



普通高等教育农业部“十二五”规划教材



普通高等教育“十二五”规划建设教材

植物生理学实验教程

Zhíwù Shēnglǐxué Shíyàn Jiàochéng

第2版

樊金娟 阮燕晔 主编



中國農業大學出版社

ZHONGGUONONGYEDAXUE CHUBANSHE



普通高等教育农业部“十二五”规划教材



普通高等教育“十二五”规划建设教材

植物生理学实验教程

Zhiwu Shenglixue Shixyan Jiaocheng

第2版

樊金娟 阮燕晔 **主 编**



中国农业大学出版社

ZHONGGUONONGYEDAXUE CHUBANSHE

内容简介

本书是普通高等教育农业部“十二五”规划教材。植物生理学实验作为植物生理学课程的重要组成部分在农林学科人才培养中占有重要地位。本书以细胞生理-代谢生理-生长与生殖生理-抗性生理为体系,通过系统介绍研究植物生命活动规律的基本方法和技术,在学生掌握严谨科学实验手段的基础上,设置了综合设计型实验一章,重点培养学生在实践中发现问题、解决问题的创新精神与实践能力。全书内容精炼、编排合理,注重解决农业生产中的实际问题,实验步骤清晰、语言简洁,使读者易于自学和参照实施。本书除可作为大学生实验教材外,也可作为研究生及科研人员和农业技术工作者的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

植物生理学实验教程/樊金娟,阮燕晔主编.—2版.—北京:中国农业大学出版社,2015.6

ISBN 978-7-5655-1205-6

I. ①植 II. ①樊… ②阮… III. ①植物生理学-实验-高等学校-教材
IV. ①Q945-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 070422 号

书 名 植物生理学实验教程 第2版

作 者 樊金娟 阮燕晔 主编

策划编辑 张秀环

责任编辑 张秀环

封面设计 郑川

责任校对 王晓凤

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

邮政编码 100193

电 话 发行部 010-62731190,2620

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出版部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

e-mail cbsszs@cau.edu.cn

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2015年12月第2版 2015年12月第1次印刷

规 格 787×980 16开本 11.5印张 212千字

定 价 28.00元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

第2版编审人员

主 编 樊金娟 阮燕晔

副主编 李奕松 刘 新 韩建民 刘 明 朱延姝

编写人员 (以姓氏笔画为序)

王兰兰(沈阳师范大学)

王征宏(河南科技大学)

王海珍(塔里木大学)

刘 明(塔里木大学)

刘 新(青岛农业大学)

朱延姝(沈阳农业大学)

阮燕晔(沈阳农业大学)

李奕松(北京农学院)

邵艳军(河北农业大学)

武志海(吉林农业大学)

崔震海(沈阳农业大学)

韩建民(河北农业大学)

樊金娟(沈阳农业大学)

戴凌燕(黑龙江八一农垦大学)

主 审 张立军(沈阳农业大学)

第1版编审人员

主 编 张立军 樊金娟

副主编 李奕松 阮燕晔

编写人员 (以姓氏笔画为序)

王征宏(河南科技大学)

阮燕晔(沈阳农业大学)

张立军(沈阳农业大学)

李奕松(北京农学院)

武志海(吉林农业大学)

赵方贵(青岛农业大学)

崔震海(沈阳农业大学)

樊金娟(沈阳农业大学)

戴凌燕(黑龙江八一农垦大学)

主 审 陈凤玉(沈阳农业大学)

第2版前言

本教材自2007年第一版以来,被很多兄弟院校选用,得到了同行的认可。但在使用过程中,发现了一些错误和不足,使用单位也提出了一些很好的建议和改进意见。同时,植物生理学实验作为植物生理学课程的重要组成部分,在农林学科人才培养中占有重要地位,实验教学上更加注重强调培养学生解决问题的创新精神与实践能力,也需要对教材进行不断地调整、充实和更新。所以,在中国农业大学出版社和沈阳农业大学教材科的大力支持下,我们对教材进行了修订。

在章节安排上,本教材仍分为十章,在继续保留第一版植物生理学最实用技术和方法的基础上,为了使本书与理论教材联系更紧密,也更贴近于实践,增加了部分实验内容和基本实验项目。修订后的教材共包括48个实验,70个基本实验项目,综合设计型实验5个,涉及21个基本实验项目,并给出了11个设计型实验的参考题目。

但在编写单位、人员分工和内容上做了一些调整。本书前言由樊金娟执笔;第一章由戴凌燕和武志海编写;第二章由王海珍和刘明编写;第三章由李奕松编写;第四章由樊金娟编写;第五章由刘新编写;第六章由韩建民和邵艳军编写;第七章由朱延姝编写;第八章由王兰兰编写;第九章由崔震海和王征宏编写;第十章由阮燕晔编写;附录由崔震海编写。

全书由樊金娟、阮燕晔、朱延姝、崔震海统稿,张立军审稿。樊金娟、阮燕晔根据出版社和审稿的意见对全书进行了审读、修改和补充。

修订后的教材我们力求在体系上更加合理,内容上更加充实,语言上更加简练。但由于编者的水平有限,书中定有疏漏、错误和不妥。敬请各位同行和读者批评指正。

在教材再版过程中得到了中国农业大学出版社和沈阳农业大学教材科的大力支持,本书引用了国内外许多教材和相关著作及论文的内容和图表,在此一并表示感谢。

编者

2014年9月

第1版前言

植物生理学是研究植物生命活动规律及调节机理的学科,是生物科学的一个重要分支,具有很强的实验性和应用性。随着现代生物科学技术的发展,植物生理学与其他学科交叉渗透日趋加强,研究领域不断扩展和深化,在教学上更加强调实验和动手能力,这就需要实验教材不断地调整、充实和更新。为了满足植物生理学教学改革的需要,我们在该领域前辈们数十年积累的许多成就和经验的基础上,结合现代生物科学实验技术的进展,组织编写了这本《植物生理实验教程》。

全书共分十章,包括34个实验49个基本实验项目,包括了植物生理学最实用的技术和方法,并在每个实验中都给出实验前思考题和实验后思考题。同时,为了培养学生的创新能力,增加了综合设计型实验一章,包括5个综合性实验,涉及20个基本实验,并给出了9个设计型实验的参考题目。在实验步骤的编写上我们力求清晰、简洁,能归纳成表格的不用语言叙述,使之更容易参照实施。在附录中列出了实验报告的写作要求和常用的生物统计公式。本书除可作为大学生实验教材外,也可作为研究生及科研人员和技术工作者的参考。

本书前言由张立军执笔;第一章由戴凌燕编写;第二、九章由樊金娟编写;第三章由李奕松编写;第四、十章由阮燕晔编写;第五章由赵方贵编写;第六章由王征宏编写;第七章由武志海编写;第八章和附录由崔震海编写。全书由张立军、樊金娟、阮燕晔、崔震海统稿,陈凤玉审稿。张立军、樊金娟、阮燕晔根据出版社和审稿的意见对全书进行了审读、修改和补充。本书的编写和出版得到中国农业大学出版社和沈阳农业大学教材科的大力支持,特致谢意。

但由于编者的水平有限,编写时间仓促,书中难免存在不足之处,敬请读者和专家给予指正。

编者

2007年4月

目 录

第一章 植物的细胞生理	1
实验一 叶绿体的分离制备及活力测定	1
实验二 线粒体的分离制备及活性测定	3
实验三 细胞的质壁分离与质壁分离复原	9
实验四 细胞质膜微囊的分离及纯化	11
实验五 膜脂的提取分离及定量测定	16
第二章 植物的水分生理	19
实验一 植物组织含水量、相对含水量及水分饱和亏的测定	19
实验二 叶片保水力的测定	21
实验三 组织自由水和束缚水含量的测定	22
实验四 植物组织水势的测定	25
实验五 细胞渗透势的测定	31
实验六 植物蒸腾速率的测定	33
实验七 气孔运动及其影响因素	35
实验八 植物叶片气孔密度和面积的测定	40
第三章 植物的矿质营养	43
实验一 根系活力的测定	43
实验二 伤流量的测定	47
实验三 硝酸还原酶活性的测定	50
实验四 植物组织硝态氮含量的测定	54
实验五 溶液培养和缺素培养	56
第四章 植物的光合作用	59
实验一 叶绿体色素的提取、分离、理化性质和定量测定	59
实验二 光合速率的测定	67
实验三 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶活性的测定	71

实验四	磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性的测定	74
实验五	叶绿素荧光参数的测定	76
第五章	植物的呼吸作用	79
实验一	呼吸速率的测定	79
实验二	抗坏血酸氧化物酶和多酚氧化酶活性的测定	83
实验三	植物组织中 ATP 含量的测定	86
实验四	植物组织 ATP 酶活性测定	89
第六章	植物有机物质运输与转化	92
实验一	植物组织可溶性糖含量的测定	92
实验二	植物组织游离氨基酸总量的测定	97
实验三	谷类作物种子中赖氨酸含量的测定	101
实验四	植物组织中可溶性蛋白含量的测定	103
实验五	维生素 C 含量的测定	108
实验六	维生素 E 含量的测定	111
实验七	蔗糖酶活性的测定	113
实验八	苯丙氨酸解氨酶活性的测定	115
第七章	植物生长物质	118
实验一	植物激素提取、分离与含量测定	118
实验二	生长素类物质对根、芽生长的效应	124
第八章	植物的生长发育	127
实验一	植物组织培养	127
实验二	种子生活力的快速测定	129
实验三	花粉活力的测定	133
实验四	谷物种子萌发时淀粉酶活性的测定	136
第九章	植物逆境生理	140
实验一	植物抗逆性鉴定	140
实验二	植物组织中游离脯氨酸含量的测定	143
实验三	植物组织丙二醛含量测定	145
实验四	植物抗氧化酶活性测定	147
实验五	植物过氧化物酶同工酶谱带的鉴定	153
第十章	综合设计型实验	157
实验一	综合型实验	157
实验二	设计型实验	162

附录.....	164
【附录 1】实验报告和研究论文的写作要求	164
【附录 2】常用生物统计公式	167
【附录 3】垂直板电泳装置的安装和制胶	167
【附录 4】硫酸铵溶液饱和度计算表	170
【附录 5】常用酸碱摩尔浓度的近似配制表	171
【附录 6】植物组织培养常用培养基	172

第一章 植物的细胞生理

细胞是生物有机体结构和生命活动的基本单位,能够进行各种代谢活动,并不断地与外界环境进行物质和能量交换。高等植物的细胞主要由细胞壁、细胞膜、细胞质、细胞核和各种细胞器所构成。通过组织破碎、分级离心,可获得各种细胞器,进而进行各种生理生化研究,阐述其功能。研究细胞生理是了解植物体生命活动的重要基础。本章主要介绍叶绿体、线粒体的分离制备及活力测定方法,细胞的质壁分离与分离复原,细胞质膜微囊的分离及纯化和膜脂的提取分离及定量测定。

实验一 叶绿体的分离制备及活力测定

叶片是高等植物进行光合作用的主要器官,而叶绿体则是植物进行光合能量转化的主要细胞器。本实验学习离体叶绿体的分离制备技术,并通过希尔反应测定离体叶绿体的活力,了解在叶绿体中进行的光还原反应。

【实验前思考题】

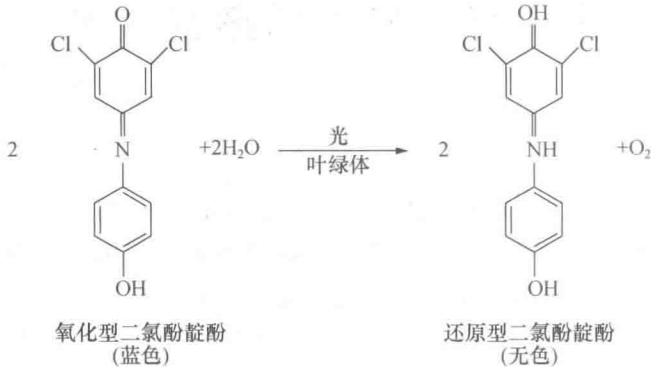
1. 叶绿体的结构与光合作用的光反应有何关系?
2. 什么是希尔反应?它的发现在光合作用研究中有何意义?

【原理】

1. 叶绿体的分离制备原理是根据不同植物材料的特点,分别选用具有合适pH、渗透势、抗酚类干扰的提取介质,采用分级离心方法将叶绿体颗粒与其他细胞内含物分开,然后在一定离心力下收集。

2. 希尔反应(Hill Reaction)是绿色植物的离体叶绿体在光下分解水,放出氧气,同时还原电子受体的反应,即光还原反应。低温条件下用等渗溶液制备的完整叶绿体悬浮于适当的反应介质中,在氧化剂如2,6-二氯酚靛酚(简称DCIP)存在的条件下,叶绿体在光照下将会分解 H_2O 放出 O_2 ,同时将氧化剂还原,其反应速

率代表希尔反应的活力。该氧化剂为蓝色,在 620 nm 处有最大吸收峰,其被还原后,颜色从蓝色变为无色,因此反应速率可根据溶液 OD_{620} 的变化进行测定,该变化在 4~5 min 内呈线性关系。其还原反应如下:



【材料、仪器与试剂】

1. 材料

新鲜菠菜叶片。

2. 仪器与用具

离心机;研钵;天平;纱布;试管;100 W 灯泡;722 型分光光度计。

3. 试剂

①提取介质:含 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖; $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl; $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl;pH 7.5。

②染料: $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,6-二氯酚靛酚(用提取介质配制)。

【方法与步骤】

1. 离体叶绿体的提取

取新鲜菠菜叶片,剪去粗大的叶脉并剪成碎块,称取 10 g 放入预冷的研钵中,加 10 mL 预冷的提取介质(可分 2 次加入)和少许石英砂,冰浴中迅速研磨成匀浆,再加 10 mL 提取介质,用 4 层纱布将匀浆过滤于离心管中, 4°C 下 700 g 离心 3 min,离心后弃沉淀,将上清液于 4°C 下 1500 g 离心 8 min,弃上清液,所得沉淀即为离体叶绿体。用提取介质将叶绿体悬浮,适当稀释后使溶液在 660 nm 处的吸光度达 1 左右,置于冰浴中备用。

2. 叶绿体光还原反应的测定

取干净刻度试管 3 支,分别编号 1、2、3,然后按表 1-1 加入试剂。2 号管加入叶绿体悬浮液后于沸水浴中煮 15 min,然后用蒸馏水补足丧失的水分。3 号管为

比色时调零用的空白对照。各试管在加染料之前保存在冰浴中。

表 1-1 光还原反应的试剂加入量及煮沸时间

管号	提取介质(mL)	叶绿体悬浮液(mL)	煮沸时间(min)	染料(mL)
1	4.5	0.5	—	5
2	4.5	0.5	15	5
3	9.5	0.5	—	—

3. 测定

向各管加入 2,6-二氯酚靛酚后立即摇匀倒入比色杯中,迅速测定 620 nm 处的吸光度值,以此代表反应时间为 0 min 时的吸光度。然后将比色杯置于 100 W 灯光下 60 cm 处照光,每隔 1 min 快速读取吸光度的变化,连续进行五六次读数,要保证每次照光时间一致。

4. 计算

以时间(min)为横坐标,以每分钟 OD_{620} 的变化量为纵坐标作图。

【结果分析】

描述曲线的变化规律,并根据光还原反应的机理给出合理的解释。

【注意事项】

每次照光后读数应快速,控制在 15 s 内完成。

【参考文献】

- [1] 高俊凤.植物生理学实验指导.北京:高等教育出版社,2006.
- [2] 张志良,瞿伟菁.植物生理学实验指导.北京:高等教育出版社,2003.
- [3] 孙群,胡景江.植物生理学研究技术.杨凌:西北农林科技大学出版社,2006.

【实验后思考题】

1. 如果用叶绿体碎片作为材料测定光还原反应,结果如何?为什么?
2. 为什么在低温条件下用等渗溶液分离制备离体叶绿体?

实验二 线粒体的分离制备及活性测定

线粒体是植物细胞进行呼吸作用的场所,是细胞进行各种生命活动所需能量的主要来源,故有细胞“动力站”之称。线粒体的提取、分离及活性测定技术是研究植物呼吸电子传递及氧化磷酸化等能量代谢过程的必要手段。本实验学习线粒体

的分离制备方法,以及反映线粒体呼吸活力的氧吸收速率,反映氧化磷酸化效率的磷氧比(P/O或ADP/O)和呼吸控制率(或称为呼吸调节比)(RCR, respiratory control ratio)的测定方法。

【实验前思考题】

1. 线粒体的结构与三羧酸循环和氧化磷酸化有何关系?
2. 三羧酸循环中有哪些呼吸控制点?

【原理】

1. 线粒体的分离制备原理

根据不同植物材料的特点,分别选用具有合适pH、渗透势、抗酚类干扰的提取介质,采用分级离心法将线粒体颗粒与其他细胞内含物分开,然后在一定的离心力下收集。植物线粒体直径一般为 $0.5\sim 1.0\ \mu\text{m}$,长 $3\ \mu\text{m}$,其沉降系数(S)为 $(1\sim 1.7)\times 10^4$,通常可用差速离心进行分离。如有需要,可进一步用密度梯度离心进行纯化。用差速离心进行分离时,其离心力(g)和离心时间因植物材料而异。一般先用低离心力($500\sim 1\ 000\ g$)短时间($5\sim 10\ \text{min}$)去除细胞碎片,然后在 $11\ 000\sim 12\ 000\ g$ 的高离心力下沉降线粒体。

2. 线粒体外膜完整度的测定原理

线粒体中的细胞色素C(Cyt C)位于内膜外侧,在有氰化物(抑制细胞色素氧化酶活性,阻止还原性的Cyt C将 e^- 交给分子氧)存在时,用琥珀酸引发电子传递后,可使Cyt C还原。当线粒体的外膜完整时,外源的Cyt C不能进入线粒体因而不被还原,相反,如果外膜破裂,外源Cyt C便可进入线粒体而被还原。还原型Cyt C在 $520\ \text{nm}$ 处有吸收峰。在没有糖醇的高渗透势测定体系中,线粒体外膜被胀破,能测得最快的Cyt C还原速率。未胀破的线粒体的Cyt C还原速率与胀破线粒体的Cyt C还原速率之比,称为线粒体膜的破碎度;线粒体完整度 $=1 - \text{破碎度}$ 。

3. 氧电极测定线粒体活性的原理

反映离体线粒体活力的氧吸收速率、磷氧比和呼吸控制率均可用氧电极测定反应液中溶解氧的变化来计算。氧电极(oxygen electrode)是实验室中一种常用的测氧设备。它具有灵敏度高,操作简便而快速,可以连续测定液相中溶解氧含量的变化,非常适合于叶绿体活性和线粒体活性以及一些酶反应中氧含量变化的测定。原理见第五章实验一。

【材料、仪器与试剂】

1. 材料

在理论上所有高等植物的组织都可用来制备线粒体,但从组织坚实、细胞壁老

化及含叶绿体的材料中制备线粒体的难度很大,最好采用新鲜、生长旺盛的黄化幼苗和贮藏组织(块根、块茎),如暗中萌发的绿豆芽,新近收获的马铃薯块茎、花椰菜等。

2. 仪器与用具

高速冷冻离心机;组织捣碎机;玻璃漏斗、烧杯、纱布;氧电极溶氧测定系统(以国产CY-II型测氧仪为主机,配以反应杯、磁力搅拌器、超级恒温水浴、自动记录仪、光源);注射器、微量注射器;分光光度计;恒温水浴锅;移液管等。

3. 试剂

①线粒体提取和洗涤介质:含 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛血清蛋白(BSA)、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.2。

②线粒体悬浮液:不加 BSA 的线粒体提取和洗涤介质。

③线粒体呼吸反应介质:含 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.2。

④线粒体呼吸反应底物: $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 琥珀酸(钠)、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ α -酮戊二酸(钠)、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苹果酸(钠)、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ADP(钠)。

以上试剂需要预冷保存。

⑤Folin-酚试剂:配制方法见第六章实验四。

⑥1%詹纳斯绿 B(Janus green B):称取 1 g 詹纳斯绿 B 溶于 0.9% 灭菌的生理盐水(0.9% 氯化钠)中。

⑦线粒体外膜的完整度测定系统溶液:A 液含 $0.175 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.2)、 $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cyt C、 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCN、 $255 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP;B 液为不含甘露醇和蔗糖的 A 液。

【方法与步骤】

1. 线粒体的制备(以马铃薯块茎为例)

将贮存于 10°C 的新鲜马铃薯块茎削皮后,放入 4°C 冰箱至少预冷 1 h。将 100 g 预冷组织切成薄片,与 200 mL 预冷介质一起放入经过预冷的组织捣碎机中捣碎 20 s,匀浆用纱布过滤,滤液经 $500 \sim 1000 \text{ g}$ 离心 3 min,去沉淀。上清液经 $11000 \sim 12000 \text{ g}$ 离心 10 min。去上清液。沉淀用洗涤介质洗涤 1 次,并再用 $15000 \sim 20000 \text{ g}$ 离心 8 min,去上清液。所得沉淀小心悬浮在 2 mL 悬浮液中,避免产生气泡,冰浴保存。整个制备过程在低温下进行,操作要迅速,在 1 h 内完成。

2. 线粒体分离效果的初步检查

制备的线粒体可以用光学显微镜粗略地观察。将悬浮液用詹纳斯绿 B 染色

后观察,线粒体染成绿色。取线粒体悬浮液 1 滴涂片,滴加 1% 詹纳斯绿 B 液染 20 min, 覆上盖玻片,镜检。线粒体呈蓝绿色,为小棒状或哑铃状。

3. 线粒体悬浮液蛋白质含量的测定

取 0.5 mL 线粒体制备液用 Folin-酚试剂法(Lowry 法)测定蛋白质含量,方法见第六章实验四。

4. 线粒体外膜完整度的测定

(1) 离体线粒体 Cyt C 还原速率的测定

取 2 mL 线粒体外膜完整度测定系统的 A 液,加入 0.5 mL 含蛋白质 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的线粒体悬浮液,反应体系各种物质的最终含量为 $0.35 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖和甘露醇、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.2)、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cyt C、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCN、 $170 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 琥珀酸,反应体系总体积为 3 mL。反应底物琥珀酸最后加入,以其引发反应,用分光光度计在 520 nm 处测定由细胞色素还原引起的吸光度变化,测定 2~3 min 的变化值。

(2) 胀破的离体线粒体 Cyt C 还原速率的测定

取 2 mL 线粒体外膜的完整度测定系统 B 液,加入 0.5 mL 含蛋白质 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线粒体悬浮液,反应体系各种物质的最终含量为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.2)、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cyt C、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCN、 $170 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 琥珀酸,反应体系总体积为 3 mL。吸光度的测定同上。

5. 测氧仪的调试及灵敏度标定

以容积为 2 mL 的反应杯为例。

(1) 测氧仪的检查

开启电源,将波段开关拨至“电池电压”挡,检查电池电压是否正常(满量程为 10 V),如果电压低于 7 V,则须更换电池,安装时须注意正、负极;将波段开关拨至“极化电压”挡,检查加于电极两端的电压是否为 0.7 V,偏高或偏低时,可调节“极化微调”使电位器恰好为 0.7 V;将波段开关拨至“零位调节”挡,电表指针应在“0”点,否则,可调节“零位”电位器。

(2) 电极的安装

电极包括下列部件:氧电极、电极套、电极套螺塞、聚乙烯薄膜、“O”形橡皮圈。另外还有氯化钾溶液,薄膜安装器。

从电极套取出电极,将薄膜小圆片放在电极套的顶端。把薄膜安装器的凹端压在电极套的顶端,再将“O”形圈推入套端的凹槽内;轻拉膜,使薄膜与电极套贴合,但不能拉得太紧而使薄膜变形。将 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾溶液滴入电极套内,慢慢地向下推,直到电极头与薄膜接触。将电极套螺塞拧紧,使电极凸出电极套

0.5 mm 左右。擦去电极套外的氯化钾液滴。

(3) 灵敏度的标定及结果计算

用在一定温度和大气压下被空气饱和的水中氧含量进行标定。先将恒温水浴调至 25℃。在反应杯中加满蒸馏水,杯内放一细玻管封住的小铁棒,向反应杯的双层壁间通入 30℃(或实验要求的温度)的温水,开启电磁搅拌器,搅拌 5~10 min,使水中溶解氧与大气平衡,将电极插入反应杯(注意电极附近不得有气泡)。将测氧仪灵敏度粗调旋钮拨至适当位置,再调灵敏度旋钮,使记录笔达满度,灵敏度旋钮不要再用。

然后向反应杯注入 0.1 mL 饱和亚硫酸钠溶液,除尽水中之氧,记录笔退回至“0”刻度附近。根据当时的水温查出溶氧量以及记录笔横向移动的格数,算出每小格代表的氧量。例如,反应体系温度为 25℃,由表上查得饱和溶氧量为 $0.253 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$,反应体系体积为 2 mL,若此时记录笔在 100 格处,注入亚硫酸钠后退回了 80 格,则每小格代表的氧量为 $0.253 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \times 2 \text{ mL} / 80 \text{ 格} = 0.00633 \mu\text{mol} \cdot \text{格}^{-1}$ 。在正式测定时,若加入 3 mL 反应液,经温度平衡后,记录仪记录笔在第 92 格处,经 5 min 反应后,记录笔移到第 66 格,则溶液中含氧量的降低值为: $(92-66) \times 0.00633 = 0.165 \mu\text{mol}$,该值为 5 min 内的实际耗氧量。

表 1-2 不同温度下水中氧的饱和溶解度

温度(℃)	$\text{O}_2 (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\text{O}_2 (\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1})$
0	14.16	0.442
5	12.37	0.386
10	10.92	0.341
15	9.76	0.305
20	8.84	0.276
25	8.11	0.253
30	7.52	0.230
35	7.02	0.219

6. 利用测氧仪进行线粒体氧吸收速率、呼吸控制率及 ADP/O 的测定

①灵敏度标定后将反应杯洗净,用注射器将反应液(1.8 mL)注入反应室,启动电磁搅拌器,待温度平衡后开启记录仪。操纵控制器位移旋钮将记录笔调至右端。

②然后向反应杯中注入 0.2 mL 线粒体制备液(不能出现气泡),此时记录仪上出现斜率较低的直线,这是线粒体的内源呼吸,又称状态 I。