



面向 21 世纪课程教材
Textbook Series for 21st Century

植物生理生化 实验原理和技术

李合生 主编

孙 群 赵世杰 章文华 副主编



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

CHINA

面向 21 世纪课程
Textbook Series for 21st Century

2000
Q945-33
5
2

植物生理生化 实验原理和技术

李合生 主编

孙 群 赵世杰 章文华 副主编



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

内 容 简 介

本书全面地介绍了植物生理生化实验原理及其技术。全书分为两篇。第一篇为实验原理,着重介绍了植物生理生化实验技术的一般原理和离心技术、层析技术、电泳技术、红外线CO₂气体分析技术、光学分析技术、气体测压技术、电化学分析技术、免疫化学技术的基本原理。第二篇为实验技术部分,共选编了55个实验项目,内容涉及植物的细胞生理、水分生理、矿质营养、光合作用、呼吸作用、生长发育、激素生理、抗性生理、糖类、脂类、蛋白质、核酸、酶的分离、制备、检测技术等。附录部分包括各种常用数据表和常用试剂的配制方法等。

本书以高等农林院校植物生产类各专业的本科生为对象,也可供综合性大学、师范院校及其他与植物生理生化实验有关的师生、科技人员参考。

主 编 李合生

副主编 孙 群 赵世杰 章文华

参加编写人员及其分工:

李合生(实验原理:第一章;实验技术:实验 1、2、3、8、9、10、14、18、33(I)、34、36、42、附录 1~9)

孙 群(实验原理:第六章;实验技术:实验 29、30、31、33(II)、43)

赵世杰(实验原理:第五章;实验技术:实验 15、16、17、19)

章文华(实验原理:第二章;实验技术:实验 50~55)

陈翠莲(实验原理:第七章;实验技术:实验 4、5、6、7、20、21、24)

洪玉枝(实验原理:第四章;实验技术:实验 27、28、35、37、41)

夏 凯(实验原理:第九章;实验技术:实验 44~49)

王 玮(实验原理:第八章;实验技术:实验 11、12、13、32)

巩普遍(实验原理:第三章;实验技术:实验 22、23、25、26、38、39、40)

CHINA

前 言

在国家教育部主持的“面向 21 世纪高等农林教育本科生物系列课程教学内容和课程体系改革”的研究与实践中,针对传统的农林高等教育对学生实验课重视不够的状况,项目组提出了加深学生对实验基本理论的理解、加强学生实验操作技能、培养严谨的科学态度、提高学生分析和解决问题能力的改革设想,即把“植物生理学实验”和“生物化学实验”分别从原来的理论课中单列出来,合并为一门独立的新课程——“植物生理生化实验”,单独记成绩,作为农学、园艺、农业资源等植物生产类各专业的必修专业基础课。

为适应“植物生理生化实验”课程的需要,项目组组织编写了《植物生理生化实验原理和技术》。内容分为两篇:第一篇实验理论部分,包括实验技术的一般原理、离心技术、层析技术、电泳技术、红外线 CO_2 气体分析技术、光学分析技术、气体测压技术、电化学分析技术、免疫化学技术等实验原理;第二篇为实验技术部分,收入了常用实验方法五十余项。

本教材的特点如下:

1. 实验内容除了验证某些生理生化理论之外,重点放在学生以后在教学实习、毕业论文、工作岗位上可能会使用到的分析技术上,精简一些简单验证性的实验内容。

2. 实验技术是经典的或是经过多年科学实验证明方法是成熟的,结果是可信的,重演性好的。

3. 考虑到高等教育所应有的超前性,且目前高等农林院校内植物生理生化实验室的现有设备条件已逐步更新,因此,删除一些陈旧的实验方法,增加了一些现代实验技术。

4. 有的实验项目同时列出了几种不同方法,便于不同学校针对不同的对象选择使用。本教材也适用于单列的“植物生理学实验”和“生物化学实验”课。

本教材是在编者所在的各院校的许多教师多年的实验教学经验和编写出版的多本植物生理学和生物化学实验类教材(如邹琦主编的《植物生理生化实验指导》、文树基主编的《基础生物化学实验指导》等)的基础上,修改、充实、提高的产物。本书由华中农业大学李合生主编,西北农业大学孙群、山东农业大学赵世杰、南京农业大学章文华任副主编,编委有华中农业大学陈翠莲、洪玉枝,南京农业大学夏凯,山东农业大学王玮,西北农业大学巩普遍。初稿完成后,经山东农业大学邹琦教授和西北农业大学文树基教授仔细审阅,随后,又根据审稿意见进

行了修改和定稿。在此,我们对所有参与本教材编写、绘图、审阅的同志们,一并表示诚挚的谢意。

欢迎兄弟院校使用本教材。限于水平,谬误之处在所难免,敬请各位读者对本书的缺点和错误给予批评指正。

编 者

1999年5月

目 录

前 言	1
<u>第一篇 植物生理生化实验原理</u>	
第一章 植物生理生化实验技术的一般原理	1
1.1 植物材料的种类	1
1.2 植物材料的采取	1
1.3 分析样品的前处理和保存	3
1.4 待测组分的提取、分离和纯化技术	4
1.5 样品中待测组分的测定	7
1.6 实验结果的数据处理与分析	8
第二章 离心技术	11
2.1 基本原理	11
2.2 离心机的类型及主要构造	12
2.3 常用离心技术	15
2.4 分析性超速离心技术的应用	17
第三章 层析技术	20
3.1 层析原理	20
3.2 分配层析	22
3.3 吸附层析	25
3.4 凝胶层析	28
3.5 离子交换层析	29
3.6 亲和层析	31
3.7 高效液相色谱	33
3.8 气相色谱	34
3.9 层析技术的应用	36
第四章 电泳技术	40
4.1 电泳基本原理	40
4.2 影响迁移率的主要因素	42
4.3 凝胶电泳	43
4.4 电泳的应用	58
第五章 红外线 CO₂ 气体分析技术	61
5.1 红外线 CO ₂ 气体分析仪的工作原理	61

5.2 红外线 CO ₂ 气体分析仪的类型	65
5.3 红外线 CO ₂ 气体分析技术的运用	68
第六章 光学分析技术	70
6.1 紫外光和可见光分光光度法	70
6.2 旋光分析法	74
6.3 原子吸收分光光度法	77
6.4 火焰光度法	80
6.5 荧光分光光度法	82
第七章 气体测压技术	87
7.1 气体测压技术的类型及其基本原理	87
7.2 气体测压技术的应用	90
第八章 电化学分析技术	95
8.1 电化学分析技术的类型及其基本原理	95
8.2 电化学分析技术的应用	98
8.3 DDS-12A 型数字式电导率仪的基本原理及使用方法	98
第九章 免疫化学技术——酶联免疫吸附测定法(ELISA)	100
9.1 ELISA 的原理	101
9.2 设计和合成特定的免疫原	101
9.3 抗体的制备	102
9.4 标记抗原的制备	103
9.5 ELISA 测定程序的设计	103

第二篇 植物生理生化实验技术

实验技术

实验 1 植物组织中自由水和束缚水含量的测定	105
实验 2 植物组织水势的测定	109
I. 小液流法	109
II. 折光仪法	111
III. 压力室法	111
实验 3 植物细胞渗透势的测定(质壁分离法)	114
实验 4 钾离子对气孔开度的影响	116
实验 5 植物伤流液中糖和氨基酸的鉴定	117
实验 6 植物根系活力的测定(TTC 法)	119
实验 7 植物组织中金属元素的测定(原子吸收分光光度法)	121
实验 8 植物体内硝态氮含量的测定	123
实验 9 植物体内硝酸还原酶活力的测定	125
I. 离体法	125
II. 活体法	127

实验 10	用真空渗入法测定环境因子对光合作用的影响	128
实验 11	叶绿体色素的提取、分离和理化性质	130
	I. 提取与分离	130
	II. 理化性质	132
实验 12	叶绿素含量的测定	134
实验 13	希尔反应的观察	138
实验 14	核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶活性的测定	138
	I. 分光光度法	139
	II. 同位素法	141
实验 15	乙醇酸氧化酶活性的测定	142
实验 16	红外线 CO ₂ 气体分析仪法测定植物光合速率与呼吸速率	144
	I. 密闭系统斜率法	144
	II. 密闭系统落差法	150
实验 17	氧电极法测定植物光合速率和呼吸速率	151
实验 18	叶绿体光诱导荧光强度的测定	156
实验 19	叶绿体中甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶活性的测定	157
实验 20	微量定容测压法测定种子的呼吸速率	160
实验 21	小篮子法(广口瓶法)测定植物的呼吸速率	162
实验 22	过氧化物酶活性的测定	164
实验 23	过氧化氢酶活性的测定(高锰酸钾滴定法)	165
实验 24	氮蓝四唑(NBT)法测定超氧化物歧化酶(SOD)活力	167
实验 25	淀粉酶活性的测定	169
实验 26	脲酶 K _m 值的测定	172
实验 27	植物过氧化物酶同工酶的测定(凝胶圆盘电泳)	175
实验 28	蛋白质相对分子质量的测定(SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳法)	178
实验 29	植物组织中可溶性蛋白质含量的测定	182
	I. 斐林 - 酚试剂法	182
	II. 考马斯亮蓝 G - 250 染色法	184
	III. 紫外吸收法	185
实验 30	植物组织中总氮、蛋白氮含量的测定(微量凯氏法)	186
实验 31	植物组织中游离氨基酸总量的测定(茚三酮溶液显色法)	192
实验 32	植物组织中糖含量的测定	194
	I. 蒽酮比色法测定可溶性糖	195
	II. 3,5 - 二硝基水杨酸法测定还原糖	197
	III. 苯酚法测定可溶性糖	199
	IV. 斐林试剂比色法测定还原糖	201
实验 33	谷物淀粉含量的测定(旋光法)	203
	方法 I	203

	方法 II	205
实验 34	植物种子生命力的快速测定	207
	I. TIC 法	207
	II. 染料染色法	208
	III. 碘化钾反应法	209
	IV. 荧光法	210
实验 35	植物组织中纤维素含量的测定	211
实验 36	苯丙氨酸解氨酶(PALase)活性的测定	213
实验 37	植物组织中 DNA 的提取与测定	214
实验 38	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	217
实验 39	RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳	218
实验 40	植物组织 ATP 酶活性的测定	220
实验 41	植物种子中主要不饱和脂肪酸的分离(反相纸层析法)	223
实验 42	种子粗脂肪含量的测定	225
实验 43	气相色谱法测定植物样品膜脂中脂肪酸的含量	227
实验 44	气相色谱法测定乙烯含量	229
实验 45	酶联免疫吸附检测法(ELISA)测定植物激素含量	231
实验 46	植物体内脱落酸、赤霉素的分离和测定	234
实验 47	赤霉素对 α -淀粉酶的诱导形成	238
实验 48	植物激素对愈伤组织的形成和分化的影响	239
实验 49	类似生长素对种子萌发的影响	242
实验 50	植物春化和光周期现象的观察	244
	I. 植物春化现象的观察	244
	II. 植物光周期现象的观察	245
实验 51	抗坏血酸(维生素 C)含量的测定	246
	I. 滴定法	246
	II. 比色法	248
实验 52	谷类作物种子中赖氨酸含量的测定	250
	I. 茚三酮显色法	250
	II. 染料结合法(DBL)	252
实验 53	脯氨酸含量的测定	258
实验 54	植物组织中丙二醛含量的测定	260
实验 55	植物抗逆性的测定(电导仪法)	261
附录		
附录 1	硫酸铵饱和度常用表	264
附录 2	实验中常用酸、碱的比重和浓度的关系	265
附录 3	常用固态酸、碱、盐的物质的量浓度配制参考表	266
附录 4	常用酸、碱指示剂	267

附录 5 常用缓冲溶液的配制	267
附录 6 植物组织培养常用培养基	272
附录 7 标准计量单位	273
附录 8 常见的植物生长调节物质及其主要性质	275
附录 9 植物激素与生长调节剂在农业生产中的应用	276
主要参考文献	279

CHINA

第一篇 植物生理生化实验原理

第一章

植物生理生化实验技术的一般原理

1.1 植物材料的种类

植物生理生化实验(plant physiological biochemical experiment)使用的材料非常广泛,根据来源可划分为天然的植物材料(如植物幼苗、根、茎、叶、花等器官或组织等)和人工培养、选育的植物材料(如杂交种、诱导突变种、植物组织培养突变型细胞、愈伤组织、酵母等)两大类;按其水分状况、生理状态可划分为新鲜植物材料(如苹果、梨、桃果肉,蔬菜叶片,绿豆、豌豆芽下胚轴,麦芽、谷芽,鳞茎、花椰菜等)和干材料(小麦面粉,玉米粉,大豆粉,根、茎、叶干粉,干酵母等)两大类,因实验目的和条件不同,而加以选择。

1.2 植物材料的采取

植物材料生理生化分析的准确性,在很大程度上取决于植物材料的采取是否具有最大的代表性。为了保证植物材料的代表性,必须运用科学方法采取材料。从大田或实验地、实验器皿中采取的植物材料,称为“原始样品”,再按原始样品的种类(如植物的根、茎、叶、花、果实、种子等)分别选出“平均样品”,然后根据分析的目的、要求和样品种类的特征,采用适当的方法,从“平均样品”中选出供分析用的“分析样品”。

1.2.1 原始样品的取样法

1.2.1.1 随机取样

在试验区(或大田)中选择有代表性的取样点,取样点的数目视田块的大小

而定。选好点后,随机采取一定数量的样株,或在每一个取样点上按规定的面积从中采取样株。

1.2.1.2 对角线取样

在试验区(或大田)可按对角线选定五个取样点,然后在每个点上随机取一定数量的样株,或在每个取样点上按规定的面积从中采取样株。

1.2.2 平均样品的采取法

1.2.2.1 混合取样法

一般颗粒状(如种子等)或已碾磨成粉末状的样品可以采取混合取样法进行。具体的做法为:将供采取样品的材料铺在木板(或玻板、牛皮纸)上成为均匀的一层,按照对角线划分为四等分。取对角的两份为进一步取样的材料,而将其余的对角两份淘汰。再把已取中的两份样品充分混合后重复上述方法取样。反复操作,每次均淘汰 50% 的样品,直至所取样品达到所要求的数量为止。这种取样的方法叫做“四分法”。

一般禾谷类、豆类及油料作物的种子均可采用这个方法采取平均样品,但应注意样品中不要混有不成熟的种子及其他混杂物。

1.2.2.2 按比例取样法

有些作物、果品等材料,在生长不均等的情况下,应将原始样品按不同类型的比例选取平均样品。例如对甘薯、甜菜、马铃薯等块根、块茎材料选取平均样品时,应按大、中、小不同类型的样品的比例取样,然后再将每一个样品纵切割开,每个切取 1/4、1/8 或 1/16,混在一起组成平均样品。

在采取果实的平均样品时,如桃、梨、苹果、柑橘等果实,即使是从同一株果树上取样,也应考虑到果枝在树冠上的各个不同方位和部位以及果实体积的大、中、小和成熟度上的差异,按各相关的比例取样混合成平均样品。

1.2.3 取样注意事项

(1) 取样的地点,一般在距田埂或地边一定距离的株行取样,或在特定的取样区内取样。取样点的四周不应有缺株的现象。

(2) 取样后,按分析的目的分成各部分(如根、茎、叶、果……等),然后捆齐,并附上标签,装入纸袋。有些多汁果实取样时,应用锋利不锈钢刀子,并注意勿使果汁流失。

(3) 对于多汁的瓜、果、蔬菜及幼嫩器官等样品,因含水分较多,容易变质或霉烂,可以在冰箱中冷藏,或进行灭菌处理或烘干以供分析之用。

(4) 选取平均样品的数量应当不少于供分析用样品的两倍。

(5) 为了动态地了解供试验用的植物在不同生育期的生理状况,常按植物

不同的生育期采取样品进行分析。取样方法系在植物的不同生育时期先调查植株的生育状况并区分为若干类型,计算出各种类型株所占的百分比,再按此比例采取相应数目的样株作为平均样品。

1.3 分析样品的前处理和保存

1.3.1 种子样品的前处理和保存

一般种子(如禾谷类种子)的平均样品清除杂质后要进行磨碎,如条件许可最好用电动磨粉机,在磨碎样品前后都应当使磨粉机(或其他碾磨用具)的内部十分清洁,最初磨出的少量样品可以弃去不要,然后正式磨碎,使样品全部无损地通过 80~100 目筛孔的筛子,混合均匀,作为分析样品贮存于具有磨口玻塞的广口瓶中,并随即贴上标签,注明样品的采取地点、试验处理、采样日期和采样人姓名等。长期保存的样品,在其贮存瓶上的标签还需要涂蜡。为了防止样品在贮存期间生虫,可在瓶中放置一点樟脑或对位二氯甲苯。

油料作物种子(如芝麻、亚麻、花生、蓖麻等)如需要测定其含油量时,不应当用磨粉机磨碎,否则样品中所含的油分吸附在磨粉机上将明显地影响分析的准确性。所以,应将少量油料种子样品放在研钵磨碎或用切片机切成薄片作为分析样品。

1.3.2 茎叶样品的前处理和保存

采回新鲜样品(平均样品)后,先要经过净化、杀青、烘干(或风干)等一系列前处理(pretreatment)。

(1) 净化。新鲜样品从田间或试验地取回时,常沾有泥土等杂质,应用柔软湿布擦净,不应用水冲洗。

(2) 杀青。为了保持样品化学成分不发生转变和损耗,务必及时终止样品中酶的活动,这就需要将样品置于 105℃ 的烘箱中杀青 15~20 min。

(3) 烘干。样品经过杀青之后,应立即降低烘箱的温度,维持在 70~80℃,直到样品烘干至恒重为止,一般的样品所需烘干的时间大约为一天。烘干时应注意温度不能过高,否则会把样品烤焦。

烘干(或风干)的茎叶样品,均要进行磨碎,磨茎叶用的粉碎机与磨种子的磨粉机的结构不同,不宜用磨种子的电磨来代替。如果茎叶样品中的水分偏高而不利于磨碎时,那就需要进一步烘干之后再磨碎。磨碎后样品的保存方法均与上相同。

此外,在测定植物材料中酶的活性或某些成分(如维生素 C、DNA、RNA 等)

的含量时,需要用新鲜样品。取样时注意保鲜,取样后应立即进行待测组分提取;也可采用液氮中冷冻保存或冰冻真空干燥法得到干燥的制品,放在 0~4℃ 冰箱中保存即可。在鲜样已进行了匀浆,尚未完成提取、纯化,不能进行分析测定等特殊情况下,也可加入防腐剂(甲苯、苯甲酸),以液态保存在缓冲液中,置于 0~4℃ 冰箱即可。但保存时间不宜过长。

1.4 待测组分的提取、分离和纯化技术

1.4.1 待测组分的提取

上述烘干(风干)的、冰冻的或是新鲜的样品置于一定的溶剂(提取液)中,用电动捣碎机或研钵破碎后,样品混合液内含有各种待测组分。由于待测组分的结构、性质不同,与其他细胞组分的结合强度及在提取液中的溶解程度有差异,因而不同待测组分的提取液性质、成分和操作条件都有很大差别。

对于像色素、植物激素、氨基酸、可溶性糖、有机酸等小分子物质的提取,首要的是选择适当性质的溶剂。一般而言,极性的(亲水的)待测组分易溶于极性溶剂中,非极性的(亲脂的)待测组分易溶于非极性的有机溶剂中。提取液的 pH 影响待测组分的解离状态及其活性和稳定性,不可忽视。例如叶绿素可以用 95% 乙醇或丙酮溶液提取,脱落酸、赤霉素可用丙酮、甲醇溶液提取,还原糖可用蒸馏水提取,维生素 C 可用 2% 草酸溶液提取。两性物质氨基酸在等电点以外的任何 pH 溶液中都是呈解离态,一般可用 10% 乙酸提取。为了使待测组分能更快、更充分地与其他细胞组分中分离出来,可以采用电炉加热、煮沸、恒温水浴保温、剧烈搅拌或振荡等,这样就可以使待测组分最大限度地存在于提取液中,再经过离心或过滤除去残渣,即可得到较理想的粗提液。

对于像核酸、蛋白质及酶等生物大分子的提取,则要相对复杂一些。一般情况下,碱性生物大分子物质易溶于酸性溶剂,酸性生物大分子物质易溶于碱性溶剂。由于不同蛋白质分子中,含有不同比例的极性基团与非极性基团,氨基酸排列顺序有很大差别,因此,提取蛋白质时,要根据蛋白质的结构及溶解性质、等电点等因素配制不同的蛋白质提取液。一般而言,蛋白质提取液以水为主,再加少量酸、碱或盐组成,这样可以通过少量离子的作用,减少蛋白质分子极性基团之间的静电引力,加强蛋白质与提取液之间的相互作用,从而提高其溶解性。缓冲液的 pH 应选择在偏离等电点的两侧,使蛋白质分子带上净电荷,以提高其溶解度。对于某些与脂质结合得比较牢固的蛋白质复合体或含脂肪族氨基酸较多的蛋白质,疏水性强,则需要微碱性提取液中加入一定浓度的表面活性剂,如十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)或高浓度的有机溶剂(如 70%~80%