

叶绿体希尔反应和 P/O 比值的氧电极测定法探讨

叶济宇 李德耀 沈允钢

(中国科学院上海植物生理研究所)

薄膜氧电极 (Clark 型电极) 的测氧技术, 已广泛应用在叶绿体光合作用研究中^[1,2]。但用化学分析测定希尔 (Hill) 反应的铁氰化钾光还原量, 与用氧电极测定的放氧量之间, 得不到定量关系。在测定光合磷酸化和电子传递的比值 (即 $P/2e$ 或 P/O 比值) 时, 用化学分析所测到的 P/O 比值, 比用氧电极法测到的要低一些。此外, 用氧电极测 Hill 反应放氧时, 放氧时间曲线不呈直线。当光照停止后, 还会出现强烈的“吸氧”现象, 而此时已还原的亚铁氰化钾在暗中并未重新氧化。这些问题影响氧电极测定叶绿体光合作用的准确性, 为此我们对这些现象产生的原因作了一些研究, 并提出解决的办法。

实验方法

氧电极测氧装置及叶绿体希尔反应和 P/O 比值测定方法, 均同前文^[1]。希尔反应的铁氰化钾还原是按 Krogmann 等方法, 测定亚铁氰化钾形成^[3], 用 4 除后换算成 O_2 的微克分子数。叶绿体从菠菜叶片制备。

结果与讨论

一、溶液中溶解氧浓度与大气的平衡

在气压与温度不变的情况下, 溶液中饱和的溶解氧浓度是恒定的。当测定叶绿体 Hill 反应放氧时, 在照光前由于反应液中溶解氧浓度已接近与大气平衡, 照光时叶绿体放出的氧使反应液中氧浓度变成过饱和, 此时氧向外释放, 造成记录线呈抛物线状。光照停止后, 由于 Hill 反应放氧停止而过饱和的氧继续向外释放, 与大气中的氧趋于平衡, 记录线呈“吸氧”的现象 (图 1b)。如果在照光前先对反应液通 N_2 , 降低溶解氧浓度, 则照光下的放氧记录线的斜率

较陡, 光照停止后也无大量“吸氧”现象 (图 1a)。这是因为反应液中溶解氧浓度低, 照光下叶绿体释放的 O_2 可全溶于溶液而不释出。

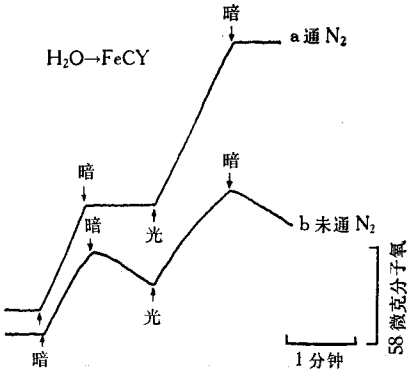


图 1 反应液通 N_2 或不通 N_2 的 Hill 反应放氧

二、反应室密闭程度对测氧的影响

在反应室不同的密闭条件下测定叶绿体 Hill 反应放氧, 可得图 2 的结果。曲线 a 为反应室处于完全密闭时所测到的放氧时间曲线, 曲线较直, 速率也较高, 光照停后无“吸氧”现象。曲线 b 为反应室处于开放条件下, 照光时放氧曲线呈抛物线状, 光照停止后, 出现强烈的“吸氧”。曲线 c 为反应室虽密闭, 但溶液中有气泡时的情况。当照光停止后, 由于过饱和的

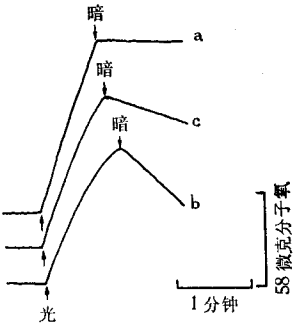


图 2 反应室不同密闭程度对 Hill 反应放氧检测的影响

氧可以释放到气泡中，故还呈现出速度较慢的“吸氧”。

三、Hill 反应的铁氰化钾光还原与放氧之间的准量测定

Hill 反应的铁氰化钾光还原量与氧释放之间应保持准量关系。但如果氧电极反应室密封不良，照光时溶解的过饱和氧向外释放，氧电极检测到的溶解氧浓度，比叶绿体实际释放出的氧为低，但测得的铁氰化钾光还原的速率则不受密闭条件影响，因而造成两者之间不成准量关系(图 3A)。如果先通 N₂ 以降低溶液中的溶解氧浓度，或使反应室密闭良好，都能用氧电极测到较正确的氧释放量，此时铁氰化钾还原量与放氧量之间就呈现出准量关系(图 3B)。

四、反应液中溶解的氧浓度对叶绿体 P/O 比值测定的影响

表示光合磷酸化与电子传递之间准量关系的 P/O 比值，是研究叶绿体能量转化效率的重

法的数值，在我们实验室也经常碰到。产生这种差别的原因之一，是因为氧电极测定结果与反应液中溶解氧浓度有关，图 4 是用氧电极测 P/O 之比值，在照光时，由于叶绿体放氧而造成溶解氧浓度过饱和，于是氧就外释，致使放氧曲线的斜率愈来愈小。光照停止后，发生大量“吸氧”，直至恢复到照光前的水平，如再照光，又可重复出现上述现象。如使反应液先通 N₂ 降低溶解氧浓度，其结果就不相同。图 5 为通 N₂ 与不通 N₂ 两种条件下测得 P/O 的比较。可以看出，未经通 N₂ 的记录线与图 1 中 b 一样，P/O 及 PC (光合控制) 比值愈测愈高；光照停止后出现“吸氧”现象。反应液通 N₂ 后，P/O 及 PC 比值也就降低；光照停后，反应记录线也保持平直。这种现象在多次重复测定中均可以看到，而且所测到的各循环的 P/O 比值也比较一致(表 1)。

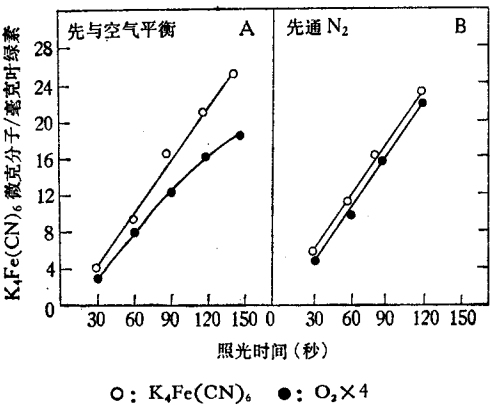


图3 Hill 反应 FeCY 光还原量与放氧量之间的准量测定

要内容，也是光合作用研究中尚有争议的问题。Arnon 等认为非循环光合磷酸化的 P/O 比值为 1^[4]，但许多实验室相继报告 P/O 比值可大于 1，甚至达到 2^[5]。然而我们分析 Hall 所列的近 30 篇关于 P/O 比值大于 1 的论文^[5]，其中 P/O 为 0.9—1.3 之间者，都是用分析铁氰化钾或 NADP 的光还原量和 ATP 形成量的比而得到。P/O 接近 2 的，绝大多数是用氧电极方法测到的。用氧电极法测到的 P/O 比值高于化学分析

表 1 反应液中不同的溶解氧状况对 P/O 及 PC 比值测定比较

实验编号	反应液先通 N ₂		反应液未通 N ₂	
	P/O	PC*	P/O	PC*
1.	0.69	1.17	0.84	2.60
	0.70	1.60	1.17	2.10
2.	0.70	1.70	0.96	3.60
	0.71	1.75	1.13	2.70
3.	0.78	1.80	1.00	3.80
	0.78	1.50	1.28	3.60
4.	0.68	1.90	0.81	3.20
	0.66	1.60	1.09	3.00

* 光合控制

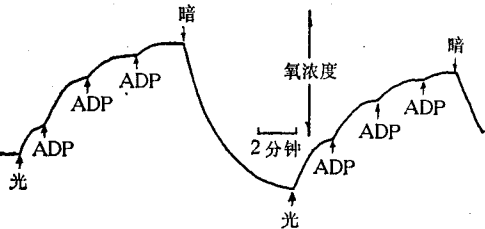


图4 氧电极测叶绿体 P/O 的记录图谱

综上所述，由于溶液中的溶解氧浓度要与大气维持平衡，当使用氧电极检测溶解氧浓度变化时，必须注意反应容器的密闭性。如果密闭

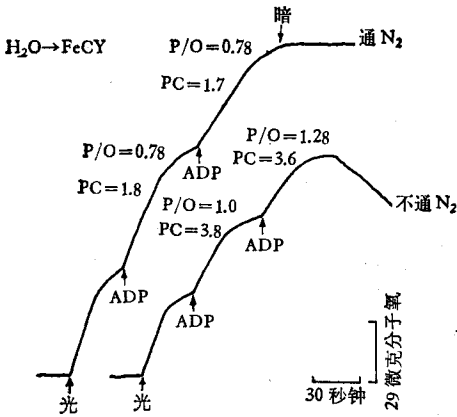


图5 反应液通 N_2 或不通 N_2 对 P/O 及 PC 比值测定影响

不严,或者溶液中留有气泡,将会带来测定上的误差,它不仅影响 Hill 反应速率或 P/O 比值等

测定,也会影响诸如完整叶绿体以 CO_2 为底物时的放氧速率测定的准确性。这对于评价用氧电极法所测到的较高 P/O 比值时尤为重要,必须予以注意。

参 考 文 献

- [1] 李德耀,叶济宇:《植物生理学通讯》,1980年,第77卷,第1期,第35页。
- [2] Fork, D. C.: *Methods in Enzymology*, Vol. XXIX, Part B. pp. 113, 1972.
- [3] Krogmann, D. W. et al.: *Plant Physiology*, 32, 373, 1957.
- [4] Arnon, D. I.: *Encyclopedia of Plant Physiology*, new series, Vol. 5, (ed by Trebst, A. et al.), pp. 7, 1977.
- [5] Hall, D. O.: *Intact chloroplast*, (ed by Barber) pp 135, 1976.

[本文于1982年6月8日收到]

一种制备大直径多层脂质体的简易方法 ——液体快速混合振荡法

吴玉薇 黄 芬

(中国科学院生物物理研究所)

脂质体是一种双分子磷脂组成的人工膜,它已广泛地作为研究生物膜的模型。近年来脂质体做为药物载体,又获得不少的进展。因用途不同,对脂质体的大小和均一程度要求也不一致。制备脂质体的方法有几种,如手摇法,注射法,透析法、超声法和机械振荡法等。这些方法制备的脂质体的大小一般为几十毫微米至1微米。本文介绍一种简易法,采用国产快速混合器振荡,可制备直径大多数为2微米的多层脂质体,适用冰冻断裂电子显微术研究,可直接观察到人工合成 DPPC (二棕榈酰磷脂酰胆碱) 脂质体晶相结构。

一、材 料 和 方 法

DPPC 系美国 Sigma 公司产品,用薄层层析鉴定为单一成份。HEPES(N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸)系瑞士 Fluka 产品。其它试剂均

为分析纯。

脂质体的制备

1. 超声法 秤一定量磷脂溶于氯仿,在小烧杯中真空抽干,形成一薄层;样品放真空干燥器中在冰箱过夜。干燥磷脂用 30mM HEPES 缓冲液 (pH5.8) 重悬,磷脂最终浓度为 20 毫克/毫升。用国产 H66025-P 超声波发生器 (28 千赫, 250W) 超声,温度 $45^{\circ}C$, 即形成脂质体。

2. 液体快速混合振荡法 DPPC 脂质体制备方法同上。改用国产 YKH-1 型液体快速混合器振荡,代替超声处理。

电镜负染

取上述两种方法制备的脂质体悬液,用 HEPES 缓冲液分别稀释 20 倍,取 5 微升样品滴在铺有 Formvar 膜的载网上,用 2% 磷钨酸 (pH7.0) 负染 30 秒钟,用滤纸吸去多余负染液,自然干燥。在 JEM 7 电子显微镜下进行观察。