

# 质膜氧化还原系统中的抑制物及其特性

裴真明 贺道耀 汤章城

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

## 摘 要

燕麦(*Avena sativa*)质膜氧化还原系统的酶反应进行一段时间后,酶反应速率逐渐降低到零,加入反应底物 NADH、 $K_3Fe(CN)_6$  以及质膜(酶)不能使酶反应速率得到恢复,说明酶被抑制。酶反应的产物可能为  $NAD^+$ 、 $Fe^{2+}$  和  $H^+$ , 加入  $NAD^+$ 、 $K_3Fe(CN)_6$  和 HCl 不能使酶活力抑制,因此不是产物反馈抑制。超速离心除去质膜后,发现抑制物存在于反应介质中,这种抑制物的抑制效果随时间延长而降低,所以此抑制物不稳定。本文首次报道质膜氧化还原系统中存在抑制物。

关键词 质膜;氧化还原系统;抑制物;燕麦

## INHIBITOR OF REDOX SYSTEM IN PLANT PLASMALEMMA AND ITS PROPERTIES

Pei Zhen-ming, He Dao-yao and Tang Zhang-cheng

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

### Abstract

NADH- $K_3Fe(CN)_6$  (FeCN) reductase activity was decreased to zero after 10 min or more of reaction. The activity was not recovered by the addition of substrates, NADH and FeCN, and plasmalemma together or separately. The probable reaction products,  $NAD^+$ ,  $Fe^{2+}$  and  $H^+$ , were proved not to be as feed back inhibitors. The reaction medium containing plasmalemma, NADH and FeCN was centrifuged after incubation. It was found that the inhibitor was in the supernatant and the inhibitivity was lost after some six hours of storage.

**Key words** Plasmalemma; Redox system; Inhibitor; Oat

Craig 和 Crane<sup>[1]</sup>首先发现培养的胡萝卜细胞可以还原胞外的铁氰化物, Barr 等<sup>[2]</sup>证明它是一个酶催化的过程, 与此同时证明了许多植物细胞包括真菌中存在该反应。后来又证明纯化质膜微囊具有氧化还原酶的活力, 并研究了氧化还原酶的动力学特性<sup>[3]</sup>。对氧化还原系统酶活力的调控研究集中在一些外加因子上, 如光促进铁氰化钾的还原<sup>[4,5]</sup>; 生长素(2,4-D)促进氧化还原酶活力<sup>[3]</sup>; 8-羟基喹啉、4,7-二氯喹啉及维生素 A<sup>[7]</sup>和钙调素拮抗剂<sup>[8]</sup>抑制氧化还原酶活力。但是并没有研究氧化还原系统自身的调控作用。在大部分测定氧化还原系统酶活力的研究中所注明的氧化还原活力一般指 10 min 之内的活力, 即在一段时间里酶的反应速度为恒定。我们在测定该氧化还原酶活力时, 发现当反应时间大于 10 min 之后酶反应速率迅速在 3~5 min 内下降到零。随后在试图延长酶反应速率恒定的时间以便研究抑制剂和激活剂的作用时, 发现氧化还原反应系统中存在抑制物, 本文初步分析了这种现象及抑制物的性质。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 材 料

燕麦(*Avena sativa*)种子用新洁尔灭消毒, 浸泡 2 h 后在浸湿的纱布上 25 °C 暗催芽 12 h, 播种到金属网上, 待出芽后照光。人工气候室(光强 330  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 相对湿度 70%, 光/暗为 12 h/12 h, 温度为 25 °C)培养, 7 d 苗的叶用于实验。

### 1.2 质膜提取和纯化

按 Sandelius 等<sup>[9]</sup>和裴真明等<sup>[10]</sup>的方法提取和纯化质膜。稀释纯化质膜蛋白 1~5 g/L, 分装后存放于液氮中备用。

### 1.3 铁氰化钾还原酶活力测定

用岛津 UV-190 双光束分光光度计测定酶活力。石英比色杯光程 1 cm, 记录仪记录光密度。铁氰化钾(FeCN)还原酶的反应介质: 100 mmol/L 蔗糖, 25 mmol/L Tris-MES (pH 7.0), CaCl<sub>2</sub>、KCl、NaCl 均为 100 mmol/L, 0.6 mmol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 反应体积 1 mL, 加入 0.5 mmol/L NADH 开始反应, 340 nm 光吸收(OD)的减少为 FeCN 还原酶的活力<sup>[3]</sup>。有特殊说明时, NADH 和 FeCN 的浓度按实验中的说明加入。

### 1.4 实验试剂

NADH、MES(Sigma); Tris (Boehringer); 铁氰化钾(分析纯, 广州化学试剂分公司进口分装); 亚铁氰化钾、蔗糖(分析纯, 上海试剂一厂); 其它无机盐(分析纯)。

## 2 结 果 和 讨 论

### 2.1 FeCN 还原酶活力随时间的变化

当在 1 mL 的比色杯中加入 1 mL 反应液(其中含有 80  $\mu\text{g}$  蛋白的质膜(PM), 0.5 mmol/L NADH, 0.6 mmol/L FeCN)后反应开始(图 1)。可以看出在前 10 min NADH 的量几乎呈线性减少, 即酶的反应速度为线性, 之后 NADH 的量减少变得缓慢, 最后到几乎不减少, 即酶的反应速度逐渐下降然后到反应速率为零(图 1)。酶活力下降的原因可能是: 1) 底物被消耗完; 2) 酶失活; 3) 反应体系中存在抑制物。下面分别研究这三种原因。

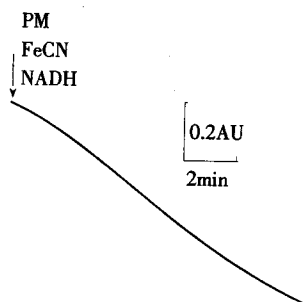


图 1 FeCN 还原酶活力随时间的变化  
PM. 质膜 AU. 活性单位  
Fig. 1 Change with time of FeCN reductase activity  
PM. Plasmalemma AU. Activity units

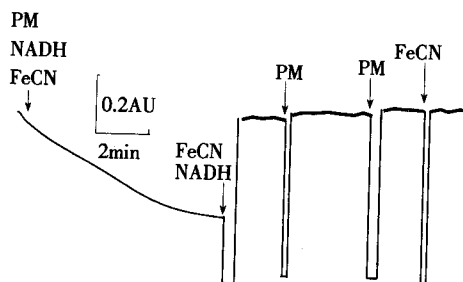
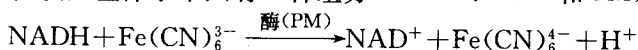


图 2 底物和酶对恢复 FeCN 还原酶活力的影响  
PM, AU 同图 1  
Fig. 2 Effect of adding substrates and enzyme on the recovery of the FeCN reductase activity  
PM, AU; Refer to captions under Fig. 1

## 2.2 底物 NADH、FeCN 和酶的作用

在该反应体系中只有 3 种组分(NADH、FeCN 和 PM)加入,反应式如下:



如果是底物消耗和酶的失活引起酶反应速率的下降,加入底物和酶应该使酶的反应速度加快。图 2 中,在酶反应进行到速度为零后分别加入底物和酶,测定对酶反应速度的影响。首先同时加入底物 NADH 和 FeCN,对酶活力没影响,也曾分别加入 NADH 和 FeCN,同样不能使酶活力恢复(数据未列出);然后加入 PM,同样对酶活力没作用。说明反应体系中酶活力的降低不是因为底物 NADH 和 FeCN 消耗完,也不是在酶反应的 10 min 内酶失活,而是酶被抑制。

## 2.3 抑制因子分析

从反应式(1)中可知,酶反应的产物是  $\text{NAD}^+$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{H}^+$ ,如果是反馈抑制,这 3 种产物可能就是抑制物。

加入 NADH 的氧化产物 NPD( $\text{NAD}^+$ )没有使酶抑制(图 3)。反应介质为 80  $\mu\text{g}$  PM, 0.6 mmol/L FeCN, 0.5 mmol/L NADH 和 0.5 mmol/L NAD。加入 0.6 mmol/L  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  和 0.6 mmol/L HCl 也没有使反应受到抑制。说明不存在底物的反馈抑制。这是一个简单的氧化还原反应(1),这种抑制因子可能存在于质膜微囊,也可能存在于反应介质中。

## 2.4 对酶反应之后介质的抑制作用分析

5 mL 反应液中含 0.35 mg PM, FeCN 和 NADH 的浓度分别为 0.6 mmol/L, 0.5 mmol/L。在室温下保温 2 h,  $200000 \times g$  离

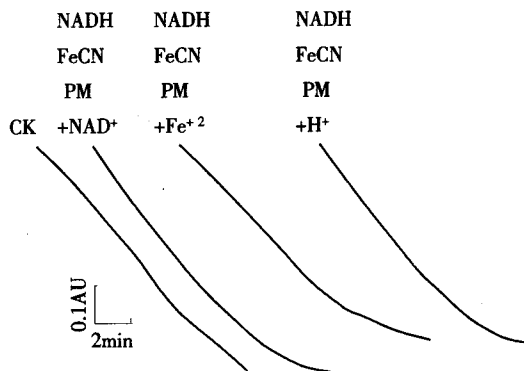


图 3 产物  $\text{NAD}^+$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{H}^+$  对 FeCN 还原酶活力的影响  
AU, PM 同图 1  
Fig. 3 Effect of  $\text{NAD}^+$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{H}^+$  on FeCN reductase activity  
AU, PM; Refer to captions under Fig. 1

心 30 min 除去 PM。从加入反应液到进行酶活力测定的时间为 3 h。取 1 mL 上述上清液，加入 40  $\mu\text{g}$  PM，酶反应速度几乎为零，然后分别加入 0.5 mmol/L NADH 和 0.2 mmol/L FeCN，结果也相同(图 4A)。说明抑制物存在于上清液中。在图 4A 中，加入 NADH 后 OD 值超出记录仪的记录范围，所以调回到图中位置，在图 4B 中加入 NADH 后也同样调整记录仪。

但是有趣的是，将该上清液再放置 3 h 后这种抑制作用降低(图 4B)，说明形成的抑制物可能是一种不稳定物质。比较图 4A 和图 4B，在图 4A 中酶活力被全部抑制，但图 4B 中酶活力有一定程度的恢复。

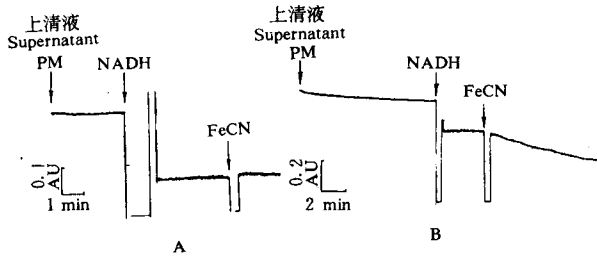


图 4 超离心后的反应介质对酶的抑制作用  
AU、PM 同图 1

A. 在超离心后的上清液中分别加入 PM、NADH 和 FeCN，酶活力为零；B. 上清液继续放置 3 h 后，分别加入 PM、NADH 和 FeCN，酶活力增强

Fig. 4 The inhibitor compound in reaction medium and the decrease of its activity with time  
AU, PM: Refer to captions under Fig. 1

The rate was not increased by the addition of PM, NADH and FeCN respectively (A); but the inhibitory action was lost some 3 h latter (B)

植物线粒体和叶绿体膜上的电子传递链已经研究得比较透彻，但是对质膜上可能存在的电子传递研究却较少<sup>[11~13]</sup>，然而对质膜上的氧化还原系统的重要性已有一定认识，如质子分泌、质膜质子梯度的形成、物质运输和植物抗逆境反应<sup>[11~13]</sup>。在质膜的电子传递链上，已经发现有 b-类型细胞色素 (b-type cytochrome)、核黄素蛋白及醌类等三类组分<sup>[13]</sup>，虽然发现了一些激活因子和抑制因子，但对激活或抑制的位点一无所知。本文首次报道了质膜氧化还原系统中存在抑制物，酶的这种调节机制也可能存在于植物体内，以此

调控植物细胞的氧化还原系统的活力。因此通过研究该调节物的性质和可能的调节机制，有可能揭示植物体内氧化还原系统的调节机制。该抑制物不同于其它一些人为加入的抑制物，如生长素 (2, 4-D)<sup>[3, 6]</sup>、8-羟基喹啉、4, 7-二氯喹啉及维生素 A<sup>[7]</sup> 和钙调素拮抗剂<sup>[8]</sup>，它在此氧化还原反应中起调节作用应该是不可避免的，设法纯化这一抑制物是很有意义的。

## 参 考 文 献

- 1 Craig T A, Crane F L. Evidence for a trans-plasma membrane electron transport system in plant cells. *Proc Ind Acad Sci*. 1981. **90**: 150~155
- 2 Barr R, Craig T A, Crane F L. Transmembrane ferricyanide reduction in carrot cells. *Biochim Biophys Acta*. 1985a. **812**: 49~54
- 3 Brightman A O, Barr R, Crane F L *et al*. Auxin-stimulated NADH oxidase purified from plasma membrane of soybean. *Plant Physiol*. 1988. **86**: 1264~1369
- 4 Dharmawardhane S, Stern A I, Rubinstein B. Light-induced transplasmalemma electron transport in oat mesophyll cells. *Plant Sci*. 1987. **51**: 193~197
- 5 Neufeld E, Bown A W. A plasma membrane redox system and proton transport in isolated mesophyll cells. *Plant Physiol*. 1987. **83**: 895~899
- 6 Goldbach H E, Hartmann D, Rotzer T. Boron is required for the stimulation of the ferricyanide-induced proton release by auxins in suspension-cultured cell of *Daucus carota* and *Lycopersicon esculentum*. *Physiol Plant*. 1990. **80**: 114~118

- 7 Barr R. The effect of inhibitors of plasma membrane redox reactions on proton excretion by plant cells. *Physiol Plant*, 1988, **73**: 194~199
- 8 Barr R, Craig T A, Crane F L. Evidence for  $Ca^{2+}$ -calmodulin control of transplasmalemma electron transport in carrot cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985b, **126**: 262~268
- 9 Sandelius A S, Morre D J. Plasma membrane isolation. In: Larsson C, Mommer I M eds., *The Plant Plasma Membrane*. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 125
- 10 裴真明, 汤章城. 植物质膜嵌入脂双层及其跨膜转运功能. *科学通报*, 1994, **19**: 1416~1419
- 11 Crane F L, Sun I L, Barr R *et al.* Electron and proton transport across the plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr*, 1991, **23**: 773~803
- 12 Misra P C. Transplasma membrane electron transport in plants. *J Bioenerg Biomembr*, 1991, **23**: 425~441
- 13 Rubinstein B, Luster D G. Plasma membrane redox activity: components and role in plant processes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, **44**: 131~155

## 纪念张景钺先生

李正理

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

张景钺先生是著名的植物学家,我国植物形态学(形态学、解剖学和胚胎学)的奠基人,几十年中为我国培养了不  
少植物学方面的人才,特别在筹建中国植物学会、创办《植物学杂志》和《植物学报》中,都曾有过不可磨灭的贡献。

张老于 1895 年 10 月 29 日生于湖北光化县(今襄阳县),1975 年 4 月 24 日逝世于北京。他于 1920 年赴美国,入当时国际著名的植物形态学中心芝加哥大学植物学系学习,1925 年获得科学博士学位。回国后任东南大学(今南京大学)生物学系教授,1932 年到北京大学任教,并任生物学系主任。抗战时,任西南联大生物学系代主任。复校后仍为北京大学生物学系主任,直到逝世。

张老于 1932 年到北京大学任教后,积极参加筹建中国植物学会。1933 年中国植物学会成立,并出版《植物学杂志》,张老担任会务(相当于现在的秘书长),直到抗战开始(1937),学会与杂志停止活动。解放后,1952 年创建《植物学报》,编辑委员会共有委员 10 人:张景钺、罗宗洛、戴芳澜、李继侗、林榕、饶钦止、段续川、曾呈奎、罗士苇、朱树屏。由罗士苇担任主任,实际工作由张老协同统筹。1954 年主任一职改由上年新增委员委成后担任,张老挂名“常务”,参与学报工作。到了 1959 年《植物学报》编辑委员会改组,并扩大为 31 人:主编钱崇澍,副主编张景钺;常委 12 人;编委 19 人。这一编委会组成以后,由于编委较多,就先分学科评审稿件,最后由张老总司其成。张老知识渊博,学风严谨,精通英、德语言,对于发稿刊登文章,篇篇过目,并作必要润色,一丝不苟。有时为外地来稿,可以不厌其烦地多次修改,力求能够刊出。凡此种种,难以尽述。1965 年学报主编逝世后,学报编委会没有及时改组,一切编辑事务仍都由张老负责进行。不过,此时张老健康已差,学报具体事务又由常委委成后全权办理,直到次年 10 月动乱开始,学报停刊为止。

张老一生,为人谦虚,工作严谨,待人诚恳。30 年代初创立《植物学杂志》和 50 年代初组建《植物学报》,张老都是主要负责人之一,一直勤勤恳恳、事必躬亲,而又从不计较个人名位,这种作风,诚可为后世楷模。