



植物逆境生理学实验指导

施海涛 编



科学出版社

植物逆境生理学实验指导

施海涛 编



科学出版社

北京

内 容 简 介

本书包含植物的胁迫表征与渗透调节物、植物的第二信使与部分元素、植物的活性氧与抗氧化酶系统、植物代谢的部分关键酶和植物对病原细菌的抗性 5 个部分, 共 36 个实验, 基本涵盖了植物逆境生理学的所有实验操作。本书简明扼要、由表及里、深入浅出地介绍了植物逆境生理学相关实验体系; 既强调基础理论体系与实验技术的结合, 也注重知识的系统性与先进性, 语言的通俗性和科学性。

图书在版编目(CIP)数据

植物逆境生理学实验指导 / 施海涛编. —北京: 科学出版社, 2016
ISBN 978-7-03-046316-6

I. ①植… II. ①施… III. ①植物生理学-实验 IV. ①Q945-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 267633 号

责任编辑: 丛 楠 赵晓静 / 责任校对: 张怡君

责任印制: 徐晓晨 / 封面设计: 铭轩堂

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 1 月第 一 版 开本: 720×1000 B5

2016 年 1 月第一次印刷 印张: 7 1/8

字数: 161 000

定价: 19.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

丛 书 序

生命科学与技术是一门有较长历史的学科，即使在人类文明的初期，人们就已经注意到了生命与非生命的区别，并对各种生物进行了大量的观察、描述，收集整理了大量的相关材料。在 21 世纪的今天，生命科学与技术已经成为世界科学前沿最活跃的学科之一，并代表和引领着科学发展的最新方向。随着各种新理论、新概念、新技术和新方法的不断涌现，部分生命科学与技术专业课程的设置和内容明显落后于现代科学的发展，很多先进的技术方法和新理论不能及时走进课堂，也使学生缺乏关于高新技术发展对社会进步和日常生活影响的认识，进而影响了他们科学价值观的形成。

植物生理与基因工程是研究植物生命规律及其调控的科学，理论性较强，与农业生产密切相关。在过去的几十年里，植物生理与基因工程在探索作物高产、超高产潜力，揭示作物抗逆、生长发育过程的调控机制，在组培快繁、农产品储藏、保鲜研究等方面取得了很多重大成果。同时，植物生理与基因工程的发展还带动了作物栽培学、作物育种学、植物病理学、医药卫生工业等学科的发展，内容涉及植物分子生物学、植物细胞生物学、植物发育生物学、植物代谢、植物分子病理学、植物资源学等领域。植物生理与基因工程是当代生物学发展最迅速、最具活力和生机的领域，特别是近年来随着新技术的出现和发展，植物生理与基因工程的研究更是如虎添翼。而且，它与其他学科互相渗透，互相推动，从而促进了生命科学的发展。

在全球气候变化条件下，温度的升高和降水格局的变化，各种环境因子胁迫单独或联合作用将导致作物大幅度减产，并引发自然生态系统退化，已经成为制约现代农业发展的一个重要问题。然而，由于植物自身不能移动，当遭受逆境环境时只能应答外界胁迫，从而进化出一系列复杂而精密的调控机制，来感受外部胁迫并传递信号，最终在分子、细胞和整个植株水平形成应激性反应。各种逆境胁迫首先被植物细胞膜上的感应器所感受，然后信号通过第二信使被传导到下游

激发转录因子，从而启动基因的表达，最后通过基因产物的作用在生理生化等方面作出合适的调节反应，以应答相应的胁迫并存活下来。

植物的抗性既受系统发生的遗传基因所控制，又受个体发育中生理生态因素所制约。在逆境下，植物形态结构和生理特性发生明显变化。多种胁迫都会使自由水含量降低，光合作用减缓，呼吸变化异常，蛋白质、碳水化合物等物质分解大于合成。脯氨酸、甜菜碱、可溶性糖等可通过调节细胞的渗透势从而提高植物的抗渗透胁迫能力。在逆境下，植物激素的相对比例发生改变，以不同方式使植物的抗性得以提高，特别是脱落酸在其中起了重要的作用。生物膜往往是胁迫的原初作用部位，逆境下活性氧的产生和消除失去平衡，而抗氧化酶系统对膜系统起保护作用。因此，植物应答各种胁迫反应时，最直观的表现是在生理水平上，如促进渗透调节物的合成、诱导一些功能蛋白、离子调节和区域化、清除活性氧毒害等，所以研究植物逆境胁迫下生理反应具有十分重要的现实意义。

另外，植物表现在生理生化水平上的变化只是在应答非生物胁迫时的下游调整，针对激发这些下游生理生化变化的上游调控的分子机制则需要通过分子生物学的方法进行探讨，特别是分子遗传学的应用。反向遗传学的策略是从已知的基因序列入手鉴定其功能，研究手段包括基因的互补实验、超表达、反义抑制、基因敲除、基因激活等。研究植物体内基因的功能有两大方法，一是基因功能丧失，即筛选目的基因功能部分丧失或全部丧失的突变体，比较其与野生型的差异来确定该基因的功能；二是基因功能增加，即筛选目的基因高水平表达的功能增加植株，比较其与相应对照植株（野生型植株，功能丧失突变体）的差异，来分析基因功能。因此，植物分子生物学的研究方法在当前研究中越来越重要，是不可或缺的。

笔者从事植物逆境胁迫生理与基因工程研究和教学工作十余年，根据笔者多年相关研究经验，选择应用较多的植物逆境生理学实验 36 个和植物基因工程实验 27 个，共 63 个实验汇编成本系列丛书。其中植物逆境生理学实验包含 5 部分，即植物的胁迫表征与渗透调节物、植物的第二信使与部分元素、植物的活性氧与抗氧化酶系统、植物代谢的部分关键酶和植物对病原细菌的抗性；植物基因工程包含植物基因克隆，植物的组织培养、遗传转化和分子检测，以及植物基因的分子遗传与生化研究 3 部分；这些部分包括了从事相关专业的研究背景、原理和研究方法。本书既可应用于植物逆境生理学相关专业课程，也可应用于植

物分子生物学专业课程，还可应用于相关专业交叉学科。本丛书将植物逆境生理学和植物基因工程的理论原理与实际操作实验完美结合，学生能自主立项、独立完成实验，初步运用所学的基本实验技能，解决有关植物生理学的问题，在科学态度、实验技能、独立工作能力方面获得初步的训练。希望能够让相关领域的本科生、研究生和青年科研人员快速了解相关实验原理，并掌握相关实验操作。

本书序

植物逆境生理学是研究植物生命规律及其调控的科学，理论性较强，与农业生产密切相关，因而也是一门实验性科学。本书包含植物的胁迫表征与渗透调节物、植物的第二信息与部分元素、植物的活性氧与抗氧化酶系统、植物代谢的部分关键酶和植物对病原细菌的抗性 5 个部分，共 36 个实验，基本涵盖了植物逆境生理学的所有实验操作。本书是作者在十多年来科研和教学基础上逐步补充和完善而成，简明扼要、由表及里、深入浅出地介绍了植物逆境生理学相关实验体系；既强调基础理论体系与实验技术的结合，又注重知识的系统性与先进性，语言的通俗性和科学性。

本书引用了大量国内外同行的结果，在此一并表示感谢。由于编写时间仓促，以及编者水平有限和研究方向的局限性，书中难免存在一些不足和纰漏，敬请专家和读者给予批评指正和谅解。

本书能够成稿，要感谢海南大学农学院何朝族研究员和陈银华教授的大力帮助和支持，感谢海南大学教育教学改革研究课题（No. hdjy1601）和海南大学高层次人才引进的科研项目经费（经费编号：kyqd1531）的支持，还要感谢科学出版社的丛楠编辑在文字、图表和格式上认真细致的修改校正及热情耐心的关心与帮助。

施海涛

haitaoshi@hainu.edu.cn

2015 年 11 月于海南大学

目 录

丛书序

本书序

第一部分 植物的胁迫表征与渗透调节物	1
实验一 植物叶片中叶绿素含量的测定	2
实验二 植物叶片可溶性糖和蔗糖含量的测定	5
实验三 植物叶片中氨基酸(氨态氮)总量的测定	8
实验四 植物叶片中各种氨基酸的测定	11
实验五 植物叶片中脯氨酸含量的测定	14
实验六 植物叶片中总黄酮含量的测定	16
实验七 植物叶片中抗坏血酸(维生素 C)含量的测定	18
实验八 植物叶片中硫胺素(维生素 B ₁)的测定	22
实验九 植物叶片中核黄素(维生素 B ₂)的测定	25
实验十 植物叶片中维生素 B ₆ 的测定	28
第二部分 植物的第二信使与部分元素	31
实验十一 酶联免疫法测定植物叶片中的脱落酸	32
实验十二 植物叶片中脂肪酸成分的测定	36
实验十三 植物叶片和根中一氧化氮含量的测定	39
实验十四 植物叶片中钙的测定(EDTA 法)	42
实验十五 植物叶片中硝态氮的测定	46
实验十六 植物叶片中亚硝酸盐的测定	48
实验十七 植物叶片中磷的测定	50
实验十八 原子吸收分光光度法测定植物叶片中钾、钠、铁、铜、镉、钙、 锰、镁、锌的含量	52
第三部分 植物的活性氧与抗氧化酶系统	56
实验十九 植物叶片中丙二醛含量的测定	57

实验二十	植物叶片中过氧化氢含量的测定	58
实验二十一	植物叶片中超氧阴离子含量的测定	61
实验二十二	植物叶片中谷胱甘肽含量的测定	62
实验二十三	植物叶片中总蛋白的粗提与蛋白质含量的测定	65
实验二十四	植物叶片中过氧化氢酶(CAT)活性的测定	67
实验二十五	植物叶片中过氧化物酶(POD)活性的测定	68
实验二十六	植物叶片中谷胱甘肽还原酶(GR)活性的测定	70
实验二十七	植物叶片中抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的测定	72
实验二十八	植物叶片中超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定	74
实验二十九	植物叶片中多酚氧化酶(PPO)活性的测定	75
实验三十	植物叶片中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶(NOX)活性的测定	77
第四部分	植物代谢的部分关键酶	80
实验三十一	植物质膜 H ⁺ -ATP 酶活性的测定	80
实验三十二	植物叶片中三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)活性的测定	83
实验三十三	植物叶片中 1,6-二磷酸醛缩酶活性的测定	86
实验三十四	植物叶片中乙醇脱氢酶(ADH)活性的测定	89
第五部分	植物对病原细菌的抗性	91
实验三十五	植物叶片对病原细菌的基础抗性与系统获得抗性的测定	91
实验三十六	植物叶片中水杨酸(SA)含量的测定	94
主要参考文献		97
名词索引(中英文对照)		99

第一部分 植物的胁迫表征与渗透调节物

在全球气候变化条件下，温度的升高和降水格局的变化，各种环境因子胁迫单独或联合作用将导致作物大幅度减产，并引发自然生态系统退化，已经成为制约现代农业发展的一个重要问题。仅以干旱和盐害为例作如下介绍，就可以非常直观地发现逆境胁迫对农业生产的危害是非常大的。据统计，世界干旱半干旱地区占陆地面积的 34.9%；我国干旱半干旱地区约占国土面积的 53%，全国灌溉区因缺水而少收粮食 350 亿~400 亿 kg。干旱的威胁不只发生在北方干旱半干旱地区，年降水量大的南方湿润半湿润地区也会因雨量时空分布不均而经常发生强季节性干旱。干旱对世界作物产量的影响，在诸多自然逆境中占首位，其危害相当于其他灾害的总和。全球约有 8 亿公顷土地都属于盐碱地，超过全部土地的 6%，约占全部耕地面积的 1/5。随着土壤中易溶性盐含量的增高，对植物的损伤也不断加大，导致植物减产甚至死亡。当含盐量达到 0.1%~0.3% 时，已经变得不适合不耐盐植物生长。当含盐量达到 0.3%~0.6% 时，则大多数农作物的生长发育都将受到抑制，造成不同程度的损伤。

植物胁迫给植物带来的危害是多方面的，但最直观的就是对植物形态的影响：①干旱会导致叶片和嫩茎萎蔫，气孔开度减小甚至关闭；②淹水使叶片黄化、枯干，根系褐变甚至腐烂，高温下叶片变褐，出现死斑，树皮开裂；③逆境往往使细胞膜变性、龟裂，细胞的区域化被打破，原生质的性质改变，叶绿体、线粒体等细胞器结构遭到破坏。植物胁迫也会导致一系列的代谢毒害：①逆境降低核酮糖-1,5-二磷酸(ribulose diphosphate carboxylase, RuBP)羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)羧化酶的活性，破坏叶绿素且使其生物合成受阻，使得叶绿素和总类胡萝卜素含量在叶中普遍降低；②各种非生物胁迫都会造成活性氧毒害，这些活性氧的大量积累将启动过氧化连锁反应，造成膜功能紊乱甚至细胞死亡；③逆境将促进蛋白质的分解，而抑制其合成；逆境还会降低植物的脂类含量，由于脂类是大多数细胞内膜的结构组成，脂类含量的降低将影响细胞膜的通透性和产生其他代谢伤害。而植物形态结构的变化与代谢和功能的变

化是一致的，因此研究植物的胁迫表征是十分关键的。

渗透调节物主要包括脯氨酸、甜菜碱、可溶性糖类(如蔗糖、葡萄糖、果糖、半乳糖等)和多元醇类(如甘油、山梨醇、甘露醇等)等。这些渗透调节物的存在共同减少了植物细胞水分渗透压力，保持细胞内外渗透压平衡，以维持植物在胁迫条件下的正常生长需要。它们的共同特点是：①相对分子质量小、易溶解；②有机调节物在生理 pH 范围内不带静电荷；③能被细胞膜保持住；④引起酶结构变化的作用极小；⑤在酶结构稍有变化时，能使酶构象稳定，而不至溶解；⑥生成迅速，并能累积到足以引起渗透势调节的量。因此，检测植物体内各种渗透调节物的含量也是十分必要的。

本部分共包括 10 个实验，即实验一 植物叶片中叶绿素含量的测定；实验二 植物叶片可溶性糖和蔗糖含量的测定；实验三 植物叶片中氨基酸(氨态氮)总量的测定；实验四 植物叶片中各种氨基酸的测定；实验五 植物叶片中脯氨酸含量的测定；实验六 植物叶片中总黄酮含量的测定；实验七 植物叶片中抗坏血酸(维生素 C)含量的测定；实验八 植物叶片中硫胺素(维生素 B₁)的测定；实验九 植物叶片中核黄素(维生素 B₂)的测定；实验十 植物叶片中维生素 B₆ 的测定。

实验一 植物叶片中叶绿素含量的测定

一、实验原理

光合作用是通过合成一些有机化合物将光能转变为化学能的过程。叶绿素(chlorophyll)是一类与光合作用(photosynthesis)有关的最重要的色素。叶绿素实际上存在于所有能营造光合作用的生物体中，包括绿色植物、原核的蓝绿藻(蓝菌)和真核的藻类。叶绿素从光中吸收能量，然后能量被用来将二氧化碳转变为碳水化合物。叶绿素为镁卟啉化合物，包括叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 c、叶绿素 d、叶绿素 f、原叶绿素和细菌叶绿素等。

叶绿素分子是由两部分组成的：核心部分是一个卟啉环(porphyrin ring)，其功能是吸收光；另一部分是一个很长的脂肪烃侧链，称为叶绿醇(phytol)，叶绿素用这种侧链插入类囊体膜。与含铁的血红素基团不同的是，叶绿素卟啉环中含有一个镁原子。叶绿素分子通过卟啉环中单键和双键的改变来吸收可见光。各种叶绿素之间的结构差别很小。如叶绿素 a 和叶绿素 b 仅在吡咯环 II 上的附加基团

上有差异：前者是甲基，后者是甲醛基。细菌叶绿素和叶绿素 a 不同处也只在于卟啉环 I 上的乙烯基换成酮基和卟啉环 II 上的一对双键被氢化。

高等植物叶绿体中的叶绿素主要有叶绿素 a 和叶绿素 b 两种。它们不溶于水，而溶于有机溶剂，如乙醇、丙酮、乙醚、氯仿等。叶绿素 a 分子式： $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ ；叶绿素 b 分子式： $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ 。在颜色上，叶绿素 a 呈蓝绿色，而叶绿素 b 呈黄绿色。按化学性质来说，叶绿素是叶绿酸的酯，能发生皂化反应。叶绿酸是双羧酸，其中一个羧基被甲醇所酯化，另一个被叶醇所酯化。叶绿素分子含有一个卟啉环的“头部”和一个叶绿醇的“尾巴”。镁原子居于卟啉环的中央，偏向于带正电荷，与其相连的氮原子则偏向于带负电荷，因而卟啉具有极性，是亲水的，可以与蛋白质结合。叶醇是由 4 个异戊二烯单位组成的双萜，是一个亲脂的脂肪链，它决定了叶绿素的脂溶性。叶绿素不参与氢的传递或氢的氧化还原，而仅以电子传递（即电子得失引起的氧化还原）及共轭传递（直接能量传递）的方式参与能量的传递。卟啉环中的镁原子可被氢离子、铜离子、锌离子所置换。用酸处理叶片，氢离子易进入叶绿体，置换镁原子形成去镁叶绿素，使叶片呈褐色。去镁叶绿素易再与铜离子结合，形成铜代叶绿素，颜色比原来更稳定。人们常根据这一原理用乙酸铜处理来保存绿色植物标本。叶绿醇是亲脂的脂肪族链，由于它的存在而决定了叶绿素分子的脂溶性，使之溶于丙酮、乙醇、乙醚等有机溶剂。由于结构上的差别，叶绿素 a 呈蓝绿色，叶绿素 b 呈黄绿色。

叶绿素不很稳定，光、酸、碱、氧、氧化剂等都会使其分解。酸性条件下，叶绿素分子很容易失去卟啉环中的镁成为去镁叶绿素。叶绿素溶液能进行部分类似光合作用的反应，在光下使某些化合物氧化或还原。人工制备的叶绿素膜在光下能产生光电位和光电流，也能催化某些氧化还原反应。

水是植物进行光合作用不可或缺的，各种逆境胁迫下，光合速率的下降是气孔限制和非气孔限制双重作用的结果。叶绿素在植物体内是不断进行代谢的，与光合作用及产量形成的关系密切。叶绿素是光合作用中最重要和最有效的色素，其含量在一定程度上能反映植物同化物质的能力，从而影响植物的生长。植物缺少水分会抑制叶绿素的生物合成，而且与蛋白质合成受阻有关，严重缺水还会加速原有叶绿素的分解，因此植物在遭受各种胁迫时，叶片呈黄褐色。所以叶绿素含量是衡量植物在胁迫情况下生长状态的一个非常重要的生理指标。

二、实验仪器

常用玻璃容器与 EP 管, 烘箱, 天平, 研磨器, 冷冻离心机, 移液枪(配套枪头), 紫外分光光度计等。

三、实验试剂

无水乙醇, 双蒸水。

四、实验步骤

(1) 取 4 周的植物叶片在 80℃ 的烘箱内干燥过夜, 然后准确称取 100 mg 新鲜叶片加入液氮后用研磨棒充分磨碎后放入试管中, 加入 5 ml 95% (V/V) 乙醇, 放置黑暗中 48 h 提取。

(2) 12 000 r/min、4℃、离心 5 min 收集上清提取液。用分光光度计分别测定提取液在 649 nm 和 665 nm 下的吸光度。

(3) 用下列公式分别计算出样品中叶绿素 a 的浓度 (Chl_a)、叶绿素 b 的浓度 (Chl_b) 和叶绿素的总浓度 (Chl)。

$$\text{Chl}_a (\text{mg/g FW}) = (13.95 \times \text{OD}_{665} - 6.88 \times \text{OD}_{649}) \times 0.005/0.1 \quad (1-1)$$

$$\text{Chl}_b (\text{mg/g FW}) = (24.96 \times \text{OD}_{649} - 7.32 \times \text{OD}_{665}) \times 0.005/0.1 \quad (1-2)$$

$$\text{Chl} (\text{mg/g FW}) = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b = (18.08 \times \text{OD}_{649} + 6.63 \times \text{OD}_{665}) \times 0.005/0.1 \quad (1-3)$$

式中, Chl_a 为样品中叶绿素 a 的浓度; Chl_b 为样品中叶绿素 b 的浓度; Chl 为样品中叶绿素的总浓度, 即叶绿素 a 和叶绿素 b 的总浓度; OD_{649} 为样品提取液在 649 nm 下的吸光度; OD_{665} 为样品提取液在 665 nm 下的吸光度。

五、思考题

- (1) 为什么叶绿素提取要放置在黑暗中?
- (2) 叶绿素在常温下是否稳定?
- (3) 在胁迫情况下, 植物叶绿素为什么会发生变化?

实验二 植物叶片可溶性糖和蔗糖含量的测定

一、实验原理

糖类物质是多羟基(两个或以上)的醛类(aldehyde)或酮类(ketone)化合物,在水解后能变成以上两者之一的有机化合物。在化学上,由于其由碳元素、氢元素、氧元素构成,在化学式的表现上类似于“碳”与“水”聚合,故又称之为碳水化合物。糖类物质是多羟基醛或酮,据此可分为醛糖(aldose)和酮糖(ketose)。糖还可根据碳原子数分为丙糖(triose)、丁糖(tetrose)、戊糖(pentose)、己糖(hexose)。最简单的糖类就是丙糖(甘油醛和二羟丙酮),由于绝大多数的糖类化合物都可以用通式 $C_n(H_2O)_n$ 表示,因此过去人们一直认为糖类是碳与水的化合物,称为碳水化合物。后来发现有些糖如鼠李糖($C_6H_{12}O_5$)、脱氧核糖($C_5H_{10}O_4$)并不符合碳水化合物通式;此外,有些有机化合物的分子中氢氧原子个数之比恰好是2:1,如甲醛(CH_2O)、乙酸($C_2H_4O_2$),符合碳水化合物定义,但不是糖类。

糖还可根据结构单元数目的多少分为以下4种。①单糖(monosaccharide):不能被水解成更小分子的糖。常见单糖有葡萄糖($CH_2OH-CHOH-CHOH-CHOH-CHOH-CHO$)、果糖($CH_2OH-CHOH-CHOH-CHOH-CO-CH_2OH$)、核糖($CH_2OH-CHOH-CHOH-CHOH-CHO$)和脱氧核糖($CH_2OH-CHOH-CHOH-CH_2-CHO$)。②低聚糖,又称寡糖(disaccharide):由2~10个单糖分子脱水缩合而成。具有营养意义的低聚糖是双糖,也较为普遍。常见双糖有以下3种:蔗糖,广泛存在于植物的根、茎、叶、花、果实和种子中,尤以甘蔗和甜菜中含量最高,故名蔗糖。蔗糖分子由一个葡萄糖分子和一个果糖分子缩合而成。麦芽糖,又称饴糖,甜度约为蔗糖的一半。麦芽糖分子由两个葡萄糖分子脱水缩合而成。乳糖,因存在于哺乳动物的乳汁中而得名。乳糖分子由一个葡萄糖分子和一个半乳糖分子结合而成。③多糖(polysaccharide):由几百个乃至几万个单糖分子缩合生成,通式为 $(C_6H_{10}O_5)_n$,最重要的是淀粉与纤维素。均一性多糖有淀粉、糖原、纤维素、半纤维素、几丁质(壳多糖);不均一性多糖有糖胺多糖类(透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素等)。④结合糖(glycoconjugate):糖脂、糖蛋白(蛋白聚糖)、糖-核苷酸等。

糖的生物学功能主要是：①提供能量，植物的淀粉和动物的糖原都是能量的储存形式；②物质代谢的碳骨架，为蛋白质、核酸、脂类的合成提供碳骨架；③细胞的骨架，纤维素、半纤维素、木质素是植物细胞壁的主要成分，肽聚糖是原核生物细胞壁的主要成分；④细胞间识别和生物分子间的识别，细胞膜表面糖蛋白的寡糖链参与细胞间的识别。一些细胞的细胞膜表面含有糖分子或寡糖链，构成细胞的天线，参与细胞通信。葡萄糖的分解代谢途径主要有三条，根据其反应条件、反应过程及终产物的不同而分为：①在不需氧时进行的无氧化(糖酵解)；②在需氧时进行的有氧氧化；③生成磷酸戊糖和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸即还原型辅酶Ⅱ(triphosphopyridine nucleotide, NADPH)的磷酸戊糖途径。

可溶性糖就是易溶于水的糖。常见的有葡萄糖、果糖、麦芽糖和蔗糖。还原糖是能够还原斐林试剂的糖，是生物实验中常用到的试剂，所有单糖(除二羟丙酮)，无论醛糖还是酮糖都是还原糖。总糖是指某种食品或物体里所含有糖的总量。可溶性糖类(如蔗糖、葡萄糖、果糖、半乳糖等)是植物体内的重要的渗透调节物，它们的存在可以减少胁迫条件下植物细胞水分渗透压，保持细胞内外渗透压平衡，以维持植物在胁迫条件下的正常生长需要。因此可溶性糖含量是衡量植物在胁迫情况下渗透调节物的一个非常重要的生理指标。

糖在浓硫酸作用下，可经脱水反应生成糠醛或羟甲基糠醛，生成的糠醛或羟甲基糠醛可与蒽酮反应生成蓝绿色糠醛衍生物，在一定范围内，颜色的深浅与糖的含量成正比，故可用于糖的定量测定。该法的特点是几乎可以测定所有的碳水化合物，不但可以测定戊糖与己糖，而且可以测所有寡糖和多糖，其中包括淀粉、纤维素等(因为反应液中的浓硫酸可以把多糖水解成单糖而发生反应)，所以用蒽酮法测出的碳水化合物含量，实际上是溶液中全部可溶性碳水化合物总量，在没有必要细致划分各种碳水化合物的情况下，用蒽酮法可以一次测出总量，省去许多麻烦，因此，有特殊的应用价值。但在测定水溶性碳水化合物时，因与蒽酮试剂发生反应而增加了测定误差。此外，不同的糖类与蒽酮试剂的显色深度不同，果糖显色最深，葡萄糖次之，半乳糖、甘露糖较浅，五碳糖显色更浅，故测定糖的混合物时，常因不同糖类的比例不同造成误差，但测定单一糖类时，则可避免此种误差。糖类与蒽酮反应生成的有色物质在可见光区的吸收峰为630 nm，故在此波长下进行比色。

二、实验仪器

常用玻璃容器与 EP 管, 烘箱, 天平, 研磨器, 水浴锅, 冷冻离心机, 移液枪(配套枪头), 紫外分光光度计等。

三、实验试剂及配制

乙醇, 活性炭, NaOH, HCl, 间苯二酚, 蔗糖, 葡萄糖, 蒽酮, 浓硫酸。

0.1% (W/V) 间苯二酚: 0.1 g 间苯二酚溶于 100 ml 95% 乙醇, 避光保存。

蒽酮试剂: 先将 76 ml 浓硫酸加入 24 ml 水中配制成 100 ml 稀硫酸, 再将 150 mg 蒽酮溶于 100 ml 稀硫酸, 该溶液需要现用现配。

四、实验步骤

1. 从植物材料中提取可溶性糖

取新鲜的植物叶片在 80℃ 的烘箱内干燥过夜, 然后准确称取 50 mg 干叶片用研磨棒充分磨碎后放入试管中, 加入 5 ml 80% 乙醇, 置于 80℃ 水浴 40 min, 在水浴过程中不断搅拌以充分提取, 然后离心收集上清液, 同时将残渣用 80% (V/V) 乙醇重复提取两三次, 然后合并上清液。最后在上清液中加入少量的活性炭, 在 80℃ 脱色反应 30 min, 12 000 r/min、4℃、离心 5 min 收集上清提取液, 最后定容至 10 ml, 过滤后取滤液或离心后取上清液为下面实验备用。

2. 还原糖含量测定

取 50 μ l 上一步乙醇提取液, 加入 50 μ l 2 mol/L NaOH, 形成 0.1 ml 反应体系, 100℃ 煮沸 5 min, 过程中不断搅拌以充分提取, 冷却后加入 0.7 ml 30% (W/V) HCl, 0.2 ml 0.1% (W/V) 间苯二酚, 摇匀, 80℃ 水浴反应 10 min, 在水浴过程中不断搅拌以充分提取, 冷却后测定 OD₄₈₀。同时配制不同浓度的还原糖溶液, 按上述步骤进行反应后测定不同浓度的还原糖溶液反应液的 OD₄₈₀, 以此作出标准曲线来计算样品中的还原糖含量。

3. 可溶性总糖的测定

取 50 μ l 上一步乙醇提取液进行干燥浓缩, 加入 3 ml 蒽酮试剂, 90℃ 水浴 15 min, 水浴过程中不断搅拌以充分提取, 然后测定 OD₆₂₀。同时配制不同浓度的葡萄糖溶液, 按上述步骤进行反应后测定不同浓度的葡萄糖溶液反应液的

OD₆₂₀，并以此作出标准曲线来计算样品中的可溶性总糖含量。

五、思考题

- (1) 糖有哪些分类?
- (2) 糖有哪些生物学功能?
- (3) 间苯二酚溶液要怎么保存?
- (4) 蒽酮试剂为什么要现用现配?
- (5) 胁迫情况下，植物叶片中糖含量会发生什么变化?

实验三 植物叶片中氨基酸(氨态氮)总量的测定

一、实验原理

自然界存在的含氮化合物跟人类息息相关，人类生命所需的含氮物质主要来源于粮食和动物提供的有机氮和饮用水中提供的无机氮化物。然而，随着人口增长，人类对环境的破坏愈加剧烈，酸雨、土壤污染及水污染等灾害严重影响了动植物的健康，因而为了人类自身的可持续发展，为了人类的身心健康，需保护环境，监测动植物食品和饮用水中污染物的含量，以达到预防为主、防治结合的目的。

目前，国家标准针对氮的分析主要分以下 5 个方面：总氮、氨氮、硝酸盐氮、亚硝酸盐氮、凯氏氮。

1. 总氮

总氮是指含氮量(包括硝酸盐氮、亚硝酸盐氮、无机铵盐、溶解态氨几部分有机含氮化合物中氮的总和)。可溶性总氮是指可溶性及含可过滤性固体(小于 0.45 μm 颗粒物)的含氮量。总氮的测定方法，一是采用分别测定有机氮和无机氮化合物(氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮)后加和的办法；二是以过硫酸钾氧化，使有机氮和无机氮转变为硝酸盐后，通过离子选择电极法对溶液中的硝酸根离子进行测量，也可以用紫外法或还原为亚硝酸盐后，用偶氮比色法，以及离子色谱法进行测定。

2. 氨氮

氨氮是指游离氨(或称非离子氨，NH₃)或离子氨(NH₄⁺)形态存在的氨。pH