

普通高等教育“十一五”精品课程建设教材

植物生理学

ZHIWUSHENGLIXUESHIYANJIJIAOCHENG

实验教程

张立军 樊金娟 主编



中国农业大学出版社

普通高等教育“十一五”精品课程建设教材

植物生理学实验教程

张立军 樊金娟 主编

中国农业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

植物生理学实验教程/张立军,樊金娟主编. —北京:中国农业大学出版社,2007.8

ISBN 978-7-81117-234-8

I. 植… II. ①张… ②樊… 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(2007)第 083318 号

书 名 植物生理学实验教程
作 者 张立军 樊金娟 主编

策划编辑	张秀环	责任编辑	冯雪梅
封面设计	郑川	责任校对	陈莹 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	100094
电 话	发行部 010-62731190,2620 编辑部 010-62732617,2618	读者服务部	010-62732336
网 址	http://www.cau.edu.cn/caup	出 版 部	010-62733440
经 销	新华书店	e-mail	cbsszs @ cau.edu.cn
印 刷	北京鑫丰华彩印有限公司		
版 次	2007年8月第1版		2007年8月第1次印刷
规 格	787×980 16开本		8.75印张 158千字
印 数	1~3 000		
定 价	15.00元		

图书如有质量问题本社发行部负责调换

本书编审人员

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

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《植物生理学实验教程》。

全书共分 10 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。本书可作为大学生实验教材,也可作为研究生及科研人员和技术工作者的参考书。

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。

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.....	(8)
第二章 植物的水分生理	(11)
实验一 组织水势的测定.....	(11)
一、小液流法	(11)
二、折射仪法	(13)
三、露点微伏压计法	(14)
实验二 细胞渗透势测定.....	(14)
实验三 组织自由水和束缚水含量的测定.....	(16)
第三章 植物的矿质营养	(19)
实验一 根系活力的测定	(19)
一、TTC 法	(19)
二、甲烯蓝法	(21)
实验二 伤流量的测定.....	(23)
一、容积法	(24)
二、重量法	(25)
实验三 硝酸还原酶活力的测定.....	(26)
实验四 溶液培养和缺素培养.....	(28)
第四章 植物的光合作用	(32)
实验一 叶绿体色素的提取、分离、理化性质和定量测定.....	(32)
一、叶绿体色素的提取与分离	(32)
二、叶绿体色素的理化性质	(34)
三、叶绿体色素的定量测定	(36)
实验二 光合速率的测定.....	(40)
一、改良半叶法	(40)

二、红外 CO ₂ 分析仪法	(42)
实验三 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶活性的测定	(42)
实验四 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性的测定	(45)
实验五 叶绿素荧光参数的测定	(47)
第五章 植物的呼吸作用	(49)
实验一 呼吸速率的测定	(49)
一、广口瓶法(小篮子法)	(49)
二、氧电极法	(50)
实验二 抗坏血酸氧化物酶和多酚氧化酶活性的测定	(52)
第六章 植物有机物质运输与转化	(57)
实验一 植物组织可溶性糖含量测定	(57)
一、苯酚法	(57)
二、蒽酮法	(59)
三、3,5-二硝基水杨酸法	(60)
实验二 植物组织中游离氨基酸总量的测定	(62)
实验三 谷类作物种子中赖氨酸含量的测定	(65)
实验四 植物组织中可溶性蛋白含量的测定	(67)
一、考马斯亮蓝 G-250 染色法	(67)
二、Folin-酚试剂法(Lowry 法)	(69)
三、紫外吸收法	(71)
实验五 维生素 C 含量的测定	(72)
第七章 植物生长物质	(75)
实验一 植物激素的提取、分离与含量测定	(75)
一、植物激素的提取、分离与纯化	(75)
二、酶联免疫吸附检测法测定植物激素含量	(77)
实验二 生长素类物质对根、芽生长的效应	(81)
第八章 植物生长发育	(83)
实验一 植物组织培养	(83)
实验二 种子生活力的快速测定	(84)
一、TTC 法	(85)
二、染料染色法	(86)
三、荧光法	(86)
实验三 谷物种子萌发时淀粉酶活性的测定	(87)

第九章 植物逆境生理	(92)
实验一 植物抗逆性鉴定	(92)
实验二 植物组织中游离脯氨酸含量的测定	(94)
实验三 植物组织丙二醛含量测定	(96)
实验四 植物抗氧化酶活性测定	(98)
一、超氧化物歧化酶活性测定	(98)
二、过氧化氢酶活性的测定	(101)
三、过氧化物酶活性的测定	(103)
实验五 植物过氧化物酶同工酶谱带的鉴定	(104)
第十章 综合设计型实验	(108)
实验一 综合型实验	(108)
一、植物对氮素缺乏的生理反应研究	(108)
二、植物对盐胁迫的生理反应的研究	(110)
三、种子萌发过程中的生理生化变化研究	(111)
四、果蔬或种子品质分析	(112)
五、激素的生理效应研究	(112)
实验二 设计型实验	(113)
一、程序	(114)
二、设计型实验参考项目	(114)
附录	(115)
【附录 1】实验报告的写作要求	(115)
【附录 2】常用生物统计公式	(117)
【附录 3】氧电极测氧系统的使用方法	(118)
【附录 4】露点微伏压计测定水势的方法	(119)
【附录 5】阿贝折射仪的使用方法	(120)
【附录 6】红外 CO ₂ 分析仪使用方法	(121)
【附录 7】硫酸铵溶液饱和度计算表	(122)
【附录 8】连续激发式荧光仪使用方法	(123)
【附录 9】植物组织培养常用培养基	(124)
【附录 10】DDS-11A 型电导率仪的使用方法	(125)
【附录 11】垂直板电泳装置的安装和制胶	(126)
参考文献	(129)

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、细胞浆、细胞核和各种细胞器构成。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。细胞生理研究是了解植物体生命活动的重要基础。本章介绍叶绿体、线粒体的分离制备及活力测定方法和细胞质壁分离及复原的观察方法。

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。

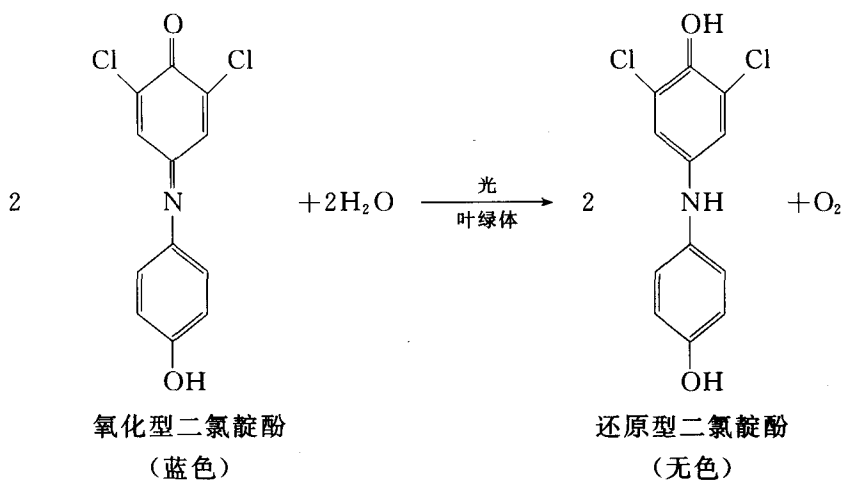
【实验前思考题】

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的研究中有何意义?

【原理】

1. 叶绿体的分离制备原理:根据不同植物材料的特点,分别选用具有合适 pH 值、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,然后在一定的离心力下收集。

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。将在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,在有氧化剂如 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 ,同时将染料还原,其反应速率代表希尔反应的活力。染料被还原后,颜色从蓝色变为无色,因此反应速率可根据溶液吸光度(A)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、仪器及试剂】

1. 材料

新鲜菠菜叶片。

2. 仪器及用具

离心机;研钵;天平;纱布;试管;100W 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 值 7.5。

(2)染料: $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,6-二氯酚醌酚(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 620 nm 处的吸光度(A)达 1.00 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 100W 灯光下 60 cm 处照光,每隔 1 min 快速读下吸光度的变化,连续进行五六次读数,要保证每次的照光时间一致。

4. 计算

以每分钟 A_{620} 的变化量为纵坐标,以时间(min)为横坐标作图。

【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。

【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,呼吸过程中的三羧酸循环、电子传递和氧化磷酸化都是在线粒体中进行的。线粒体是细胞的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 RCR, respiratory control ratio, 呼吸调节比)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 值、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(CytC)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 CytC 将 e^- 交给分子氧)存在时,用琥珀酸引发电子传递后,可使 CytC 还原。当线粒体的外膜完整时,外源的 CytC 不能进入线粒体,因而不被还原,相反,如果外膜破裂,外源 CytC 便可进入线粒体而被还原。还原型 CytC 在 520nm 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 CytC 还原速率。未胀破的线粒体的 CytC 还原速率与胀破线粒体的 CytC 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求算。氧电极(oxygen electrode)是实验室中一种常用的测氧技术。它具有灵敏度高,操作简便而快速,可以连续测定液相中的溶解氧含量变化,非常适合叶绿体活性和线粒体活性以及一些酶反应中氧量变化的测定。原理见第五章实验一。

【材料、仪器及试剂】

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. 仪器及用具

高速冷冻离心机;组织捣碎机;玻璃漏斗、烧杯、纱布;氧电极测氧系统(使用方法见【附录 3】);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 值 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 值 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)。

以上试剂在需要预冷保存。

(5)Folin-酚试剂:配制方法见第六章实验四。

(6)1%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 值 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,放入 4°C 冰箱中至少预冷 1 h。取预冷块茎 100 g,削皮后切成薄片,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 $4\ 000 \text{ g}$ 离心 3 min,去沉淀。上清液在 4°C 下经 $15\ 000\sim 20\ 000 \text{ g}$ 离心 10 min。去上清液。沉淀用洗涤介质洗涤 1 次,并再用 $15\ 000\sim 20\ 000 \text{ g}$ 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 CytC 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 值 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 (A) 的变化, 测定 2~3 min 的变化值。

(2) 胀破的离体线粒体 CytC 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 值 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 (A) 的测定同上。

5. 线粒体氧吸收速率、呼吸控制率及 ADP/O 的测定

以容积为 2 mL 的反应杯为例。

(1) 先将恒温水浴调至 25°C , 标定仪器的灵敏度 (方法见【附录 3】), 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。

(3) 待斜率稳定后加入适量呼吸底物 (使体系中 α -酮戊二酸浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 或苹果酸 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 或琥珀酸 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。加入呼吸底物后的斜率为呼吸基质存在时的氧吸收速率, 又称状态 II。

(4) 此时再加入 $10 \mu\text{L}$ ADP 时出现较大的斜率, 代表 ADP 促进下的线粒体呼吸速率, 称为状态 III。

(5) 当磷酸化反应的底物 ADP 被耗尽以后, 线粒体氧化吸收速率又自动地降低, 此时的斜率为状态 IV, 再加入 ADP 又回到状态 III, 直至反应液中溶解氧全部耗尽为止。

【结果与计算】

(1) 氧吸收速率

$$\text{氧吸收速率} (\mu\text{molO}_2 \cdot \text{mgN}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = (dl/dt) \times (S/N)$$

式中: dl/dt 为记录斜率 ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$);

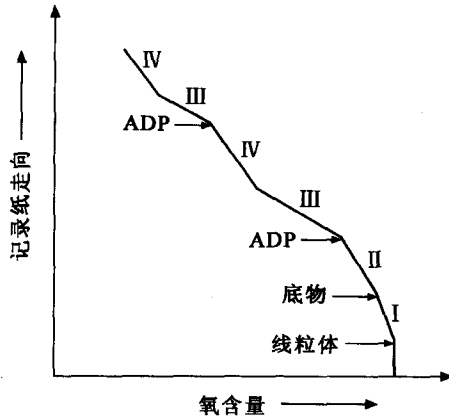


图 1-1 测定线粒体呼吸控制率的记录示意图

S 为灵敏度 ($\mu\text{molO}_2 \cdot \text{cm}^{-1}$);

N 为参与反应的线粒体的蛋白氮 (mg)。

(2) 氧化磷酸化效率 (P/O 或 ADP/O 比值)

状态 III 期间吸收的氧与加入的 ADP 量成正比, 因此 ADP/O 的比值就是加入的 ADP 的 μmol 与此期间实际消耗的氧的 μmol 数的比值。该比值大小反映了线粒体的氧化磷酸化效率。假如测定体系加入 $1 \mu\text{mol}$ ADP, 状态 III 期间耗氧 $0.35 \mu\text{mol}$, 则: $P/O = 1.0/0.35 = 2.86$ 。

(3) 呼吸控制率 (RCR)

呼吸控制率是指 ADP 控制下的氧吸收速率与不受 ADP 控制的氧吸收速率的比值, 亦即状态 III 与状态 IV 的氧吸收速率的比值。例如, 状态 III 时, 记录笔每分钟横向位移 3 cm , 而状态 IV 时, 每分钟位移 1.5 cm , 则 $RCR = 3/1.5 = 2$ 。

RCR 也反映线粒体氧化磷酸化的效率和线粒体膜的完整度。

【注意事项】

植物内源脂肪酸、酚类、醌类物质能引起线粒体功能的抑制, 因此制备时要求:

(1) 溶液中加入螯合剂 (EDTA) 和巯基化合物或聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 降低或去除酚类化合物的毒害作用; 加入 BSA 防止或降低脂肪酸或其他脂类物质的毒害。

(2) 反应介质要现配现用, 在冰箱中也不能久放。

【实验后思考题】

1. 比较状态 I、II、III 在数值上的大小, 并利用学过的知识对此进行解释?

2. 在线粒体的提取洗涤介质、悬浮液、反应液中为什么要加入一定浓度的甘露醇和蔗糖?

实验三 细胞的质壁分离与质壁分离复原

生活细胞的质膜具有选择透性,可与外界溶液构成渗透系统,并可主动的吸收某些溶质,而死细胞的原生质体则完全丧失这些特性。本实验通过对细胞质壁分离和质壁分离复原现象的观察,了解细胞膜的选择透性、黏滞性和荷电性等。

【实验前思考题】

1. 细胞膜有哪些生物功能?水分通过细胞膜运输的途径有哪些?
2. 为什么只有活细胞才能与外界溶液构成渗透系统?

【原理】

中性红是常用的活体染料之一,属于弱碱性 pH 指示剂,变色范围在 pH 值 6.4~8.0 之间,随 pH 值升高由红色变黄色。在中性或微碱性环境中,植物的活细胞能大量吸收中性红并向液泡中排泌,由于液泡在一般情况下呈酸性反应,因此,进入液泡的中性红便解离出大量阳离子而呈现樱桃红色,而原生质和细胞壁一般不着色;死细胞由于原生质变性凝固,液泡破坏,因此,用中性红染色后,不产生液泡着色现象;相反,中性红的阳离子却与带有一定负电荷的原生质及细胞核结合,而使其染色。

活的植物细胞的质膜和液泡膜具有选择透性,因此能与外界溶液构成渗透系统。含有中央大液泡的细胞与外界低渗透势溶液(即低水势溶液)接触时,细胞内的水分外渗,原生质体随着液泡一起收缩而发生原生质体与细胞壁的分离;将已发生质壁分离的细胞与清水或高渗透势溶液(即高水势溶液)接触,原生质体可重新吸水体积扩大而发生质壁分离复原;或将已发生质壁分离的细胞较长时间保留在低水势溶液中时,细胞会吸收外界的溶质,降低细胞水势,原生质体也可重新吸水而发生质壁分离复原。

植物细胞常因原生质和细胞壁结合的紧密程度或原生质的黏性大小而表现不同的质壁分离形式。质壁分离主要有两种形式:凸形和凹形,有时把严重的凹形质壁分离称作痉挛形质壁分离。质壁分离最初由凹形开始,以后或保持这一形式,或逐渐转为凸形。保持凹形质壁分离的时间长短与原生质的黏性关系很大,凡是原生质黏性大的,能维持较长时间的凹形,甚至成为痉挛形,而原生质黏性很低的,则较快地转为凸形质壁分离。

本实验将观察由于 Ca^{2+} 、 K^{+} 对原生质黏性的不同影响而发生的不同形式质壁分离现象。经 Ca^{2+} 处理后,发生凹形质壁分离;经 K^{+} 处理后则发生凸形质壁分离。当用硝酸钾的低渗透势溶液进行长时间质壁分离时,由于细胞质强烈膨胀、变厚,似帽状包围在收缩的液泡两端,因此称为帽状质壁分离。此时能清楚地区别无色透明的原生质和染成红色的液泡。

【材料、仪器与试剂】

1 材料

洋葱鳞茎(或紫鸭跖草叶片)。

2. 仪器及用具

显微镜;载玻片;盖玻片;单面刀片;尖头镊子;小培养皿;吸管;擦镜纸;吸水纸。

3. 试剂

(1)0.03%中性红溶液。

(2)1 mol·L⁻¹硝酸钾溶液。

(3)1 mol·L⁻¹氯化钙溶液。

【方法与步骤】

1. 选取洋葱鳞茎或紫鸭跖草叶片若干块,用刀片在洋葱鳞片内侧或外侧纵横划成 0.5 cm² 左右的小块,用尖头镊子将表皮小块轻轻撕下,立即投入中性红溶液中染色,注意要将表皮内侧向下,5~10 min 后,转移到自来水中浸泡 10~15 min,放在载玻片上,盖好盖玻片,在显微镜下观察,将发现液泡被染成樱桃红色,细胞核和原生质不染色。

2. 从盖玻片的一边滴 1 滴 1 mol·L⁻¹ 硝酸钾溶液而在对边用滤纸吸水,重复两次,将硝酸钾溶液引入盖玻片下使之与材料接触并立即镜检,可看到细胞内发生凸形质壁分离。

3. 观察到质壁分离后,于盖玻片一边小心加清水 1 滴,于对边用滤纸缓缓吸去溶液,速度不可过快,重复两次,使质壁分离剂(硝酸钾溶液)基本上被吸去。镜检,可看到质壁分离停止进行,相反,带有液泡的原生质体开始重新吸水膨大,最后又充满整个细胞腔,这就是质壁分离复原现象。质壁分离复原缓缓进行时,细胞仍会正常存活;如进行很快,则原生质体会发生机械伤害而死亡。

4. 另取一个洋葱表皮制片镜检,从盖玻片的一边滴 1 滴 1 mol·L⁻¹ 氯化钙溶液而在对边用滤纸吸水,重复两次,将氯化钙溶液引入盖玻片下使之与材料接触并立即镜检,可看到细胞内很快发生凹形质壁分离。