的产率得以恢复．在这两种不同的叶绿体膜中，SMCB 的恢复效率大抵相同，说明胰蛋白酶钝化 PS-II 氧化侧电子传递的部位是在水裂解酶系统和 SMCB 插入提供电子的位置之间，水裂解酶系统本身对胰蛋白酶消化不敏感．

3. 酶消化诱导激发能在光合膜中两个光系统之间分配的改变

DCMU 具有关闭 PS-II 反应中心的作用，故在有 DCMU 存在下，光诱导可变荧光产率的改变直接反映激发能在两个光系统之间转移和分配的变化[11]．我们的实验结果亦证明，在 DCMU 存在时，Fecy 或 DCIP 不改变酶诱导的可变荧光产率变化(见表 2)．同样，在有 DCMU 存在下，当酶消化用 Tris 洗过的叶绿体时，加入 SMCB 和 Fecy 或 DCIP，可变荧光产率也不因 Fecy 或 DCIP 的加入而改变(见表 3)．

表 4 中的结果表明，无论是在正常的，还是在用 Tris 洗过的叶绿体膜中，胰蛋白酶消化均

表 2 在有 DCMU 存在下，电子受体对胰蛋白酶诱导正常叶绿体荧光产率的影响*

酶消化的时间（分）	−DCMU		+DCMU					
			−受体		+Fecy		+DCIP	
	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值
0	1.58	100	1.36	100	1.11	100	1.13	100
5	0.98	62.0	1.17	86.0	1.10	99.1	1.16	102.7
10	0.75	47.5	1.15	84.6	0.87	78.4	0.95	84.1

* 测定前将 $10^{-6}M$ DCMU，0.1m M Fecy 或 $0.06\mu M$ DCIP 加至反应混合物中．其它条件与图 1a 相同．

表 3 在有 SMCB 和 DCMU 存在下，电子受体对胰蛋白酶诱导 Tris 洗过的叶绿体荧光下降的作用*

酶消化的时间（分）	−SMCB		+SMCB							
			−DCMU		+DCMU					
					−受体		+Fecy		+DCIP	
	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值
0	0.92	100	1.17	100	0.67	100	0.70	100	0.73	100
5	0.45	48.9	0.74	63.2	0.64	95.5	0.72	102.9	0.74	101.4
10	0.44	47.8	0.59	50.4	0.56	83.6	0.58	82.9	0.68	93.2

* 加入反应混合物中的 SMCB 浓度是 8m M．加入的 DCMU，Fecy 或 DCIP 的浓度与表 2 相同．其它条件照图 1b．

表 4 在有 DCMU 存在下，胰蛋白酶诱导两种叶绿体可变荧光产率的改变*

酶消化的时间（分）	正常叶绿体				Tris 洗过的叶绿体			
	−DCMU		+DCMU		−DCMU		+DCMU	
	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值	F_v/F_0	相对值
0	1.54	100	1.36	100	0.92	100	0.76	100
5	0.98	63.6	1.23	90.4	0.45	48.9	0.80	105.3
10	0.75	48.7	1.15	84.6	0.43	46.7	0.59	77.6

* $10^{-6}M$ DCMU 在测定前加至反应混合物中．其它条件与图 1 相同．

可诱导可变荧光产率的抑制．然而，这种抑制作用在这两种叶绿体膜中均无不加 DCMU 时的显著，仅为它们的 1/3 左右．而且往往需要将酶消化的时间延长到 5 分钟以上才能显现出来．当叶绿体膜被酶消化10分钟后，加入 DCMU，酶对荧光产率的抑制效率与无 DCMU 存在时相比较，减少 35.9％（在正常叶绿体中）或 30.9％（在 Tris 洗过的叶绿体中）．虽然已有文献[20]报道，用胰蛋白酶对捕光色素蛋白复合体（LHC）的曝露部分进行温和的消化（低酶剂量，短时间的消化），阳离子诱导叶绿素 a 荧光产率的增加受抑制．然而，我们上述的实验结果是在高酶浓度（10 微克/毫升）和长时间消化后测得的．而且，我们最近还观察到[21]，在同样条件下被酶消化过的菠菜叶绿体中，Mg^{2+} 对叶绿素 a 荧光产率的刺激作用完全消失；然而，如果叶绿体先用 Mg^{2+} 进行预保温，然后进行酶消化处理，那么 Mg^{2+} 对荧光产率的刺激作用不受酶消化影响，而 Mg^{2+} 对酶诱导的荧光产率下降亦无保护作用．根据这些实验结果，我们认为，在叶绿体膜上可能还存在有另一块或几块蛋白质，它们在控制囊状体膜的能量转移和分配中起

着重要的作用.

三、讨　论

一般认为，胰蛋白酶对光合电子传递，光合磷酸化作用，荧光产率以及光合膜的垛叠有明显的抑制作用[1—10,20]. 然而，对于它抑制的部位仍有争议[2,4—8]. Renger 等[4]曾在酶消化引起电子传递活性受抑制后，以苯氢醌/抗坏血酸盐系统作供体，未能观察到电子传递速度有任何恢复. 因此他们作出结论：胰蛋白酶消化仅抑制 PS-II 还原侧的电子传递，而对 PS-II 氧化侧的电子传递无影响. 同时他们还强调，水裂解酶系统 Y 对胰蛋白酶消化有抗性. 然而 Selman 和 Bannister[2] 发现，H_2O 的光氧化比 1,5-二苯羰酰肼（1,5-diphenylcarbohydrazide）的光氧化对胰蛋白酶消化更敏感，故而认为胰蛋白酶对 PS-II 氧化侧的电子流动也有钝化作用. 钝化的部位有两个，分别位于 H_2O 的光氧化和二苯羰酰肼的光氧化，以及二苯羰酰肼的光氧化和 PS-II 反应中心之间. Gerola 等[7]根据 H_2O 的光氧化对酶消化比 NH_2OH 的光氧化敏感，作出类似的结论，并指出水裂解反应是胰蛋白酶作用的直接靶子.

最近，我们[8]也曾观察到，PS-II 电子供体 SMCB 对胰蛋白酶引起的、CCCP 对 $H_2O \rightarrow Fecy$ 电子传递的抑制有明显的恢复作用. 然而上述所有这些实验都是用正常叶绿体进行的. 根据供体的恢复作用难于区分酶对水裂解酶系统的损伤或对 PS-II 氧化侧电子传递的抑制. 由于已知含 Mn 的蛋白质复合体是水裂解酶系统的重要成分[22—24]，用 0.8*M* Tris (pH8.0) 洗除叶绿体的 Mn 可导致可变荧光下降，而加入 PS-II 的电子供体系统(对-苯二胺/抗坏血酸盐)或 Mn^{2+} 可使荧光产率恢复[25]. 因此，用 Tris 洗过的叶绿体膜进行上述测定，可期望获得更有用的资料. 虽然最近发现[26]捕光色素蛋白复合体也能结合锰，不可忽视膜内还可能存在有水裂解酶以外的其它锰蛋白质复合物. 然而，我们的实验结果表明，在正常的和 Tris 洗过的两种叶绿体中，PS-II 供体 SMCB 对胰蛋白酶消化诱导的荧光下降有极相似的恢复效率（约 10%）. 这说明，胰蛋白酶对 PS-II 氧化侧的电子传递有明显的钝化作用，钝化的部位在水裂解酶系统和 SMCB 插入提供电子的位置之间，水裂解酶系统本身对酶消化不敏感. 这后一结果与 Renger[4] 的结论是一致的.

最近，Spector 和 Winget[27] 从菠菜叶绿体中分离出一种含 Mn 的蛋白质. 与此不同，Nakatami 和 Barber[28] 用类似的流程则分离到一种含 Fe^{2+} 的血红蛋白. 这两种分离蛋白质均能在体外与脂质体（liposome）重组活化光诱导放 O_2 过程. 对血红蛋白进行氨基酸分析的结果表明，其中有 20% 以上的氨基酸是酸性的. 基于这种性质，水裂解酶不可能被胰蛋白酶纯化. 关于与放 O_2 有关的蛋白质的性质迄今尚未取得一致. 为此，对于胰蛋白酶以外的其它蛋白水解酶的消化作用将是值得注意的.

本文承汤佩松教授热心指导，张国铮和冯丽洁同志在技术上给予大力协助，谨此致谢.

参　考　文　献

[1] Mantai, K. E., *Plant Physiol.*, **45**(1970), 563—566.
[2] Selman, B. R. & Bannister, T. T., *Biochim. Biophys. Acta*, **253**(1971), 428—436.
[3] Regitz, G. & Ohad, I., in *Proc. of the 3rd Int. Cong. on Photosynthesis* (Ed. Avron, M.), Elsvier Scientific Publishing Company, Amstedam-Oxford-New York, 1975, 1615—1625.

[4] Renger, G. & Erixon, K. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **440**(1976), 278—286.
[5] Renger, G., *ibid.*, **440**(1976), 287—300.
[6] Renger, G., in *Bioenergetics of Membranes: Developments in Bioenergetics and Biomembranes* (Ed. Packer, L., et al.), Elsevier/Holland Biomedial Press, Amsterdam, New York, Oxford. Vol. 1 1977, 339—350.
[7] Gerola, P. & Bensdetti, E. De, et al., *ibid.*, Vol. 1, 1977, 361—369.
[8] 张正东、李良璧等，植物学报，**22**(1980)，49—56.
[9] 周佩珍、李良璧等，植物学报，**22**(1980)，247—251.
[10] Li Liangbi & Zhang Zhengdong, et al., *Scientia Sinica*, **24**(1981), 852—860.
[11] Butler, W. L., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **29**(1978), 345—378.
[12] Vernotte, C. & Briantais, J-M, et al., *Plant Science Letters.*, **4**(1975), 115—123.
[13] Homann, P. H., *Plant Physiol.*, **44**(1969), 932—936.
[14] Murata, N, & Tashiro, H., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **179**(1970), 250—256.
[15] Krause, G. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **333**(1974), 301—313.
[16] Telfer, A. et al., *FEBS Letters.* **65**(1976), 77—83.
[17] Argyroudi-Akoyunoglou, J. H. & Akoyunoglou, G., *Arch. of Biochem. Biophys*, **176**(1977), 370—377.
[18] Yamashita, T. & Butler, W. L., *Plant Physiol.*, **43**(1968), 1978—1986.
[19] Arnon, D. I., *Plant Physiol.*, **24**(1949), 1—15.
[20] Steinback, K. E, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**(1979), 546—557.
[21] Zhou, Peizhen & Li, Liangbi., et al., *Photosynthesis Research*, 1982 (in press).
[22] Renger, G., *Physiol. Veg.*, **10**(1972), 329—345.
[23] Metz, J. G., Wong, J. & Bishop, N. I., *FEBS Letters*, **114**(1980), 61—66.
[24] Sayre, R. & Cheniae, G., Proc. 5th Int. Cong. Photosynthesis, Halkidiki, Greece (in press).
[25] Homann, P. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **33**(1968), 229—234.
[26] Foyer, C. H. & Hall, D. O., *FEBS Letters*, **101**(1979), 324—328.
[27] Spector, M. & Winget, G. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**(1980). 957—959.
[28] Nakatani, H. Y. & Barber, J., *Photobiochem. Photobiophys.*, **2**(1981), 69—78.