植物资源与环境学报 2000, 9(3): 30～33
Journal of Plant Resources and Environment

Hg^{2+}对菠菜离体类囊体膜光化学活性和多肽组分的影响

刘 双 陈国祥 王 娜
(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要: 重金属 Hg^{2+}对菠菜(*Spinacia oleracea* L.)离体类囊体膜的光合电子传递活性、室温吸收光谱、室温荧光发射光谱以及多肽组分影响的研究结果表明: Hg^{2+}对两个光系统的电子传递活性都有抑制作用, 且 Hg^{2+}对 PSI 的抑制作用较 PSII 大; Hg^{2+}处理使类囊体膜的室温吸收光谱峰及室温荧光发射峰降低, 但未使类囊体膜的多肽组分发生改变。

关键词: Hg^{2+}; 菠菜; 类囊体膜; 电子传递活性; 多肽组分
中图分类号: Q945.11 **文献标识码**: A **文章编号**: 1004-0978(2000)03-0030-04

Effect of Hg^{2+} on photochemical activity and polypeptide compositions of thylakoid membrane from spinach LIU Shuang, CHEN Guo-xiang, WANG Na (The College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, **9**(3): 30～33

Abstract: The effect of Hg^{2+} on electron transport activity of photosystem, absorption spectrum, fluorescence emission spectrum at room temperature and polypeptide compositions of spinach (*Spinacia oleracea* L.) thylakoid membrane was observed. The results were as follows: Hg^{2+} inhibited the electron transport activity of PSI and PSII and the inhibition to PSI was stronger than to PSII; The absorption spectra, fluorescence emission spectra at room temperature of thylakoid membrane were reduced; The polypeptide compositions were not changed after Hg^{2+} treatments.

Key words: Hg^{2+}; *Spinacia oleracea* L.; thylakoid membrane; electron transport activity; polypeptide compositions

Hg^{2+}是环境污染的重要因素之一, 能在植物体内积累并产生较强的毒性[1～3]。它作为一种逆境因子胁迫着植物的各种生理过程; Hg^{2+}能降低植物的光合作用[4], 抑制植物的光合电子传递活性及 Hill 反应活性[5～7], 但对其作用部位和作用方式目前尚不清楚。本实验以菠菜离体类囊体膜为材料, 检测不同浓度的 Hg^{2+}处理对光合电子传递活性、室温吸收光谱、室温荧光发射光谱以及类囊体膜多肽组分的影响, 以探讨 Hg^{2+}对高等植物光合膜的作用方式和机理。

1 材料和方法

1.1 材料

菠菜(*Spinacia oleracea* L.)购自市场。

1.2 方法

1.2.1 类囊体膜的制备 参照 Dunahay(1984)的 B.B.Y 法加以改进[8]。取新鲜菠菜叶片 50～100 g, 洗净, 吸干水分, 光照活化 20 min, 冰浴中剪碎, 加入 250 mL 冷却的缓冲液 B(0.4 mol/L Sucrose, 2 mmol/L $MgCl_2$, 0.2% BSA, 20 mmol/L Tricine, pH 8.0), 捣碎匀浆, 8 层纱布过滤, 滤液经 300 *g* 冷冻离心 2 min, 上清液经 4 000 *g* 冷冻离心 10 min, 得破碎叶绿体沉淀。沉淀用缓冲液 B_2(0.15 mol/L Sucrose, 5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2% BSA, 20 mmol/L Tricine, pH 8.0)匀浆再离心, 获沉淀, 再用缓冲液 B_3(15 mmol/L NaCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 20 mmol/L Mes, pH 6.5)悬浮匀浆, 即获得具光化学活性的类囊体膜制备液。

收稿日期: 2000-02-14
基金项目: 江苏省教育委员会高校科研项目(1999SWX0000SJ1)。
作者简介: 刘 双, 女, 1976 年 11 月生, 山东东营人, 在读硕士研究生, 主要从事植物生理生化方面的研究。

1.2.2　Hg^{2+}处理类囊体膜　分别将0.1、1、5和10 mmol/L的分析纯$HgCl_2$溶液加入类囊体膜中，制剂暗中处理30 min后进行测定，对照样品中加入等量缓冲液。

1.2.3　类囊体膜PSI、PSII及全链电子传递活性的测定　参照Coombs等的方法[9]，采用薄膜氧电极和自动记录装置分段测定光合电子传递链PSI还原能力、PSII放氧活性及全链电子传递活性，以每小时毫克叶绿素的微克分子放氧量〔μmol/(mg·h)〕表示，并计算不同浓度Hg^{2+}处理后活性占对照的百分率。

测定时，PSI反应液组分为：27 μg/mL叶绿素，0.5 mmol/L Sucrose，50 mmol/L Tricine-NaOH (pH 7.6)，5 mmol/L $MgCl_2$，0.5 mmol/L MV，5 mmol/L NH_4Cl，2 mmol/L NaN_3，0.5 mmol/L DCPIP，2 mmol/L DCMU；PSII反应液组分为：27 μg/mL叶绿素，0.5 mmol/L Sucrose，50 mmol/L Tricine-NaOH (pH 7.6)，5 mmol/L $MgCl_2$，5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$，1 mmol/L对苯二胺；全链电子传递反应液组分为：27 μg/mL叶绿素，0.5 mmol/L Sucrose，50 mmol/L Tricine-NaOH (pH 7.6)，5 mmol/L $MgCl_2$，2 mmol/L MV，2 mmol/L NaN_3，5 mmol/L NH_4Cl。反应温度20℃，光强1 200 μmol/(m^2·s)。

1.2.4　类囊体膜室温吸收光谱的测定　用UV-754型分光光度计测定类囊体膜的室温吸收光谱，测定时叶绿素含量为10 μg/mL。

1.2.5　类囊体膜室温荧光发射光谱的测定　用岛津RF-540型荧光分光光度计测定室温条件下类囊体膜的荧光发射光谱。测定时激发波长480 nm，狭缝10 nm，叶绿素含量为4 μg/mL。

1.2.6　类囊体膜多肽组分分析　参照Laemmli的方法[10]，SDS-PAGE法分离多肽组分，分离胶浓度为12%。

2　结果和讨论

2.1　不同浓度的Hg^{2+}对菠菜离体类囊体膜PSI、PSII及全链电子传递活性的影响

Hg^{2+}对类囊体膜PSII的Fecy光还原活性和PSI的MV光还原活性都有抑制作用，且Hg^{2+}对PSI的抑制作用较PSII大。由表1可看出，当Hg^{2+}浓度为5 mmol/L和10 mmol/L时，PSII的放氧活性分别被抑制了47.6%和66.7%，PSI的MV光还原活性则被抑制了76.2%和81.0%，而全链电子传递活性被抑制了76.5%和82.9%。这一结果表明Hg^{2+}与其他重金属离子如Cd^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}、Pb^{2+}等对光系统的作用方式不同[11,12]。许多实验证明，大多数重金属离子对PSII的抑制作用远较PSI显著，PSII是重金属离子作用最敏感的组分[7]。而Hg^{2+}对PSII的影响似有不同，Miles等认为Hg^{2+}是作为PSII直接的电子受体，且不为DCMU或其他类似的电子传递抑制剂所阻止[13]。本研究结果也初步表明，Hg^{2+}对PSI和PSII的光合电子传递活性均产生抑制作用，而且其抑制作用是多位点的。

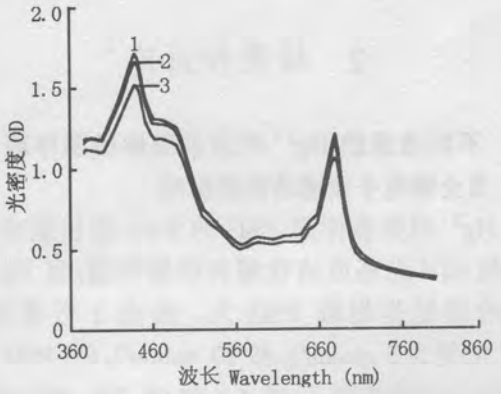
表1　Hg^{2+}对菠菜类囊体膜光合电子传递活性的影响
Table 1　Effects of Hg^{2+} on photosynthetic electron transport activity of thylakoid membrane in spinach

处理 Treatment	PSII H_2O→Fecy		PSI DCIP→MV		全链 H_2O→MV	
	μmol/(mg·h)	%	μmol/(mg·h)	%	μmol/(mg·h)	%
对照 Control	20.96	100	209.58	100	33.94	100
$HgCl_2$ 0.1 mmol/L	19.96	95.2	195.63	93.3	30.94	91.2
$HgCl_2$ 1 mmol/L	11.98	57.1	57.89	27.6	9.14	26.9
$HgCl_2$ 5 mmol/L	10.98	52.4	49.90	23.8	7.98	23.5
$HgCl_2$ 10 mmol/L	6.99	33.3	39.92	19.0	5.81	17.1

2.2　不同浓度的Hg^{2+}对菠菜离体类囊体膜室温吸收光谱的影响

不同浓度Hg^{2+}处理后菠菜类囊体膜室温吸收光谱见图1，由图1可看出，较低浓度〔0.1 mmol/L (未标出)、1 mmol/L〕的Hg^{2+}处理对类囊体膜室温吸收光谱影响不大，而较高浓度(10 mmol/L)的

Hg^{2+}处理使类囊体膜在红光(680 nm)和蓝紫光区域(430 nm)处的吸收峰略有下降,表明在一定浓度的Hg^{2+}处理下,光合膜结构及叶绿素的结合状态部分受损,光能的吸收传递及分配受到抑制,最终表现为吸收光谱的变化。

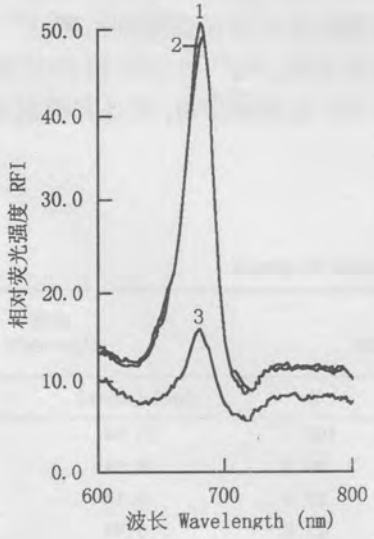


1. 对照 control; 2. 1 mmol/L Hg^{2+}处理 1 mmol/L Hg^{2+} treatment; 3. 10 mmol/L Hg^{2+}处理 10 mmol/L Hg^{2+} treatment

图1 Hg^{2+}对菠菜类囊体膜室温吸收光谱的影响

Fig.1 Effect of Hg^{2+} on the room temperature absorption spectrum of thylakoid membrane in spinach

2.3 Hg^{2+}对菠菜离体类囊体膜室温荧光发射光谱的影响



1. 对照 control; 2. 1 mmol/L Hg^{2+}处理 1 mmol/L Hg^{2+} treatment; 3. 10 mmol/L Hg^{2+}处理 10 mmol/L Hg^{2+} treatment

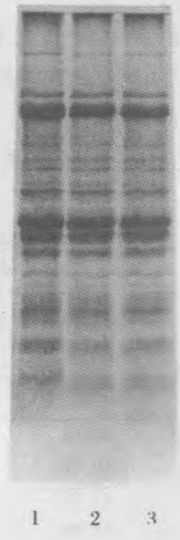
图2 Hg^{2+}对菠菜类囊体膜室温荧光发射光谱的影响

Fig. 2 Effect of Hg^{2+} on fluorescence emission spectrum of thylakoid membrane in spinach at room temperature

室温条件下,叶绿体的荧光几乎全部来自PSII[14],由图2可以看出,经Hg^{2+}处理后,类囊体膜在685 nm处的荧光发射峰下降,且较高浓度(10 mmol/L)的Hg^{2+}处理影响尤为显著,这表明Hg^{2+}处理改变类囊体膜的结构,并且可能破坏PSII作用中心及LHCII中叶绿素分子的结合状态,使PSII的荧光发射发生变化。

2.4 Hg^{2+}对菠菜离体类囊体膜多肽组分的影响

杨丹慧等用Cd^{2+}处理菠菜离体叶绿体,认为Cd^{2+}处理后促使部分LHCII发生降解[15];李功藩等用Cu^{2+}和Zn^{2+}处理叶绿体,发现Cu^{2+}损伤类囊体膜蛋白结构,使代表PSI和PSII的蛋白电泳区带明显减弱,而Zn^{2+}则无此作用[5]。本实验用SDS-PAGE对类囊体膜组分进一步分析,结果表明,Hg^{2+}处理并未使类囊体膜的多肽组分发生明显变化(图3);Hg^{2+}虽然使类囊体膜的结构受损从而影响光化学活性,但可能只是改变类囊体膜上蛋白复合物的空间结构,而并未造成蛋白多肽组分的解离和降解。由此可见重金属离子对光合作用的抑制作用随重金属离子的种类和植物类型的不同而有差别,不同离子的作用机理也不尽相同。



1. 对照 control; 2. 1 mmol/L Hg^{2+}处理 1 mmol/L Hg^{2+} treatment; 3. 10 mmol/L Hg^{2+}处理 10 mmol/L Hg^{2+} treatment

图3 Hg^{2+}对菠菜类囊体膜多肽组分的影响

Fig. 3 Effect of Hg^{2+} on polypeptide compositions of thylakoid membrane in spinach

结合上述实验结果可以看出，Hg^{2+}对光系统的作用方式是复杂的，它对光合电子传递的抑制位点及作用方式与其他重金属离子有所不同，对PSI的抑制作用较PSII明显，可能是作为PSII的电子受体参与作用；另一方面，由Hg^{2+}处理后导致的光能吸收（室温吸收光谱）、转化（荧光发射光谱）及多肽组分的变化情况可看出，Hg^{2+}处理改变类囊体膜的结构，并破坏PSII作用中心及色素蛋白复合物的结合状态，但对多肽组分并没有明显的影响。Hg^{2+}对不同植物的作用机理存在何种差别尚待进一步明确，需选择对Hg^{2+}等重金属敏感及抗重金属毒害的植物加以比较研究，并在PSI和PSII颗粒水平上进行深入探讨，从而为揭示重金属毒害机理、减少环境中Hg^{2+}及其他重金属污染程度提供依据。

参考文献

[1] 赖天斌，彭志耕，詹嘉红. 汞对水稻幼苗根系酯酶同工酶的影响[J]. 环境科学，1987，8(5)：36～38.

[2] 瞿爱权，东惠如，李俊国. Hg对水稻、油菜影响的研究初报[J]. 环境科学，1980，1(6)：50～52.

[3] 马成仓. Hg对油菜叶细胞膜的损伤及细胞的自身保护作用[J]. 应用生态学报，1998，9(3)：323～326.

[4] 韩宏英. Hg对斜生栅藻生长发育及光合作用的影响[J]. 环境科学学报，1984，4(2)：157～163.

[5] 李功藩，蔡琬平. 铜离子在光系统Ⅱ电子传递中的作用部位和方式[J]. 植物学报，1985，11(3)：303～309.

[6] 陈国祥，施国新，何　兵. Hg、Cd对莼菜越冬芽光合膜光化学活性及多肽组分的影响[J]. 环境科学学报 1999，19(5)：521～525.

[7] 杨丹慧. 重金属离子对高等植物光合膜结构与功能的影响[J]. 植物学通报，1991，8(3)：26～29.

[8] Dunahay T G, Staehelin L A, Seibert M, *et al*. Structural, biochemical and biophysical characterization of four oxygen-evolving photosystem preparations from spinach[J]. BBA, 1984, 764：179～193.

[9] Cooms J, Hall D O, Long S P, *et al*. Techniques in bio-productivity and photosynthesis[M]. Oxford: Pergamon Press. 1985. 136～137.

[10] Leammli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of facteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680～685.

[11] 杨丹慧，许春辉，赵福洪，等. 镉离子对菠菜叶绿体光系统Ⅱ的影响[J]. 植物学报，1989，31(9)：702～707.

[12] Marcelle R. Effects of stress on photosynthesis[M]. Martinus Nijhoff: The Hague. 1983. 371～382.

[13] Miles C D, Brandle J R, Daniel D J, *et al*. Hg^{2+}-A DCMU independent electron acceptor of PSII[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1973, 50：1113～1119.

[14] Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis[J]. The basics: Annual review of plant physiology and plant molecular biology, 1991, 42: 313～349.

[15] 杨丹慧，许春辉，王可玢，等. 镉离子对菠菜叶绿体色素蛋白质复合物及激发能分配的影响[J]. 植物学报，1990，32(3)：198～204.

（责任编辑：惠　红）

《中国资源综合利用》征订启事

《中国资源综合利用》（月刊）是由国家国内贸易局主管的综合性科技期刊，国内外公开发行，国内统一刊号CN32－1181/TG。该刊创立已有17年，是原国家国内贸易部优秀科技期刊之一。

环境、资源、人口是当今世界面临的三大主题，关系到经济和社会的可持续发展。该刊向您介绍国内外以废旧物资（包括各种废弃物）回收与再生利用为主的资源综合利用最新技术和发展动态，宣传贯彻国家资源综合利用的方针政策与法规，报道反映我国资源综合利用产业化的最新进展，推广应用综合利用先进工艺与设备，及时发布废旧物资市场行情，协助政府加强对资源综合利用（废旧物回收）行业的管理，宣传资源综合利用先进单位与先进经验，促进资源综合利用事业的更快发展。

邮发代号：28－174

地址：江苏省徐州市黄河南路65号

电话：(0516)5736600

邮编：221006