

SHUCAI
ZAIPEIXUE
SHIYAN
ZHIDAO

普通高等教育“十二五”规划教材



国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材

蔬菜栽培学实验指导

蒋欣梅 张清友 主 编

刘在民 吴凤芝 副主编



化学工业出版社

SHUCAI
ZAIPEIXUE
SHIYAN
ZHIDAO



普通高等教育“十二五”规划教材

国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材

蔬菜栽培学实验指导

蒋欣梅	张清友	主 编
刘在民	吴凤芝	副主编
卢志权	盛云燕	参 编
于锡宏	主 审	



化学工业出版社

· 北 京 ·

《蔬菜栽培学》是各大专校园艺专业的必修课程,同时也是其他相关专业的必修或选修课程。《蔬菜栽培学》分为总论和各论两大部分,总论讲授基础理论知识,各论讲授各类蔬菜的特性及具体的栽培技术。为了使学生更好地掌握课堂教授的理论知识、提高动手能力,一些院校在课程的设置上安排了蔬菜栽培学的课内实验——蔬菜栽培学实验,或是独立的蔬菜栽培学实验课程。为此,编者针对《蔬菜栽培学》的内容,编写了这本《蔬菜栽培学实验指导》。

本教材按照“蔬菜的生长发育—蔬菜产量的形成—蔬菜的逆境生理—蔬菜的栽培技术”的体系分成4章,共包括32个实验。

本书主要作为高等农业院校本科生教材,也可供综合性大学以及师范院校本科生使用,还可作为从事相关教学和研究人员参考书。读者也可根据课程学习、毕业论文要求和实验条件选择使用。

图书在版编目(CIP)数据

蔬菜栽培学实验指导/蒋欣梅,张清友主编. —北京:
化学工业出版社,2012.6

普通高等教育“十二五”规划教材. 国家级实验教学
示范中心植物学科系列实验教材

ISBN 978-7-122-13952-8

I. 蔬… II. ①蒋…②张… III. 蔬菜园艺-实验-高等
学校-教学参考资料 IV. S63-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第066368号

责任编辑:赵玉清
责任校对:吴静

文字编辑:张春娥
装帧设计:史利平

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)
印装:北京云浩印刷有限责任公司

710mm×1000mm 1/16 印张9 字数188千字 2012年8月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:18.00元

版权所有 违者必究

国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材 编写委员会

主 任：张宪省（山东农业大学）
 吴伯志（云南农业大学）
副主任：李 滨（山东农业大学）
 崔大方（华南农业大学）
 赵玉清（化学工业出版社）

委 员：（按姓氏笔画排列）
 杨学举（河北农业大学）
 陈建斌（云南农业大学）
 张金文（甘肃农业大学）
 李 滨（山东农业大学）
 李保同（江西农业大学）
 吴伯志（云南农业大学）
 肖建富（浙江大学）
 张宪省（山东农业大学）
 邹德堂（东北农业大学）
 周 琴（南京农业大学）
 项文化（中南林业科技大学）
 赵玉清（化学工业出版社）
 彭方仁（南京林业大学）
 崔大方（华南农业大学）
 蔺万煌（湖南农业大学）
 燕 玲（内蒙古农业大学）

前言

Preface

近年来,先进实验仪器在不断更新,实验方法也在不断改革,为了使《蔬菜栽培学》课程能不断完善和提高,作者编写了这部《蔬菜栽培学实验指导》,以满足教改的需要。针对“蔬菜的生长发育—蔬菜产量的形成—蔬菜的逆境生理—蔬菜的栽培技术”的体系,编写了这本实验指导,既可作为高等农业院校本科生教材,也可供综合性大学以及师范院校本科生使用,还可作为从事相关教学和研究人员的参考书。读者也可根据课程学习、毕业论文要求和实验条件选择使用。

本实验指导共分4章,第一章蔬菜的生长发育、第二章蔬菜产量的形成由东北农业大学蒋欣梅编写,第三章蔬菜的逆境生理由黑龙江农业职业技术学院张清友编写,第四章蔬菜的栽培技术由东北农业大学蒋欣梅、吴凤芝,黑龙江八一农垦大学盛云燕编写,附录由东北农业大学刘在民、吉林省辽源市农科院卢志权编写。全书由蒋欣梅负责修改校正,由东北农业大学于锡宏教授主审。

在本书的编写过程中,编者付出了很多心血,但由于教材编写是一项较大的工程,在浩如烟海的资料中很难收集全面,难免挂一漏万,同时,鉴于作者经验和水平所限,书中缺点或不足在所难免,敬请使用本教材的学生、教师提出宝贵意见。

编者

2012年2月24日

目录

Contents

第一章 蔬菜的生长发育	1
实验 1-1 种子生活力的快速测定	2
实验 1-2 春化蛋白的诱导形成与检测	7
实验 1-3 豆类种子萌发时氨基酸含量的测定	10
实验 1-4 油类种子萌发过程中脂肪酶活性的测定	12
实验 1-5 果菜类蔬菜花芽分化的观察	15
实验 1-6 蔬菜衰老指标的测定	18
实验 1-7 蔬菜体内内源激素的提取与测定	26
第二章 蔬菜产量的形成	29
实验 2-1 蔬菜叶面积的测定	31
实验 2-2 蔬菜体内叶绿体色素的提取、分离及理化性质的观察	34
实验 2-3 蔬菜体内叶绿素含量的测定	38
实验 2-4 蔬菜光合速率的测定	45
实验 2-5 光补偿点和光饱和点的测定	50
实验 2-6 CO_2 饱和点和补偿点的测定	52
第三章 蔬菜的逆境生理	55
实验 3-1 高温和低温对细胞膜透性的影响	56
实验 3-2 渗透胁迫对游离脯氨酸含量的影响	58
实验 3-3 冷胁迫对质膜 H^+ -ATPase 活性的影响	61
实验 3-4 干旱胁迫对脂氧合酶活性的影响	64
实验 3-5 盐胁迫对蛋白组分的影响	66
实验 3-6 遮阴对抗坏血酸含量的影响	69
实验 3-7 高温逆境对 O_2^- 产生速率的影响	73
第四章 蔬菜的栽培技术	77
实验 4-1 蔬菜播种前种子的处理技术	78
实验 4-2 床土配制和播种技术	83
实验 4-3 蔬菜的嫁接育苗技术	87
实验 4-4 电热温床的设计与电热线的铺设技术	91
实验 4-5 蔬菜的移苗与苗期管理技术	95
实验 4-6 土壤耕作技术	99
实验 4-7 施肥技术	103

实验 4-8 蔬菜的定植技术	108
实验 4-9 蔬菜的植株调整技术	110
实验 4-10 植物生长调节剂在蔬菜生产中的应用技术	115
实验 4-11 蔬菜轮作设计	120
实验 4-12 蔬菜混种、间作、套作、复种设计	123
附录	126
一、试剂的配制	126
二、易变质及需要特殊方法保存的试剂	128
三、常用缓冲液的配制	128
四、酸碱指示剂	131
五、离心机转速与相对离心力 (g) 的换算	132
六、仪器的保养	132
七、蔬菜种子的重量、每克粒数及需种数量	132
八、蔬菜种子的寿命和使用年限	133
九、常用化肥种类及使用方法	134
十、蔬菜各种营养障碍的症状、原因及防治措施	135
参考文献	138

第一章

蔬菜的生长发育

绪 论

蔬菜植物的种子发芽、形成幼苗、开花结实以及形成产品器官，都要经过一系列的生长发育过程。生长是植物直接产生与其相似器官的现象，生长的结果引起体积或重量的增加。对于一个植物个体，都有一个生长的速度问题，如茎的伸长、叶面积的扩大、果实和块茎体积的增加等。生长的过程表现为“S形”曲线，即初期生长较慢，中期生长逐渐加快，当速度达到高峰以后，又逐渐缓慢下来，到最后生长停止。发育是植物通过一系列的质变以后，产生与其相似个体的现象。发育的结果，产生了新的器官或个体，如花、果实、种子。关于植物发育的理论，有各种不同的学说，比较有代表性的有以下4个：（1）开花素学说 德国植物生理学者沙克斯（1882）提出，认为植物的成花，可能是受一种激素刺激，这种激素就是开花素，它控制着植物的开花。但是具体的开花素迄今尚未分离出来。（2）碳氮比率（C/N）学说 克罗斯和克莱比尔（1918）提出了，认为植物之所以从营养生长过渡到生殖生长，是受植物体中碳水化合物与氮化化合物的比例所控制。C/N比率小时，植株趋向于营养生长；C/N比率大时，植株趋向于生殖生长。（3）光周期学说 加纳和阿拉德（1920）以烟草为材料发现了“光周期”现象。长日照条件下，烟草不能开花结实，而在短日照条件下即可正常开花结实。由此而建立的光周期学说使植物发育理论的研究又有了新的进展，明确了植物的开花，不仅受温度的影响，同时也受日照长短的影响。（4）阶段发育理论 阶段发育学说是李森科（1935）在前人工作的基础上提出的。其主要内容是：对一二年生植物的整个发育过程，具有不同的阶段，每一阶段对环境条件都有不同的要求，而且前一个阶段没有通过，后一阶段也不会完成。目前已明确了两个阶段，即春化阶段和光照阶段。

通常发育是植物有规律地按顺序向前发展，分段完成其生活周期。本章主要介绍种子生活力的快速测定、春化蛋白的诱导形成与检测、豆类种子萌发时氨基酸含量的变化、油类种子萌发过程中脂肪酶活性的变化、果菜类蔬菜花芽分化的观察、蔬菜衰老指标的测定以及蔬菜体内内源激素的提取与测定等研究方法。

实验 1-1

种子生活力的快速测定

一、实验目的要求

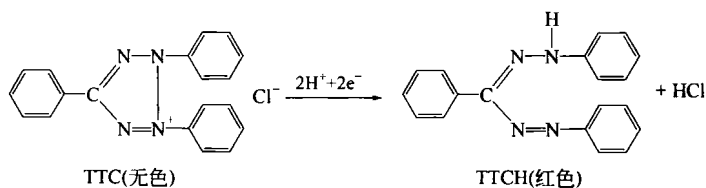
种子生命力是指种子生命的有无，即是否存活。种子生活力是指种子发芽的潜在能力或种胚具有的生命力。如何快速而准确地测定并能与发芽率相一致，以生活力标志发芽潜力的指标向来为人们所重视。快速测定生活力不仅对那些具有休眠特性的种子特别需要，对一般作物种子的大批量检验也同样有其重要性。在播种前调运、交换种子过程中，或对种子基因库的种质监测过程中，以及一系列种子试验过程中，都需要及时了解种子发芽力，而常规发芽法远不能满足实际需要。以下通过实验掌握几种常用的快速测定种子生活力的方法。

二、实验测定方法

（一）TTC 染色法（氯化三苯基四氮唑法，四唑法）

1. 实验原理

2,3,5-氯化三苯基四氮唑是一种能产生红色沉淀物的四唑氯化物，又称红四唑，一般简称 TTC 或 T₂。其氧化态（TTC）无色并溶于水，还原态（TTCH）是不溶于水的红色物质，它在空气中不会自动氧化，相当稳定。可用 TTC 作为脱氢酶的氢受体，其反应如下：



具有生命力的种子，浸于 TTC 溶液中时，由于呼吸作用产生的氢能使 TTC 还原成 TTCH，因此胚部便染成红色；凡无生命力的种子不能进行呼吸代谢，TTC 也就不能被还原，因此胚部不着色。所以，根据种子胚部能否染成红色来判

断种子有无生命力。

2. 实验仪器设备

(1) 仪器 恒温箱；培养皿或表面皿；烧杯；小镊子；单面刀片。

(2) 药品 0.5% TTC 溶液 (0.5g TTC 放在烧杯中加少量 95% 酒精使其溶解，再用蒸馏水稀释至 100ml)。溶液避光保存。最好随用随配，若发红时不能再用。

(3) 材料 不同年限的黄瓜种子、番茄种子、甘蓝种子、茄子种子、菜豆种子等。

3. 实验内容与步骤

(1) 浸种 将待测种子用温水 (30~35℃) 浸泡 2~6h，以增强种胚的呼吸强度，使显色迅速。

(2) 染色 取吸胀的种子 50 粒，豆类种子要去皮，然后用刀片沿种子胚的中心线纵切为两半，取其中一半置于培养皿中，加入 0.5% TTC 溶液，以浸没种子为度，然后置于 25~35℃ 恒温箱中 0.5~1h。可用沸水杀死种子作对照。

(3) 鉴定 倾出溶液，用自来水反复冲洗种子，然后逐个观察胚部着色情况。凡胚被染成红色的是有生命力的种子，种胚完全不染色或染成极浅颜色的种子为无生命力的种子。

另外，在以上两种类型中间有许多过渡类型，判别的要点是观察胚根、胚芽、盾片中部等关键部位是否被染成红色。凡这几部分被染成红色就是有生命力的种子；反之，则为无生命力的种子。

(4) 计算活种子的百分率

$$\text{活种子的百分率} = \frac{\text{胚部染成红色的种子数(粒)}}{\text{供试种子数(粒)}} \times 100\% \quad (1-1)$$

(二) 红墨水染色法

1. 实验原理

根据活细胞的原生质膜具有选择吸收能力，不能透过某些染料的原理，用这类染料不能将活胚染色，而死种胚细胞的原生质膜是全透性膜，于是染料便能透入细胞而将死胚染色，因此，根据种胚的染色情况，就可测定种子的生命力。

2. 实验仪器设备

(1) 仪器 培养皿或表面皿；单面刀片；小镊子；烧杯。

(2) 药品 市售红墨水稀释 20 倍作为染色剂。

(3) 材料 不同年限的黄瓜种子、番茄种子、甘蓝种子、茄子种子、菜豆种子等。

3. 实验内容与步骤

(1) 浸种 将待测种子用温水 (30~35℃) 浸泡 2~6h，以增强种胚的呼吸强度，使显色迅速。

(2) 染色 取已吸胀的种子 50 粒, 沿种胚中心线纵切为两半, 将一半置于培养皿中, 加入 5% 红墨水 (以淹没种子为度), 染色 10min (温度高时时间可短些)。

染色后, 倒去红墨水液, 用水冲洗种子多次, 至冲洗液无色为止。检查种子有无生命力。凡种胚不着色或着色很浅的为有生命力的种子, 凡种胚与胚乳着色程度相同的为无生命力的种子。可用沸水杀死的种子作对照。

(3) 计算活种子的百分率

$$\text{活种子的百分率} = \frac{\text{胚部染成红色的种子数(粒)}}{\text{供试种子数(粒)}} \times 100\% \quad (1-2)$$

(三) 溴麝香草酚蓝法 (BTB 法)

1. 实验原理

凡活细胞必有呼吸作用, 吸收空气中的 O_2 , 放出 CO_2 。 CO_2 溶于水, 解离成为 H^+ 和 HCO_3^- , 使得种胚周围环境的酸度增加, 可用溴麝香草酚蓝 (BTB) 来测定酸度的改变。BTB 的变色范围为 pH6.0~7.6, 酸性呈黄色, 碱性呈蓝色, 中间经过绿色 (变色点为 pH7.1)。色泽差异显著, 易于观察。

2. 实验仪器设备

(1) 仪器 恒温箱; 天平; 培养皿; 烧杯; 镊子; 漏斗; 滤纸; 电炉。

(2) 药品 ① 0.1% BTB 溶液 [称取 BTB 0.1g, 溶解于煮沸过的自来水中 (配制指示剂的水应为微碱性, 使溶液呈蓝色或蓝绿色, 蒸馏水为微酸性不宜用), 定容至 100mL, 然后用滤纸滤去残渣。滤液呈黄色, 可加数滴稀氨水, 使之变为蓝色或蓝绿色。此液贮于棕色瓶中可长期保存]; ② 1% BTB 琼脂凝胶 (取 0.1% BTB 溶液 100mL 于烧杯中, 将 1g 琼脂剪碎后加入, 用小火加热并不断搅拌, 待琼脂溶解后, 趁热倒在数个干洁的培养皿中, 使其成一层均匀薄层, 冷却后备用)。

(3) 材料 不同年限的黄瓜种子、番茄种子、甘蓝种子、茄子种子、菜豆种子等。

3. 实验内容与步骤

(1) 浸种 将待测种子用温水 ($30\sim 35^\circ C$) 浸泡 2~6h, 以增强种胚的呼吸强度, 使显色迅速。

(2) 显色 取吸胀种子 50 粒, 整齐地埋于准备好的琼脂凝胶培养皿中, 种子平放, 间隔距离至少 1cm。然后把培养皿置于 $30\sim 35^\circ C$ 条件下培养 2~4h, 在蓝色背景下观察, 如种胚附近呈现较深黄色晕圈, 则是有生命力的种子, 否则为无生命力的种子。用沸水杀死的种子作对照。

(3) 计算活种子百分率

$$\text{活种子的百分率} = \frac{\text{深黄色晕圈的种子数(粒)}}{\text{供试种子数(粒)}} \times 100\% \quad (1-3)$$

(四) 荧光法

1. 实验原理

植物种子中经常存在着许多能够在紫外线照射下产生荧光的物质, 如某些黄酮

类、香豆素类、酚类物质等，在种子衰老过程中这些荧光物质的结构和成分往往发生变化，因而荧光的颜色也相应改变；有些种子在衰老死亡时荧光物质的性质虽未改变，但由于生活力衰退或已死亡的细胞原生质透性加大，浸种时种子中的荧光物质很容易外渗。前一种情况可以用直接观察种胚荧光的方法确定种子生活力，后一种情况则可通过观察荧光物质渗出的多少来确定生活力。

2. 实验仪器设备

(1) 仪器 紫外线分析灯；不产生荧光的白纸；单面刀片；镊子；培养皿。

(2) 材料 松柏类树木、蔷薇科果树种子；小麦、玉米；甘蓝、白菜、茄子等种子。

3. 实验内容与步骤

(1) 直接观察法 此法应用于禾谷类、松柏类以及若干蔷薇科植物种子效果较好，但科间的适用度上差异很大，最常用于燕麦、黑麦种子。

用刀片沿胚的中心线将种子纵切成两半，取一半放在不产生荧光的白纸上，使种子的切面朝上，放在紫外线分析灯下照射并进行观察、记载。有生活力的种子产生明亮的蓝色、蓝紫色、紫色或蓝绿色的荧光，死种子多半是黄色、褐色以至暗淡无光，并带有多数斑点。

(2) 纸上荧光团法 把浸泡过的完整无损的种子，按一定距离放在湿滤纸上，滤纸上的水分不可过多，以不足使种子浮动为度，防止荧光物质流散。加盖保持在恒温条件下 12h，开盖，使滤纸（或连种子一起）风干，放在紫外分析灯下照射，可以确定死种子周围有一圈明亮的荧光团（图 1-1），根据荧光团数目就可以确定死种子数量，每次至少测定 100 粒种子，并估计发芽率，与普通发芽试验法测的实际发芽率相对照，这个方法应用于白菜、萝卜等十字花科植物种子上，效果很好。

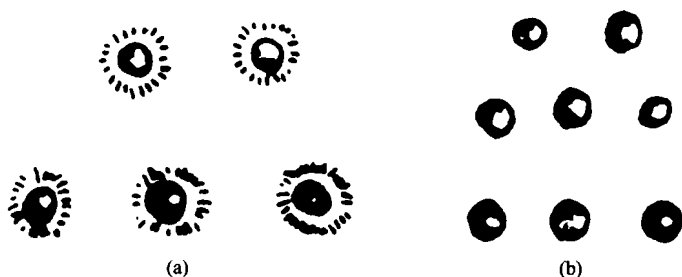


图 1-1 纸上荧光圈法测定白菜种子生活力

(a) 失去活力的白菜种子在紫外线下产生明亮的蓝紫色荧光团；

(b) 具有生活力的白菜种子在紫外线下不产生荧光团

(3) 外渗荧光物质定量测定 以白菜种子为例，取样 100 粒称量后用蒸馏水冲洗，加 40mL 蒸馏水浸泡 6h，然后，取溶液进行荧光分光光度法测定，激发波长为 270nm，反射波长的高峰点在 340nm。可按波峰高度和面积来定量，其值与种子生活力成反相关。

三、注意事项

对于 TTC 染色法须注意以下 4 点：

1. 染色结束后要立即进行鉴定，因放久会退色。如测定种子数量较多，短时间内观察不完，应将已染色的样品放在湿润处，勿使干燥以免影响观察判断。
2. 小粒种子经染色后，可加几滴乳酸苯酚溶液（按乳酸、苯酚、甘油、水比例为 1 : 1 : 2 : 1 配成），10 ~ 30min 后，再进行鉴定，这样容易看清胚的染色情况。
3. 用于不同种子生命力的测定，其试剂浓度、染色时间、浸种时间应不同。
4. 应用 TTC 法的结果，可靠度取决于对染色图形的经验，不同种类有不同反应类型，要判断正确必须遵循模式图谱比较。

四、实验报告

计算不同方法下的不同种子生活力，并对结果进行分析。

实验 1-2

春化蛋白的诱导形成与检测

一、实验目的要求

检测春化处理生成的特有蛋白。

二、实验原理

农作物从种子萌发到种子成熟不仅在形态上发生一系列的变化，在生理上亦不断改变着其对环境条件的反应。控制作物的生育期，以便获得更好的产量是作物生产中的重大课题之一。对生育期具有决定作用的是成花的过程，影响植物开花的因素很多，如营养体的大小、土壤水肥条件等，但最主要的条件是日照的长短及温度。低温促进一些植物的开花称之为植物的春化作用。春化作用是一种受遗传控制的生理过程，在此过程中会发生核酸和蛋白质等的变化，应用 SDS 凝胶电泳即可分析出白菜春化和脱春化或抑制剂处理后细胞内蛋白质组分的变化，可检测与春化作用相关的特异蛋白质。

三、实验仪器设备

(1) 仪器 恒温培养箱，冰箱，垂直平板电泳仪，烧杯，培养皿（直径 9cm 和 15cm），离心机，天平，研钵，微量注射器。

(2) 药品 ①代谢抑制剂 DNP [或 NaN_3 （有毒）或 KCN（有毒），1mmol/L]，冷丙酮与 5%三氯乙酸（1：1）混合液，蛋白质提取缓冲液（含 50mmol/L Tris-HCl，pH8.6；2%巯基乙醇，2%SDS），丙烯酰胺（Acr）：五甲基双丙烯酰胺（Bis）（29.2：0.8）[称取 29.2g Acr（有毒）与 0.8g Bis 溶于 100mL 蒸馏水中，过滤后备用]；②1.5mol/L Tris-HCl（pH8.8）（18.15g Tris 溶于 50mL 蒸馏水中，浓 HCl 调 pH 至 8.8，加水定容至 100mL）；③0.5mol/L Tris-HCl（pH6.8）（6.05g Tris 溶于 50mL 蒸馏水中，浓 HCl 调 pH 至 6.8，加水定容至 100mL）；④10%SDS（1g SDS 溶于 10mL 蒸馏水中）；⑤电极缓冲液（3g Tris、14.4g 甘氨酸、1g SDS 溶于 800mL 蒸馏水中，用 HCl 调 pH 至 8.3，加水定容至

1000mL); ⑥考马斯亮蓝染色液 (0.5g 考马斯亮蓝 R-250 溶于 90mL 甲醇中, 再加入 20mL 冰醋酸和 90mL 水, 混匀); ⑦脱色液 (37.5mL 冰醋酸、25mL 甲醇, 加水定容至 500mL); ⑧标准蛋白 (小牛血清作为标准蛋白); ⑨0.01% 溴酚蓝溶液 (溴酚蓝 10mg 溶于 100mL 蒸馏水中)。

(3) 材料 白菜种子。

四、实验内容与步骤

1. 春化及脱春化处理

白菜种子在室温条件下浸种 2h, 置于培养皿中, 放在 20℃ 恒温培养箱中催芽 12~24h, 当种子开始萌动时进行处理。即: 取已萌发种子的 1/3 放在含抑制剂 DNP (或 NaN_3 或 KCN) 的溶液中浸泡 5h (12~14℃) 后, 用无菌水冲洗干净, 然后置于 2~4℃ 冰箱中培养 25d, 进行春化处理; 将另外 2/3 萌发的种子直接置于 2~4℃ 冰箱中培养 25d, 进行春化处理。

春化处理 25d 后, 将未经抑制剂处理的春化种子的一半立即置于 35℃ 培养箱中培养 5d, 进行脱春化处理。

2. 蛋白质提取

剥取未经抑制剂处理的春化种子幼芽、抑制剂处理后的春化种子幼芽和脱春化处理的种子幼芽各 10g, 分别加入 25mL 蛋白质提取缓冲液, 在预冷的匀浆器中充分匀浆, 4000r/min 冷冻离心 15min, 收集上清液。沉淀再用上述提取缓冲液洗提 2 次, 合并 3 次上清液。用冷丙酮与 5% 三氯乙酸 (1:1) 混合液沉淀蛋白质, 于 4℃ 下沉淀过夜, 4000r/min 冷冻离心 15min, 取沉淀, 加入适量的上述蛋白质提取液溶解蛋白质, 置于 -20℃ 下保存备用。

3. 电泳

(1) 装电泳槽 装好垂直板电泳槽, 用 1.5% 热琼脂封好缝隙。

(2) 制胶板 分离胶和浓缩胶的组成如表 1-1 所示。按表 1-1 配方比例混合分离胶中除过硫酸铵和 TEMED 以外的各种贮备液, 混匀后用真空泵抽去抑制聚合的 O_2 , 最后加入催化剂过硫酸铵和 TEMED。混匀后立即将分离胶沿电泳槽的一块玻璃板内壁缓缓注入玻璃槽中, 注胶过程中需防止气泡产生, 胶液加到离玻璃板顶部约 3cm 处, 将电泳槽垂直放置, 立即用注射器小心注入蒸馏水, 使胶表面覆盖 3~4mm 水层, 静放 1h 聚合。然后去水层、吸干。用同样方法配制浓缩胶, 在加入过硫酸铵和 TEMED 后立即将胶液注入上述制备好的分离胶上, 胶液加至胶室的顶部, 插入梳子, 静放聚合。胶聚合后, 小心取出梳子, 向样品槽内加入电极缓冲液。

(3) 加样与电泳 用微量注射器分别抽取未经抑制剂处理的春化种子蛋白样品、抑制剂处理后的春化种子蛋白样品、脱春化处理种子蛋白样品, 注入样品槽中, 取样蛋白量一般为 50μg 左右, 边缘的样品槽中加标准蛋白。加样后向两个电极槽内注入电极缓冲液, 上槽缓冲液中加入 1mL 0.01% 溴酚蓝溶液作为指示染料。

表 1-1 制备凝胶的组成和配比

贮备液	12%分离胶	5%浓缩胶
Acr : Bis(29.2 : 0.8)	6mL	2.01mL
1.5mol/LTris-HCl,pH8.8	3.75mL	—
0.5mol/LTris-HCl,pH6.8	—	3.0mL
重蒸水	5.25mL	6.9mL
10%SDS	0.015mL	0.012mL
TEMED	7.5 μ L	15 μ L
10%过硫酸铵	75 μ L	90 μ L
总体积	15mL	12mL

注：Acr : Bis (29.2 : 0.8) ——也称母胶，即丙烯酰胺 (Acr) 29.2g、亚甲基双丙烯酰胺 (Bis) 0.8g 溶于 100mL 蒸馏水中，过滤后备用。

接通电源后，电泳开始，电流控制在 10~15mA，当样品进入分离胶后，电流可增至 20mA，电压一般在 100V 左右。此后，维持恒流不变，当指示染料离胶底约 1cm 处即停止电泳。

(4) 染色 将胶取下，平放在直径 15cm 的大培养皿中，用水漂洗后，加入考马斯亮蓝染色液，室温下染色 1h。

(5) 脱色 倒去染色液，水洗 1~2 次后加入脱色液，放于 25℃ 恒温水浴振荡器上脱色，其间不断更换脱色液，直到背景处清晰为止。

五、注意事项

1. 可同时用几个蛋白量进行点样，以增加成功率。
2. 存在于春化种子中的特有蛋白质，称为春化蛋白。当春化作用进程被抑制或被逆转时，就不会产生这种蛋白质。

六、实验报告

根据 SDS-PAGE 结果，比较三种处理下蛋白质的条带与分子量，并分析春化作用机理。

实验 1-3

豆类种子萌发时氨基酸含量的测定

一、实验目的要求

了解种子萌发时蛋白质分解成氨基酸。

二、实验原理

豆类种子含有丰富的蛋白质，萌发时在蛋白水解酶作用下，可水解成氨基酸，生成的氨基酸可与茚三酮作用生成紫红色化合物，可用比色法进行比色。

三、实验仪器设备

(1) 仪器 72 型分光光度计，水浴锅，天平，研钵，大试管，25mL 容量瓶。

(2) 药品 10%醋酸，95%乙醇，0.1%抗坏血酸，100 μ g/mL 亮氨酸 (10mg 亮氨酸溶于 100mL 95%乙醇中)。

(3) 材料 风干的菜豆种子。

四、实验内容与步骤

1. 先将风干的菜豆种子磨粉备用。另取菜豆种子先行吸胀，然后埋于湿沙中，待胚根长达 2~4cm 左右即可用于试验。

2. 取菜豆粉 0.1g 于大试管中，加 95%乙醇 20mL，加盖。另取已发芽的菜豆 1g 于研钵中，加少许石英砂和 5mL 95%乙醇，研成匀浆，然后倒入另一大试管中，取 95%乙醇 15mL 洗研钵，洗液并入大试管中，加盖。将两试管置于 70℃ 水浴锅中保温 30min，最后定容至 25mL。

3. 保温结束，取出大试管静置冷却。将上层清液用滤纸过滤，滤液即可用于测定。

4. 另取菜豆粉和发芽菜豆分别于 105℃ 烘箱中烘干，以测定含水量。

5. 分别吸取滤液 1mL，各加 3mL 茚三酮试剂，及 0.1mL 抗坏血酸，于沸水