



植物生理学

实验教程

□ 张以顺 黄霞 陈云凤 编著



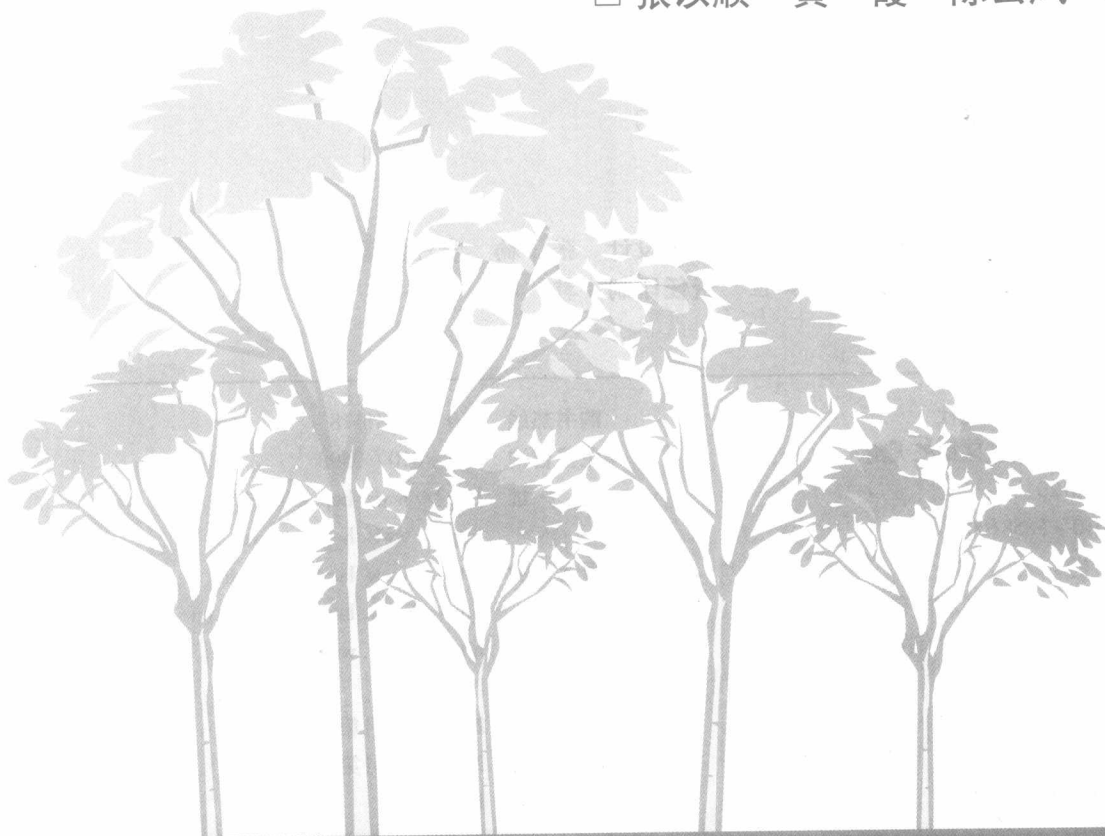
高等教育出版社
Higher Education Press



植物生理学

实验教程

□ 张以顺 黄霞 陈云凤 编著



高等教育出版社
Higher Education Press

内容提要

本书主要介绍植物生理学的细胞生理、呼吸作用及糖类代谢、光合作用、水分生理及矿质营养、氮代谢、种子生理、生长发育、生长物质、逆境生理、同工酶及蛋白质电泳和植物组织培养等实验技术。书中大部分实验均经过多年实验教学及科研实践的反复验证,并结合近几年仪器设备的更新及国内外植物生理学前沿技术的发展编写而成。所编选的实验具有代表性、多样性、覆盖面广、内容比较系统、部分实验方法新颖,既适应目前植物生理学研究的发展趋势,又顾及传统植物生理学的研究需要,符合各高校培养既有扎实基础知识又有创新思维能力的实验教学改革方向,有利于增强学生独立工作、解决问题的能力。

本书可作为各类高等院校生物类专业本科生和研究生实验教学的指导教材,也可供从事植物生理学及相关学科的研究技术人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

植物生理学实验教程/张以顺,黄霞,陈云凤编著.

北京:高等教育出版社,2009.2

ISBN 978-7-04-025527-0

I. 植… II. ①张…②黄…③陈… III. 植物生理学-实验-高等学校-教材 IV. Q945-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第198681号

策划编辑 王莉 责任编辑 孟丽 封面设计 张楠 责任绘图 尹莉
版式设计 余杨 责任校对 俞声佳 责任印制 韩刚

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
总机 010-58581000

经销 蓝色畅想图书发行有限公司
印刷 北京鑫丰华彩印有限公司

开本 787×1092 1/16
印张 12
字数 280 000

购书热线 010-58581118
免费咨询 800-810-0598
网址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landraco.com>
<http://www.landraco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版次 2009年2月第1版
印次 2009年2月第1次印刷
定价 15.90元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 25527-00

前 言

植物生理学是研究植物生命活动规律的科学。植物生理学实验是验证、探索植物生命活动规律的技术,是植物生理学课程教学的重要组成部分,旨在加深学生对植物生理学理论和实验基本原理的理解。近年来,随着细胞生物学、生物化学、生物物理学和分子生物学研究的迅速发展,许多先进的实验技术不断涌现出来,这些新技术与传统的植物生理学实验方法相结合,推动现代植物生理学研究进入了一个全新的时代。

实验不仅可加强学生的实验操作技能,而且可以培养学生严谨的科学作风,在提高学生分析和解决问题的能力及独立工作能力方面,具有十分重要的作用。本实验教程编写的内容既适应目前现代植物生理学研究的的发展趋势,又顾及传统植物生理学的研究需要,大部分实验都获得我们学院相关学科长期实验教学和科学研究的验证,适合作为各类高等学校的植物生理学实验教材,也可供相关专业人士参考使用。

本书由张以顺统筹组织和审定。主要包括细胞生理、植物的呼吸作用及糖类代谢、植物光合作用、植物水分生理及矿质营养、植物的氮代谢、植物种子生理、植物生长发育、植物生长物质、植物的逆境生理、植物同工酶及蛋白质电泳和植物组织培养等共 11 章。其中,第八章的实验 41、实验 43、实验 44、实验 45、实验 47、实验 48 等 6 个实验内容由黄霞编写;第十一章的实验 64、实验 65、实验 66 等 3 个实验由陈云凤编写;其余实验内容均由张以顺编写,陈云凤还参与部分实验内容的校对工作。

本书在编写过程中得到中山大学“国家理科基础科学研究与教学人才培养生物学基地”建设基金的资助,在此表示感谢。

由于编者水平有限,书中不足和错误在所难免,恳请广大读者和专家给予批评指正。

张以顺

2008 年 11 月 25 日

目 录

第一章 细胞生理	1	实验 11 用真空渗入法测定环境因子 对光合作用的影响	33
实验 1 植物离体叶绿体的制备	1	实验 12 叶绿体色素的定量测定	34
I 破碎叶绿体的制备	2	实验 13 叶绿素总量的测定	37
II 完整叶绿体的制备	2	实验 14 高等植物叶绿体希尔反应 活力的测定	39
实验 2 植物乙醛酸循环体的分离	3	I 邻菲罗林盐酸盐显色法	40
第二章 植物的呼吸作用及糖类代谢	6	II 分光光度法	41
实验 3 植物线粒体的制备及其呼吸 耗氧的测定	6	III 2,6-二氯酚吲哚酚 比色法	42
I 线粒体的制备	6	IV OXYGRAPH 氧电极法	42
II 线粒体耗氧测定	7	实验 15 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧 酶活力测定	43
实验 4 小篮子法(广口瓶法)测定植 物的呼吸速率	15	实验 16 乙醇酸氧化酶活力测定	46
实验 5 丙酮酸激酶活力的测定	17	实验 17 植物组织中 ATP 酶活力 测定	49
实验 6 烯醇丙酮酸磷酸羧化酶活力 的测定	19	第四章 植物水分生理及矿质营养	53
实验 7 植物组织中可溶性糖含量的 测定	20	实验 18 植物组织含水量的测定	53
I 苯酚法测定可溶性糖	20	实验 19 植物组织中自由水与束缚水 含量的测定	54
II 蒽酮法测定可溶性糖	21	实验 20 植物组织水势的测定	56
实验 8 植物组织淀粉含量的测定	24	I 小液流法	56
实验 9 α -淀粉酶和 β -淀粉酶 活力的测定	26	II 折射法	57
第三章 植物光合作用	29	实验 21 质壁分离法测定渗透势	58
实验 10 植物叶片光合速率的测定	29	实验 22 蒸腾强度的测定	60
I 改良半叶法测定叶片光合 速率	29	实验 23 植物叶片气孔密度和面积 测定	61
II OXYGRAPH 氧电极测定植物 叶片光合速率	30	实验 24 气孔运动及其影响因素	63
		I 显微镜下观察气孔运动	63
		II 光诱导气孔的开启	63

III 钾离子对气孔开度的影响	64	实验 35 种子蛋白质含量的快速测定(双缩脲法)	95
IV 保卫细胞内钾离子变化的观察	64	实验 36 种子活力的测定	97
V ABA 对气孔关闭的作用	65	I TTC 定量法	97
实验 25 植物伤流液中糖和氨基酸的鉴定	67	II 电导法	98
实验 26 植物根系活力的测定(TTC 法)	69	III 加速衰老法	99
实验 27 植物的溶液培养和缺乏必需元素的症状观察	71	第七章 植物生长发育	101
实验 28 植物灰分元素的分析鉴定	74	实验 37 植物春化和光周期现象的观察	101
第五章 植物的氮代谢	77	I 植物春化现象的观察	101
实验 29 植物组织中可溶性蛋白质含量的测定	77	II 植物光周期现象的观察	101
I Bradford protein-binding assay 法测定植物可溶性蛋白质含量	77	实验 38 花粉活力的测定	103
II Lowry 法测定植物可溶性蛋白质含量	78	I 花粉萌发测定法	103
实验 30 顽拗性植物组织中蛋白质的提取及含量测定	81	II I ₂ -KI 染色测定法	104
实验 31 谷类作物种子中赖氨酸含量的测定	83	III TTC 法	104
实验 32 植物体内谷氨酰胺合成酶活力的测定	85	第八章 植物生长物质	106
实验 33 植物组织中硝态氮含量的测定(比色法)	86	实验 39 吲哚乙酸的提取、纯化和测定	106
I 对氨基苯磺酸法测定植物组织中硝态氮含量	86	实验 40 酶联免疫吸附检测法测定植物激素含量	108
II 水杨酸法测定植物组织中硝态氮含量	88	实验 41 吲哚乙酸的生物鉴定方法(小麦胚芽鞘切段伸长法)	110
实验 34 植物组织中硝酸还原酶活力的测定	90	实验 42 植物体内脱落酸、赤霉素的分离和测定	112
I 活体法	91	实验 43 脱落酸的生物鉴定法	114
II 离体法	92	实验 44 赤霉素类似物质的生物鉴定方法	115
第六章 植物种子生理	95	实验 45 细胞分裂素对萝卜子叶的保绿作用	116
		实验 46 乙烯对果实的催熟作用	117
		实验 47 赤霉素诱导 α -淀粉酶合成的实验 I	118
		实验 48 赤霉素诱导 α -淀粉酶合成的实验 II	120
		实验 49 植物激素对愈伤组织形成和分化的影响	122
		实验 50 吲哚乙酸氧化酶活力的	

测定	125	实验 61 酯酶同工酶电泳	147
第九章 植物的逆境生理	128	实验 62 植物过氧化物酶同工酶电泳	150
实验 51 植物抗逆性的鉴定 (电导法)	128	实验 63 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳	153
实验 52 干旱对植物体内脯氨酸含量的影响	129	第十一章 植物组织培养	159
实验 53 植物组织中丙二醛含量的测定	131	实验 64 植物的组织培养技术	159
实验 54 抗坏血酸含量的测定	133	实验 65 植物细胞的悬浮培养	161
实验 55 抗坏血酸过氧化物酶活力的测定	135	实验 66 植物原生质体的培养	163
实验 56 植物组织中过氧化氢含量及过氧化氢酶活力测定	136	附录	167
实验 57 过氧化物酶活力的测定	139	附录 1 计量单位	167
实验 58 植物组织中超氧化物歧化酶活力的测定	141	附录 2 缓冲溶液的配制	169
实验 59 低温对植物的伤害作用	143	附录 3 常用酸、碱的相对密度和浓度	175
实验 60 多酚含量的测定	144	附录 4 常用指示剂的配制	176
I 高锰酸钾法	145	附录 5 常见植物生长调节物质及主要性质	176
II 酒石酸铁法	145	附录 6 常用培养基附加成分	177
第十章 植物同工酶及蛋白质电泳技术	147	附录 7 植物组织和细胞培养常用培养基	178
		附录 8 植物激素和生长调节剂在农业生产中的应用	179

第一章 细胞生理

实验 1 植物离体叶绿体的制备

【实验目的】

1. 掌握植物离体叶绿体的制备技术。
2. 了解被膜完整叶绿体及破碎叶绿体的主要区别和功能特征。

【实验原理】

叶片是植物进行光合作用的主要器官,叶绿体则是植物进行光合作用的细胞器,富含在叶肉细胞内,大多数高等植物的叶肉细胞含有 50 ~ 200 个叶绿体,约占细胞质体积的 40%。叶绿体外周为被膜所包裹,内有类囊体垛叠而成的基粒片层和由单个类囊体构成的基质片层,其余空间为间质。依据分离所得叶绿体的结构完整程度,大致可分成两类,一类为被膜已破碎的叶绿体,称之为破碎叶绿体,它具有光合电子传递、光合放氧和光合磷酸化的功能;另一类为被膜完整的叶绿体,它具有同化二氧化碳的完全的光合作用功能。叶绿体的制备一般采用机械或手工方式先行破碎叶片,再通过逐步分级离心的方法进行。

【仪器设备】

冷冻离心机、研钵或电动捣碎器、分光光度计、照光装置、OXYGRAPH 氧电极、制冰机、冰箱、移液器、50 ml 离心管、容量瓶、磁力搅拌器、电子天平、小烧杯、纱布等。

【材料与试剂】

1. 材料

新鲜菠菜 (*Spinacia oleracea*)、豌豆 (*Bruchus pisorum*) 或小麦 (*Triticum aestivum* L.) 幼苗叶片。

2. 试剂

① 提取液 1 (STN): 内含 0.4 mol/L 蔗糖、0.05 mol/L Tris - HCl (pH 7.6)、0.01 mol/L NaCl。

② 80% 丙酮。

③ 提取液 2: 内含 0.33 mol/L 山梨醇、0.05 mol/L MES [2 - (N - 吗啉代) 乙磺酸] [2 - (N - morpholino) ethanesulfonic acid] (pH 6.1)、0.01 mol/L NaCl、2 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L EDTA - Na₂、0.5 mmol/L KH₂PO₄ 和 2 mmol/L 抗坏血酸钠 (抗坏血酸钠最好现用现配)。

④ 悬浮液: 把提取液 2 中的 MES 换成 HEPES [N - 2 - 羟乙基哌嗪 - N' - 2 - 乙磺酸 (N - 2 - hydroxyethylpiperazine - N' - 2 - ethanesulfonic acid)] (pH 7.6) 即可。

⑤ Hill 反应液: 内含 0.05 mol/L Tris - HCl (pH 7.6)、5 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L NaCl、10 mmol/L K₃Fe(CN)₆、10 mmol/L NH₄Cl。

⑥ 0.66 mol/L 山梨醇。

⑦ Percoll (聚乙烯吡咯酮包被的二氧化硅颗粒的无菌胶体悬液, 可以形成 1.3 g/ml 以下的各种密度梯度)。

【实验步骤】**I 破碎叶绿体的制备**

1. 将实验植株置于4℃下,光照15~20 min。
2. 选取新鲜的菠菜、豌豆或小麦幼苗叶片,洗净后去除中脉,置于研钵或捣碎器中,按5 g 叶片 10 ml 的比例加入预冷至0~2℃的提取液1,冰浴中用手工研磨或用电动捣碎器捣碎(研磨不要用力过猛,也不必研磨过细,以叶片磨成小块时即可),匀浆液用4层纱布过滤,去除残渣(注意过滤时不可用力挤压,以免叶绿体被膜破碎)。滤液于4℃、500 g 离心2 min,以去除粗粒沉淀。
3. 取上清液,4℃、3 000 g 离心5 min,弃上清液,沉淀即为叶绿体。
4. 沉淀叶绿体用少量提取液1悬浮,置4℃或冰浴中备用。
5. 叶绿素浓度测定:取叶绿体悬浮液0.1 ml,加4.9 ml 80%的丙酮,摇匀,3 000 g 离心5 min,取上清液,测定其652 nm 下的OD值,再按A₆₅₂公式计算出叶绿体悬浮液中的叶绿素含量。

$$\text{叶绿素 (mg/ml 叶绿体悬浮液)} = (OD_{652} \times 50) \div 34.5$$

注:在破碎叶绿体制剂中加入25%体积的甘油,并置于液氮中储存,可使其Hill反应活性保持较长时间,只是储存时叶绿体的浓度宜浓些(3~4 mg 叶绿素/ml)。

II 完整叶绿体的制备

1. 将实验植株置于4℃下,照光15~20 min。
2. 选取新鲜、具显著皱纹的菠菜或豌豆幼苗叶片,去除叶柄及中脉,按每5 g 叶片约10 ml 的比例加入预冷至0~2℃的提取液2,在低温下,在电动捣碎器上高速捣碎,约2 s/次,间隔捣碎3~4次,然后用4层纱布过滤,去除残渣(注意过滤时不可用力挤压,以免叶绿体被膜破碎)。
3. 取滤液,4℃、1 500 g 离心30~60 s。
4. 小心倒出上清液,先用少许提取液2洗涤沉淀表面的浮物,再加入适量的悬浮液悬浮叶绿体,在分散叶绿体沉淀时宜使用毛笔轻轻刷之,或者用手握住离心管,在冰块之间搅动,使叶绿体由于振动而分散开来(此步千万不能剧烈振荡,以免被膜破碎)。叶绿体悬浮时宜浓一些(叶绿素2 mg/ml 以上),这样有利于其活性的保持。悬浮液置冰浴中备用。
5. 将3 ml 80%的Percoll溶胶(以原液浓度为100,用水稀释)铺在15 ml 离心管的下层,再把3 ml 40%的Percoll溶胶铺在离心管的中层,然后将1 ml 叶绿体悬浮液轻轻地铺在离心管的上层,4℃、1 500 g 下离心2~3 min(此时离心机的加速一定要缓慢上升,而下降时也要缓慢停下,否则会破坏Percoll的浓度梯度层的形成),取出离心管可以看到有3层绿色带,最上层的为破碎叶绿体,沉在底层的为粗颗粒,而40%~80% Percoll 之间的界面上有一绿色层,是完整叶绿体,小心地将它吸取出来,转移到叶绿体悬浮液中,冰浴保存备用。此部分叶绿体的被膜完整率可达95%以上,有时甚至达到100%。Percoll 介质可以重复使用,把密度梯度离心用过以后的40%和80% Percoll,分别吸取出来,存储于冰箱中以备下次使用。如果制备完整叶绿体的目的只是为了供叶绿体DNA的分离所用,则主要获得被膜完整率高的叶绿体制剂即可,不必考虑叶绿体同化二氧化碳的活性,因此提取介质可改用简单的STN溶液,但是操作顺序需按照制备完

整叶绿体的方法,再用 Percoll 作密度梯度离心提纯。

6. 叶绿体被膜完整率的测定:由于铁氰化钾不能透过叶绿体被膜,故完整叶绿体在等渗条件下不能进行铁氰化钾光还原的反应,而被膜破碎的叶绿体,铁氰化钾可进入叶绿体进行反应。利用此原理来比较被膜破碎与未破碎叶绿体的 Hill 反应速率的差别,就可测出叶绿体中被膜的完整率。

被膜未破碎的叶绿体的 Hill 反应速率测定:将 Hill 反应液先以 1:1 体积与 0.66 mol/L 山梨醇混合,使之保持 0.33 mol/L 山梨醇浓度,再加入上述叶绿体悬浮液(每毫升反应液约含叶绿素 50 μg),用 OXYGRAPH 氧电极测定其 Hill 反应速率。

被膜破碎的叶绿体 Hill 反应速率测定:先将上述叶绿体悬浮液先与 Hill 反应液混合(混合液的叶绿素含量约为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$),使被膜在低渗介质下胀破,再以 1:1 体积与 0.66 mol/L 山梨醇混合,测定时保持 0.33 mol/L 山梨醇浓度,在相同条件下测定 Hill 反应速率。

被膜完整率的计算如下:

$$\text{被膜完整率} = \frac{(\text{被膜胀破叶绿体的 Hill 反应速率} - \text{完整叶绿体的 Hill 反应速率})}{\text{被膜胀破叶绿体的 Hill 反应速率}} \times 100\%$$

【实验结果及分析】

本实验涉及的结果数据有:叶绿素浓度、被膜未破的叶绿体的 Hill 反应速率、被膜破碎的叶绿体 Hill 反应速率及叶绿体被膜完整率,其中叶绿素浓度只是作为被膜未破的叶绿体的 Hill 反应速率及被膜破碎的叶绿体 Hill 反应速率测定时叶绿体悬浮液体积加样量的参考依据,叶绿体被膜完整率越高,说明提取所得的离体叶绿体完整性越好,提取过程中破损的程度越低。

【思考题】

1. 为什么叶绿体的提取要在低温的介质中进行?
2. 本实验过程中应注意哪些关键步骤?

【实验建议】

1. 学时数及时间安排:2~3 个学时。
2. 取材:新鲜、具显著皱纹的菠菜或豌豆幼苗叶片均可获得较好的实验结果。
3. 注意事项:① 分离叶绿体应在等渗溶液中制备,以减少渗透压对叶绿体的伤害;② 为了保证叶绿体的完整性,整个过程应在 0~4℃ 下进行,所有提取物、溶液和材料,也应保存在 0~4℃;③ 叶绿体活力会随着离体时间的延长而不断下降,因此,分离工作尽可能在短时间内完成。

【参考文献】

- [1] 华南农业大学植物生理教研室. 植物生理学实验指导. 广州:华南理工大学出版社,2002.
- [2] 邹琦. 植物生理学实验指导. 北京:中国农业出版社,2000.

实验2 植物乙醛酸循环体的分离

【实验目的】

1. 学习植物乙醛酸循环体的分离方法。
2. 掌握乙醛酸循环体完整性的检测技术。

【实验原理】

乙醛酸循环体(glyoxysome)是特定的植物过氧化物酶体,乙醛酸循环主要定位于其中,是脂肪代谢的重要细胞器。乙醛酸循环体可通过 Percoll 密度梯度离心进行分离。在生理水势条件下分离完整的乙醛酸循环体,对研究其代谢和个体发生,以及代谢物的膜运输和乙醛酸循环体膜的电子传递链都有十分重要的意义。

【仪器设备】

高速冷冻离心机、分光光度计、50 ml 离心管、单面刀片、研钵或电动捣碎器、制冰机、冰箱、电子天平、移液器、容量瓶、磁力搅拌器、20 μm \times 20 μm 的尼龙布等。

【材料与试剂】

1. 材料

蓖麻(*Ricinus communis*)子叶。

2. 试剂

① 提取介质(pH 7.5):内含 0.4 mol/L 蔗糖、0.05 mol/L Hepes[4-羟乙基哌嗪乙磺酸,4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-erhanesulfonic acid]、0.1% BSA、1% PVP(聚乙烯吡咯烷酮)及 1 mmol/L EDTA - Na₂。

② 洗涤介质:除不含 PVP 外,其余成分与提取介质相同。

③ 0.21 mol/L 蔗糖:内含 1 mmol/L Hepes, pH 7.5。

④ 0.25 mol/L 蔗糖:内含 1 mmol/L Hepes, pH 7.5。

⑤ 0.4 mol/L 蔗糖。

⑥ 反应混合液:内含 0.1 mol/L 磷酸钾盐缓冲液(pH 7.0)、14 mmol/L H₂O₂ 和乙醛酸循环体制剂。

⑦ Percoll (同实验 1)。

【实验步骤】

1. 取 25℃ 黑暗中发芽 5 d 的蓖麻子叶,洗净,用滤纸吸干表面的水分,称取 15 g 放在预冷的研钵中,加入 35 ml 预冷(4℃)的提取介质,用单面刀片将其充分剁碎,再细心温和地研磨至糊状,用一层孔径为 20 μm \times 20 μm 的尼龙布过滤,滤液于 4℃、1 000 g 离心 10 min。

2. 取上清液,4℃、10 000 g 离心 10 min。

3. 弃上清液,沉淀加入 10 ~ 15 ml 洗涤介质悬浮,4℃、10 000 g 离心 10 min。

4. 弃上清液,沉淀悬浮于 1 ml 洗涤介质中。

5. 取 1 ml 洗涤过的沉淀悬浮物铺在 Percoll 梯度上,4℃、25 000 g 离心 45 min。用针将梯度管底部刺一小孔,从底部进行分管收集,每管 1.5 ml。

6. 测定每管过氧化氢酶和细胞色素氧化酶的活力。

过氧化氢酶活力在梯度上部和下部形成两个活力峰,上部峰较小,没有细胞色素氧化酶活力,下部峰较高,但与细胞色素氧化酶活力有重叠。取上部含过氧化氢酶活力峰管与其邻近 7 管合并,加入 4 倍体积的 0.21 mol/L 蔗糖溶液,小心混合,4℃、10 000 g 离心 10 min。

7. 用吸管将上清液除去,轻轻摇动留下的少许溶液使沉淀悬浮,再加入 10 倍体积的 0.25 mol/L 蔗糖溶液,4℃、10 000 g 离心 10 min。

8. 重复步骤 7 一次。

9. 沉淀悬浮于 0.25 mol/L 蔗糖溶液,即可制得乙醛酸循环体制剂,4℃ 保存备用。

10. 乙醛酸循环体完整性测定:将乙醛酸循环体制剂铺在 5 ml 0.4 mol/L 蔗糖垫上,4℃、10 000 g 离心 15 min。完整的细胞器将通过蔗糖垫沉淀于管底,破碎的细胞器分布在蔗糖垫中。用吸管将糖垫液取出,沉淀悬浮于 0.25 mol/L 蔗糖溶液中。分别测定糖垫和沉淀的过氧化氢酶活力,计算乙醛酸循环体的完整性(%):

$$\text{乙醛酸循环体的完整性}(\%) = \frac{\text{沉淀中过氧化氢酶总活力}}{\text{沉淀中过氧化氢酶总活力} + \text{糖垫中过氧化氢酶活力}} \times 100\%$$

【实验结果及分析】

由于乙醛酸循环体是特定的植物过氧化物酶体,因此,完整的乙醛酸循环体主要用于其代谢和个体发生,以及代谢物的膜运输和乙醛酸循环体膜的电子传递链等实验研究。乙醛酸循环体的完整性是通过过氧化氢酶和细胞色素氧化酶的活力的测定间接实现的,乙醛酸循环体完整性的高低直接表明实验方法是否可用于乙醛酸循环体的分离提取,为其相关研究提供基础保障。

【思考题】

1. 乙醛酸循环体完整性计算的依据是什么?
2. 本实验中的关键步骤有哪些?

【实验建议】

1. 学时数及时间安排:2 个学时。
2. 取材:25℃ 黑暗中发芽 5 d 的新鲜蓖麻子叶。
3. 注意事项:为了保证乙醛酸循环体及相关酶的活力,整个操作过程必须在 4℃ 下进行。

【参考文献】

中国科学院上海植物生理研究所,上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南. 北京:科学出版社, 1999.

第二章 植物的呼吸作用及糖类代谢

实验3 植物线粒体的制备及其呼吸耗氧的测定

I 线粒体的制备

【实验目的】

了解和掌握植物离体线粒体制备的方法。

【实验原理】

线粒体是进行呼吸氧化作用的细胞器,是能量的转换器,为了对这个细胞器的结构和功能进行研究,需要把它从细胞中分离出来,并测定其活性。

在接近生物材料自身的生理状态(合适的 pH、一定的渗透浓度和低温条件)下破碎细胞,可采用分级离心方法将线粒体颗粒与其他细胞内含物在亚细胞水平上分开,然后在一定的离心力下收集线粒体。针对植物组织比较脆弱及其细胞含有较大量的有机酸等特点,不宜采取激烈的破碎方式,根据不同种类材料灵活掌握介质的 pH。在介质中加入一些高分子化合物可除去酚类的干扰。为了去除其他细胞器的污染,获得纯净的线粒体,本实验采用蔗糖衬垫离心法进行提取。

【仪器设备】

冷冻高速离心机、研钵或组织捣碎机、制冰机、冰箱、100 ml 离心管、烧杯、培养皿、恒温培养箱、移液器、纱布、漏斗、电子天平、容量瓶、磁力搅拌器等。

【材料与试剂】

1. 材料

挑选子粒饱满的绿豆(*Vigna radiata*)种子 20 g,用沸水烫后,均匀铺在带有湿润滤纸的培养皿中,37℃下黑暗萌发 3~4 d。去掉种皮和胚根,用滤纸吸干表面水分,放在 4℃冰箱中备用。

2. 试剂

① 提取及洗涤介质:50 mmol/L Tris - HCl 缓冲液, pH 8.0。内含 0.3 mol/L 甘露醇、0.2 mol/L 蔗糖、1 mmol/L EDTA、0.2 mmol/L 二硫苏糖醇、5 mmol/L BSA(牛血清清蛋白)和 1 mg/mL PVP(聚乙烯吡咯烷酮)。

② 悬浮介质:除不加牛血清清蛋白外,其余与提取介质相同。

③ 蔗糖溶液:0.6 mol/L 蔗糖,全用悬浮介质配制。

【实验步骤】

1. 离体线粒体的提取:称取 10 g 去除种皮及胚根的绿豆幼苗放在 4℃冰箱中饥饿 1 h,然后迅速在冰浴中研磨,开始加入少量提取介质,最后加至材料体积的一倍。

2. 匀浆用 4 层纱布过滤,滤液在 4℃、1 000 g 离心 10 min。

3. 取上清液,4℃、11 000 g 离心 20 min。
4. 弃上清液,向沉淀中加入提取介质 5 ml,悬浮,4℃、11 000 g 离心 15 min。
5. 弃上清液,收集沉淀,并悬浮于 0.5 ml 悬浮介质中。
6. 加入 25 ml 洗涤介质,4℃、1 000 g 离心 10 min,取上清液,4℃ 保存备用。
7. 取一干净的 50 ml 离心管,加入 20 ml 0.6 mol/L 的蔗糖溶液,然后将上一步骤中经过低速离心并洗涤过的线粒体悬液铺在 0.6 mol/L 的蔗糖溶液上,4℃、11 000 g 离心 20 min,所得沉淀即为纯化的线粒体,用 1 ml 悬浮介质悬浮,4℃ 保存备用。
8. 蛋白质含量测定(考马斯亮蓝法),根据所测定的蛋白质含量,用悬浮介质将线粒体悬浮液稀释成 2 mg 蛋白质/ml 线粒体悬浮液,4℃ 保存备用。

II 线粒体耗氧测定

【实验目的】

掌握 OXYGRAPH 氧电极的操作方法和线粒体耗氧测定技术。

【实验原理】

氧电极又称 Clark 电极,由嵌在绝缘棒上的铂和银构成,以氯化钾溶液为电解质,覆盖一层 15~20 μm 厚的聚乙烯或聚四氟乙烯薄膜,两极之间为极化电压。溶解氧可透过薄膜进入电极,在铂阴极上还原,同时在极间产生扩散电流,此电流与溶解氧浓度成正比。氧电极可以直接测量溶液中溶解氧的浓度,并且对溶液中氧的吸收或释放所引起的浓度变化十分敏感。具有活性的线粒体,有底物供给时表现出呼吸耗氧,因此可用氧电极测定线粒体的活性即呼吸强度。

【仪器设备】

OXYGRAPH 氧电极、微量注射器、光源、恒温循环水浴锅、小烧杯、滴管等。

注:用氧电极法测定溶解氧的专用仪器国内外均有定型产品。国内有中国科学院上海植物生理研究所生产的简易测氧装置(现已停止生产)和新华仪表厂生产的 CY-Ⅱ型测氧仪等。国外产品有英国 Hansatech 科学仪器公司生产的 CHOROLAB1、CHOROLAB2 液态氧电极等型号,美国 Yellow Springs 仪器有限公司生产的 YSI-53 型生物氧监测仪等。本实验采用英国 Hansatech 科学仪器公司生产的 OXYGRAPH 液态氧电极。

【材料与试剂】

1. 材料

纯化线粒体制剂。

2. 试剂

① 饱和连二亚硫酸钠溶液(现用现配)。

② 50 mmol/L 磷酸缓冲液反应介质:内含 0.4 mol/L 甘露醇、0.2 mol/L 蔗糖、10 mmol/L KCl、10 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L Tris,用 HCl 调至 pH 7.4。

③ 反应底物(A、B、C、D 任选一种):A. 1 mol/L 琥珀酸(钠);B. 0.5 mol/L α-酮戊二酸(钠);C. 1 mol/L 苹果酸(钠);D. 0.1 mol/L ADP(钠盐)。

④ 半饱和氯化钾溶液。

【实验步骤】

1. 电极膜安装

使用清洁的电极可以获得最好的测定结果,因此,在使用电极之前要先清洁电极。

① 在圆形电极(图 3-1)的顶部加一小滴半饱和氯化钾电解液。

② 取一块长约为 3.5 cm,宽约为 0.5 cm 的长形盐桥纸片覆盖在电解液上,并且至少使其一角在电极的凹槽内担当盐桥的作用(图 3-2),然后取一块电极膜覆盖在盐桥纸片上面(图 3-3)。

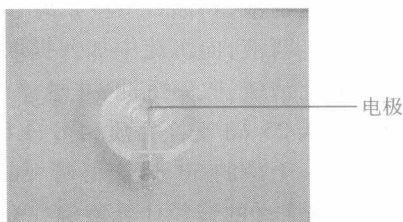


图 3-1 圆形电极

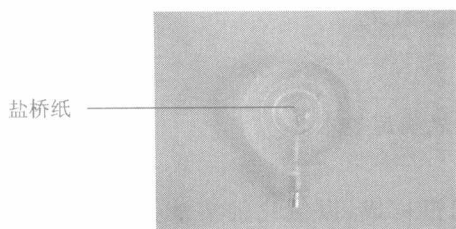


图 3-2 盐桥纸放置图示

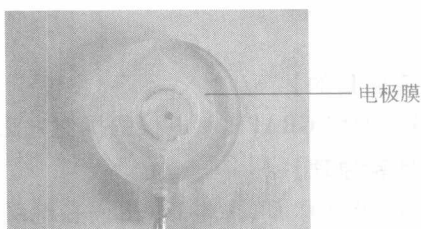


图 3-3 电极膜覆盖图示

③ 将电极的“O”形圈放在装膜器的末端,然后将装膜器垂直于圆形电极的顶部,向下滑动装膜器的外套(图 3-4),推动“O”形圈套在覆有电极膜的电极上。

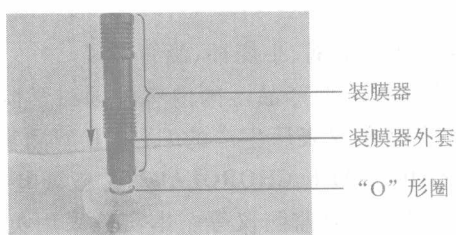


图 3-4 “O”形圈安装图示

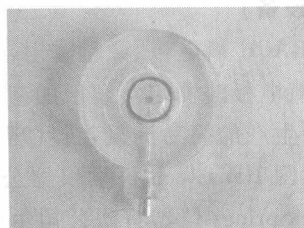


图 3-5 就绪状态的电极

④ 检查电极膜是否平滑,膜内不能存有气泡,然后在电极凹槽内加入几滴电解液。

2. 电极安装

① 将电极室下部的底座逆时针旋转取下,将外部“O”形圈安置在电极外部的凹槽圈内,垂直握住电极室,将电极放入电极室,使覆有薄膜的阴极(铂极)成为反应杯的底部。

② 将安装好的电极室安置在控制盒上方的黑色磁力搅拌器上(图 3-6)。

③ 通过 SI/ADL 连接线将电极与控制盒连接(一端插在控制盒的 INPUT 插口,另一端插在电极的 SMB 控制器上),为电极提供极化电压。

④ 连接恒温循环水浴,以保证恒温控制,因为电极对温度较敏感,因此要使实验在恒温条件下进行,就要通过恒温水浴的循环水控制反应室的温度,水的流速为 6~8 L/min。如果没有恒

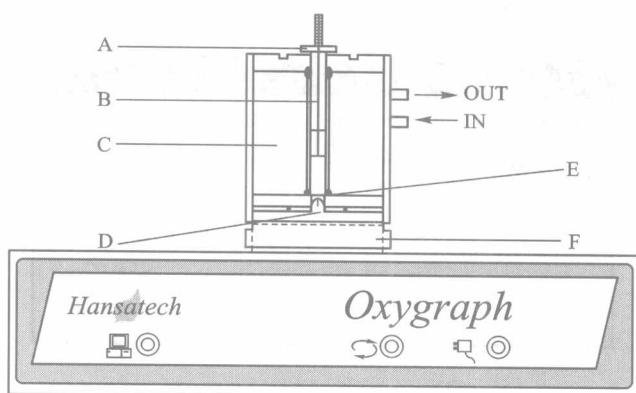


图 3-6 安装完毕的 OXYGRAPH 氧电极测定系统示意图

A. 螺旋调节杆 B. 排气孔 C. 水浴室 D. 电极 E. 反应杯密封圈

F. 反应室底座 OUT. 出水口 IN. 进水口

温水浴,部分温度可以通过自来水控制。恒温水浴器中使用的水一定使用去离子水或蒸馏水,防止水质过硬在氧电极大控温槽内形成污垢,影响观察反应杯。

注:如果实验对温度要求不是很严格,或者实验室内的温度较稳定,可以不连接恒温水浴。

⑤ 在反应杯中加入少量的水(0.2~2.5 ml),然后放入磁转子。

3. 电极控制盒与计算机的连接

通过 RS232 数据传输线将氧电极控制盒与计算机连接起来,数据传输线的一端接入控制盒背后的 RS232 INPUT 接口,另一端接到计算机的 COM1 或 COM2 端口,电源线连接到控制盒背后的 12V 插孔上。

4. 电极校正

在烧杯中加入约 50 ml 的去离子水,充分搅拌使之充分溶入空气中的氧。然后在反应杯中准确加入 2 ml 被空气饱和的去离子水,放入磁转子。

① 建立空气线。

在工具栏上点击“Calibrate”按钮,选择“Liquid Phase Calibration”或直接点击图标,屏幕出现一个校正窗口(图 3-7):

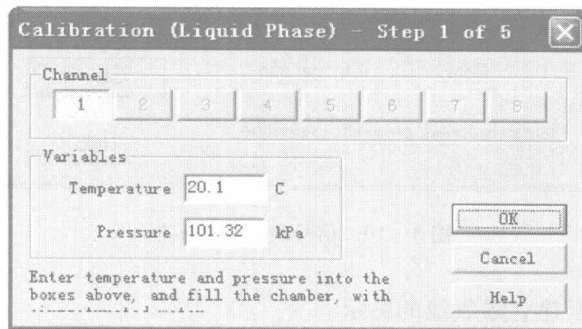


图 3-7 校正对话框

在提示框中输入实验时的温度和大气压,然后点击“OK”进行下一步操作(图 3-8)。

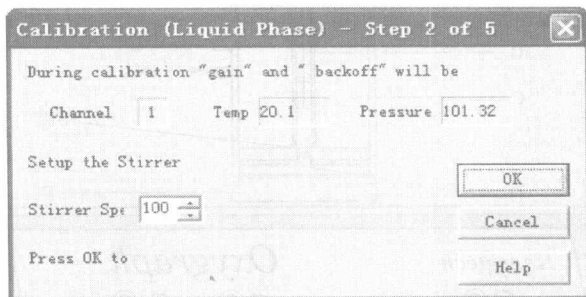


图 3-8 Stirrer Speed 提示框

点击“Stirrer Speed”框中的上下箭头调节磁转子为适当的转速(100 为最大转速),然后点击“OK”继续进行下一步操作(图 3-9)。

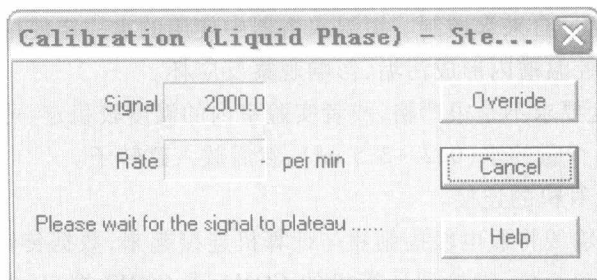


图 3-9 氧含量信号提示框

这时,在屏幕上记录一条被空气饱和的去离子水中的氧含量信号线。提示框中“Signal”为来自电极的信号;“Rate”为信号的变化速率。当信号线平稳,将显示“Plateau reached, press OK to”的提示(图 3-10)。

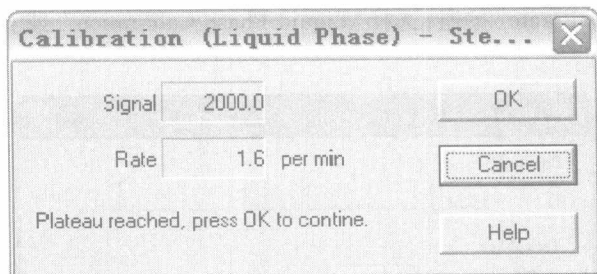


图 3-10 信号线平稳提示框

点击 OK,屏幕上显示建立零氧线的提示。

② 建立零氧线。

当屏幕上显示“Establish zero Oxygen In the chamber”时,通过反应杯盖的排气孔用注射器加