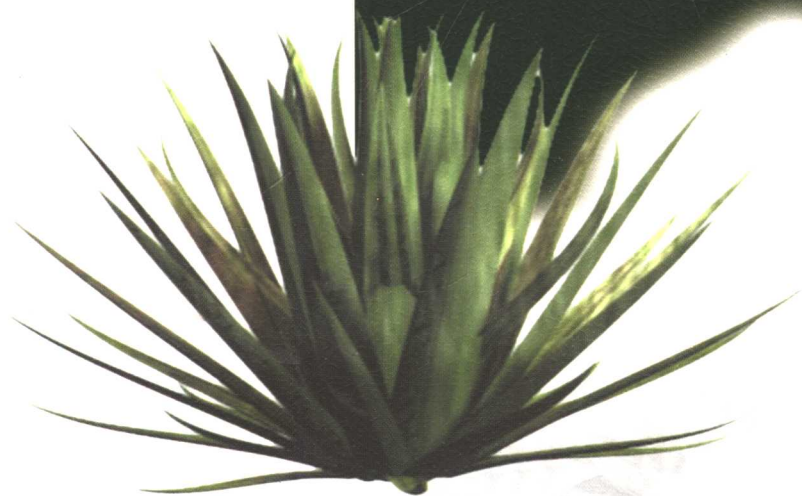


高等学校教材

# 植物

# 生理学 实验技术

郝建军 康宗利 于洋 主编



化学工业出版社

高等学校教材

# 植物生理学实验技术

郝建军 康宗利 于洋 主编



化学工业出版社

·北京·

本书从植物生理学实验的原理、材料、仪器、药品、方法入手,全面系统介绍了植物生理学实验技术,内容涉及植物生理学的各个方面。全书共分9章,包括细胞与信号转导、水分生理、矿质营养、光合作用、呼吸作用、植物生长物质、有机物质运输与转化、植物的生长发育和逆境生理。附录部分包括各种实验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相关专业的本科生和研究生为对象,也可供综合性大学、师范院校的师生和科技人员阅读参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

植物生理学实验技术/郝建军,康宗利,于洋主编.  
北京:化学工业出版社,2006.12

高等学校教材

ISBN 978-7-5025-9757-3

I. 植… II. ①郝…②康…③于… 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(2006)第150941号

---

责任编辑:王文峡

文字编辑:张林爽 刘莉珺

责任校对:周梦华

装帧设计:潘峰

---

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)

印刷:北京云浩印刷有限责任公司

装订:三河市前程装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张13½ 字数320千字 2007年1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:24.00元

版权所有 违者必究

# 编 审 人 员

主 编	郝建军	康宗利	于 洋	
副 主 编	朱延姝	杨玉红	李颖畅	
编写人员	郝建军	康宗利	于 洋	朱延姝
	杨玉红	李颖畅	郝 楠	付淑杰
	刘运正	张丽颖	王 晗	
主 审	张宪政			

## 前 言

植物生理学是研究植物生命活动基本规律的科学，同时，它又是一门实验科学。植物生命活动的基本规律都必须经过实验来验证；由实验研究得到的理性认识要应用到生产实践中去，更需要通过实验来实现——这些都是植物生理学实验技术的主要内容。开设植物生理学实验技术课程的目的是：第一，使学生加深对植物生理学基本原理、基础知识的理解；第二，使学生掌握植物生理学的主要实验技术，为今后的科学研究打下良好的基础；第三，对提高学生分析问题和解决问题的能力，培养严谨的科学态度具有重要的作用。

为了进一步提高植物生理学实验技术这门课程的教学水平，我们参考国内最新的植物生理学实验教材，尽力引进一些先进而成熟的实验技术，按照由浅入深、循序渐进的原则，编成此书。全书共分9章，依次为细胞与信号转导、水分生理、矿质营养、光合作用、呼吸作用、植物生长物质、有机物质运输与转化、植物的生长发育和逆境生理。附录部分包括各种实验常用数据表和常用试剂的配制方法等。

其中第一章由郝建军、康宗利、于洋编写，第二章由杨玉红编写，第三、五章和附录由康宗利编写，第四章由李颖畅编写，第六章由于洋编写，第七、九章由郝建军编写，第八章由朱延姝编写。全书由郝建军和康宗利校正统稿，张宪政审定。郝楠、付淑杰、刘运正、张丽颖、王晗参与了资料的收集、整理工作。

由于编者水平有限，书中存在的缺点和不足敬请读者批评指正。

编 者

2007年1月

# 目 录

<b>第一章 细胞与信号转导</b> .....	1
<b>第一节 细胞壁的制备及羟脯氨酸含量的测定</b> .....	1
一、原理 .....	1
二、材料、仪器、药品 .....	1
三、方法 .....	1
<b>第二节 质膜微囊泡的分离及纯化技术</b> .....	2
一、原理 .....	2
二、材料、仪器、药品 .....	2
三、方法 .....	3
四、注意事项 .....	4
<b>第三节 液泡膜微囊的制备</b> .....	4
一、材料、仪器、药品 .....	4
二、方法 .....	4
三、注意事项 .....	5
<b>第四节 过氧化物酶体的分离</b> .....	5
一、材料、仪器、药品 .....	5
二、方法 .....	5
<b>第五节 乙醛酸循环体的分离</b> .....	6
一、材料、仪器、药品 .....	6
二、方法 .....	7
<b>第六节 脂质体的分离及制备</b> .....	7
一、材料、仪器、药品 .....	7
二、方法 .....	8
三、注意事项 .....	8
<b>第七节 原生质体的分离</b> .....	8
一、材料、仪器 .....	8
二、方法 .....	8
<b>第八节 去液泡原生质体的制备</b> .....	11
一、材料、仪器、药品 .....	11
二、方法 .....	12
<b>第九节 植物细胞 G 蛋白的检测</b> .....	12
一、原理 .....	12
二、材料、仪器、药品 .....	13
三、方法 .....	13
四、注意事项 .....	14
<b>第十节 细胞质中自由钙离子浓度的荧光探针测定法</b> .....	14
一、原理 .....	14
二、材料、仪器、药品 .....	15

三、方法 .....	15
四、注意事项 .....	17
<b>第十一节 叶绿体类囊体膜磷酸酯酶的提取和测定</b> .....	17
一、原理 .....	17
二、材料、仪器、药品 .....	17
三、方法 .....	17
四、注意事项 .....	18
<b>第十二节 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸激酶(NADase)法定量钙调素</b> .....	18
一、原理 .....	18
二、材料、仪器、药品 .....	18
三、方法 .....	18
四、注意事项 .....	20
<b>第十三节 蛋白质磷酸化活性的测定</b> .....	20
一、原理 .....	21
二、材料、仪器、药品 .....	21
三、方法 .....	21
四、注意事项 .....	22
<b>第二章 水分生理</b> .....	23
<b>第一节 植物组织含水量和水分饱和亏的测定</b> .....	23
一、原理 .....	23
二、材料、仪器 .....	23
三、方法 .....	23
四、注意事项 .....	24
<b>第二节 植物组织自由水和束缚水的测定</b> .....	24
一、原理 .....	25
二、材料、仪器、药品 .....	25
三、方法 .....	25
<b>第三节 植物水势的测定</b> .....	26
一、小液流法 .....	26
二、折射仪法 .....	28
三、压力室法 .....	30
四、热电偶湿度计法 .....	31
<b>第四节 植物组织渗透势的测定</b> .....	33
一、冰点下降法 .....	33
二、压力-容积法 .....	35
<b>第五节 植物蒸腾速率的测定</b> .....	36

一、重量法	36	酰胺	58
二、稳态气孔计法	38	二、伤流液中氨基酸总量的测定	59
三、蒸腾仪法	40	三、伤流液中硝态氮的测定	60
第六节 水孔蛋白的检测	43	四、伤流液中无机磷的测定	61
一、原理	43	第九节 硝酸还原酶活性的测定	62
二、仪器设备	43	一、原理	63
三、方法	43	二、材料、仪器、药品	63
四、注意事项	45	三、方法	63
第七节 钾离子对气孔开度的影响	45	四、注意事项	64
一、原理	45	第四章 光合作用	65
二、仪器与药品	45	第一节 叶绿体色素的提取、分离及理化性质	65
三、方法	45	一、原理	65
四、注意事项	45	二、材料、仪器、药品	65
第三章 矿质营养	46	三、方法	66
第一节 植物灰分中矿质元素的鉴定	46	四、注意事项	67
一、原理	46	第二节 叶绿素 a、叶绿素 b 吸收光谱的测定	68
二、材料、仪器、药品	46	一、原理	68
三、方法	47	二、材料、仪器、药品	68
第二节 液泡膜及质膜 $H^+$ -ATPase 活性的测定	47	三、方法	68
一、液泡膜 $H^+$ -ATPase 活性的测定	47	第三节 叶绿素含量的测定	68
二、质膜 $H^+$ -ATPase 活性的测定	49	一、分光光度法	68
第三节 植物的溶液培养及缺素观察	49	二、活体叶绿素仪法	72
一、原理	50	三、注意事项	72
二、材料、仪器、药品	50	第四节 植物光合速率的测定	73
三、方法	50	一、改良半叶法	73
第四节 植物根系对离子的选择吸收	52	二、便携式光合作用系统测定植物净光合速率	74
一、原理	52	三、氧电极法	76
二、材料、仪器、药品	52	第五节 植物叶绿体的分离制备和希尔反应活力的测定	79
三、方法	52	一、植物叶绿体的分离制备	79
第五节 单盐毒害和离子拮抗作用	52	二、希尔反应的测定	80
一、原理	53	第六节 植物光呼吸的测定	82
二、材料、仪器、药品	53	第七节 乙醇酸氧化酶活性的测定	83
三、方法	53	一、原理	83
第六节 植物根系活力的测定	53	二、材料、仪器、药品	83
一、根系总吸收面积与活跃吸收面积的测定(甲烯蓝法)	54	三、方法	83
二、氯化三苯基四氮唑(TTC)法	55	第八节 植物光补偿点和光饱和点的测定	84
第七节 植物伤流液的收集和伤流量的测定	56	第九节 植物 $CO_2$ 饱和点和补偿点的测定	86
一、容积法测定伤流量	56	第十节 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)活性的测定	87
二、重量法测定伤流量	57		
三、注意事项	57		
第八节 伤流液的成分分析	57		
一、纸上层析法鉴定伤流液中氨基酸与			

一、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 羧化活性的测定 .....	87	一、溶剂萃取法 .....	111
二、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧 酶(Rubisco) 加氧活性的测定 .....	88	二、薄层色谱法分离纯化 .....	113
第十一节 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性 的测定 .....	89	三、C <sub>18</sub> 胶柱分离法 .....	114
<b>第五章 呼吸作用</b> .....	92	第二节 植物激素的物理化学测定 .....	115
第一节 植物呼吸速率的测定 .....	92	一、赤霉素的高效液相色谱测定 .....	115
一、中和法 .....	92	二、细胞分裂素的气相色谱测定 .....	117
二、红外仪法 .....	94	三、乙烯的气相色谱测定 .....	118
三、测氧法 .....	95	第三节 植物激素的生物检测 .....	119
第二节 呼吸商的测定 .....	95	一、生长素的生物试法——小麦芽鞘 切段法 .....	119
一、原理 .....	96	二、细胞分裂素的生物试法——苋红素 合成法 .....	120
二、材料、仪器、药品 .....	96	三、赤霉素的生物试法——水稻幼 苗法 .....	121
三、方法 .....	96	四、脱落酸的生物试法——气孔开 度法 .....	122
第三节 植物线粒体的分离制备及其活性 的测定 .....	96	五、乙烯的生物试法——“三重反 应”法 .....	123
一、原理 .....	96	第四节 植物激素的免疫测定 .....	124
二、材料、仪器、药品 .....	97	一、脱落酸的放射免疫测定 (ABA RTA) .....	124
三、方法 .....	97	二、酶联免疫吸附测定植物激素含量 ..	128
第四节 植物呼吸酶活性的测定 .....	98	第五节 植物生长调节剂生理效应的 测定 .....	133
一、滴定法测定抗坏血酸氧化酶和多酚 氧化酶活性 .....	98	一、萘乙酸生理效应的测定——小麦 种子培养法 .....	134
二、比色法测定多酚氧化酶活性 .....	100	二、乙烯利生理效应的测定——棉花 子叶脱落法 .....	135
第五节 过氧化物酶活性的测定 .....	101	<b>第七章 有机物质运输与转化</b> .....	136
一、原理 .....	101	第一节 植物组织中碳水化合物的系统 测定 .....	136
二、材料、仪器、药品 .....	102	一、原理 .....	136
三、方法 .....	102	二、材料、仪器、药品 .....	136
第六节 过氧化氢酶活性的测定 .....	102	三、方法 .....	137
一、滴定法 .....	102	第二节 植物组织中可溶性糖含量的测定 (蒽酮法) .....	141
二、氧电极法 .....	103	一、原理 .....	141
第七节 淀粉酶活性的测定 .....	104	二、材料、仪器、药品 .....	141
一、原理 .....	104	三、方法 .....	142
二、材料、仪器、药品 .....	104	第三节 应用 <sup>32</sup> P 测定磷在植物体内的 运输与分布 .....	142
三、方法 .....	105	一、原理 .....	142
第八节 植物磷酸化酶的测定 .....	106	二、材料、仪器、药品 .....	143
一、比色法 .....	106	三、方法 .....	143
二、分光光度法 .....	107	四、注意事项 .....	143
第九节 植物体内可溶性蛋白质含量的测 定(考马斯亮蓝法) .....	107		
一、原理 .....	107		
二、材料、仪器与药品 .....	108		
三、方法 .....	108		
<b>第六章 植物生长物质</b> .....	110		
第一节 植物激素的提取、分离与纯化 ..	110		



第四节 谷类作物种子中赖氨酸含量的测定 .....	143	二、材料、仪器、药品 .....	164
一、原理 .....	144	三、方法 .....	164
二、材料、仪器、药品 .....	144	第七节 花色素苷的提取纯化及光谱分析 .....	165
三、方法 .....	144	一、原理 .....	166
第五节 果实、蔬菜中有机酸含量的测定 .....	145	二、材料、仪器、药品 .....	166
一、原理 .....	145	三、方法 .....	166
二、材料、仪器、药品 .....	145	第八节 光敏色素的提取纯化及测定 .....	167
三、方法 .....	145	一、原理 .....	167
第六节 谷物中蛋白质含量的快速测定 .....	146	二、材料、仪器、药品 .....	167
一、原理 .....	146	三、方法 .....	167
二、材料、仪器、药品 .....	146	<b>第九章 逆境生理</b> .....	169
三、方法 .....	147	第一节 植物细胞膜透性的测定 .....	169
第七节 黄酮和异黄酮含量的测定 .....	147	一、原理 .....	169
一、黄酮含量的测定 .....	147	二、材料、仪器、药品 .....	169
二、异黄酮含量的测定 .....	148	三、方法 .....	169
<b>第八章 植物的生长发育</b> .....	150	四、注意事项 .....	172
第一节 种子生活力的快速测定 .....	150	第二节 植物膜脂脂肪酸的分析 .....	173
一、TTC 染色法(氯化三苯基四氮唑法, 四唑法) .....	150	一、仪器设备 .....	174
二、红墨水染色法 .....	152	二、操作方法 .....	174
三、溴麝香草酚蓝法(BTB法) .....	153	三、注意事项 .....	174
四、荧光法 .....	153	第三节 游离脯氨酸含量的测定 .....	175
第二节 温度、激活剂、抑制剂对淀粉酶活性的影响 .....	154	一、原理 .....	175
一、原理 .....	154	二、材料、仪器、药品 .....	175
二、材料、仪器、药品 .....	155	三、方法 .....	175
三、方法 .....	155	四、注意事项 .....	176
第三节 植物衰老指标的测定 .....	155	第四节 甜菜碱含量的测定(比色法) .....	176
一、超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 .....	156	一、原理 .....	176
二、丙二醛含量的测定 .....	159	二、材料、仪器、药品 .....	177
三、植物体内氧化型和还原型谷胱甘肽含量的测定 .....	160	三、方法 .....	177
第四节 植物组织培养技术 .....	162	第五节 植物材料中 $O_2^-$ 产生速率的测定 .....	177
一、原理 .....	162	一、原理 .....	177
二、材料、仪器、药品 .....	162	二、材料、仪器、药品 .....	178
三、方法 .....	162	三、方法 .....	178
第五节 种子萌发时蛋白质的转化 .....	163	第六节 植物组织中ATP含量的测定 .....	179
一、原理 .....	163	一、原理 .....	179
二、材料、仪器、药品 .....	163	二、材料、仪器、药品 .....	180
三、方法 .....	163	三、方法 .....	180
第六节 脂肪酶活性的测定 .....	164	四、注意事项 .....	181
一、原理 .....	164	第七节 植物组织中抗坏血酸含量的测定 .....	182
二、材料、仪器、药品 .....	164	一、分光光度计法 .....	182
三、方法 .....	164	二、2,6-二氯酚靛酚法 .....	183
四、注意事项 .....	164	第八节 热激蛋白的分离纯化 .....	185

一、材料、仪器、药品 .....	185	四、各种冷却剂的组成及冷却效果表 ...	197
二、方法 .....	186	五、酸碱指示剂 .....	198
三、注意事项 .....	187	六、离心机转数 (RPM) 与离心力 (G)	
第九节 盐胁迫蛋白的测定 .....	187	的换算 .....	199
一、材料、仪器、药品 .....	187	七、光的能量单位之间的关系 .....	200
二、方法 .....	188	八、植物组织培养常用的几种基本	
<b>附录</b> .....	190	培养基 .....	200
一、试剂的配制 .....	190	九、常用计量单位及其换算 .....	202
二、易变质及需要特殊方法保存的		十、仪器的保养 .....	204
试剂 .....	193	<b>参考文献</b> .....	205
三、常用缓冲液的配制 .....	193		

# 第一章 细胞与信号转导

细胞是构成植物体结构与功能的基本单位，植物细胞的机械支持由细胞壁决定，植物细胞的功能由原生质决定，通过对细胞进行匀浆化、分级分离、生理生化测定分析，研究细胞壁、细胞内各种细胞器的生理作用，对了解植物细胞及植物体的生命活动规律具有重要意义。

## 第一节 细胞壁的制备及羟脯氨酸含量的测定

细胞壁结构和功能的关系研究越来越被人们所重视。伸展蛋白是植物细胞壁中一类重要的结构蛋白，与细胞壁的精细结构及各种生理功能密切相关。其特点之一是它的羟脯氨酸(Hyp)含量高达30%~40%。因此，细胞壁的制备及Hyp含量的分析是细胞壁及其蛋白质研究中最基本又极重要的内容。

### 一、原理

Hyp在高溴酸钠氧化下形成吡咯化合物，后者在酸性条件下，与对二甲氨基苯甲醛在70℃时生成玫瑰红色物质，该物质可用分光光度计在560nm处进行定量测定。当Hyp在1~20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内，光吸收值和Hyp含量有良好的线性关系。

### 二、材料、仪器、药品

(1) 材料 菜豆荚、芹菜叶柄或其他植物材料。

(2) 仪器 高速组织捣碎机；恒温水浴；751-G型或722型分光光度计；耐酸过滤漏斗(G2)；冰冻干燥机；台式离心机。

(3) 药品 ①Hyp标准液：100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。②高溴酸钠( $\text{NaBrO}_4$ )。a. 母液：取3.2mL溴加于50mL冷的5%NaOH溶液中，4℃保存；b. 稀释液：取20mL  $\text{NaBrO}_4$ 母液于94mL冷的5%NaOH溶液中，4℃保存，保存期3~4周。③对二甲氨基苯甲醛：5%对二甲氨基苯甲醛的正丙醇溶液。④6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl。⑤1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl。

### 三、方法

(1) Hyp标准曲线的绘制 选择干净试管5支，按表1-1加入各试剂，混匀后于70℃恒温水浴中保温15min，取出冷却至室温，在560nm处测光密度值。以光密度值(OD)为纵坐标，Hyp含量为横坐标，绘制标准曲线。

(2) 细胞壁的制备 取芹菜叶柄100g，加200mL 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl，在组织捣碎机中以最高速度将植物材料捣碎(3min×3)，用纱布过滤，除去大块细胞团，滤液(镜检无完整细胞)在4℃下静置过夜，再经耐酸滤过漏斗抽滤，残渣经1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl反复洗涤，直至用紫外分光光度计检测洗出液无蛋白为止。最后用蒸馏水反复抽滤洗涤残渣。除

表 1-1 Hyp 标准溶液配制

加入试剂	试管 1	试管 2	试管 3	试管 4	试管 5
NaBrO <sub>4</sub> /mL	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
Hyp/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8
HCl/mL	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
水/mL	0.8	0.6	0.4	0.2	0
对二甲氨基苯甲醛/mL	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
Hyp 浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0	5	10	15	20

去盐类（可用电导仪监测），所得残渣经冰冻干燥后为细胞壁制品。

(3) 植物细胞壁中 Hyp 含量的测定 准确称量适量细胞壁制品（根据细胞壁中 Hyp 含量决定细胞壁制品的用量）放入水解管，加入  $6\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl，在  $110^\circ\text{C}$  下水解 18h。氮气吹干或  $50^\circ\text{C}$  下抽干水解液，用少量蒸馏水洗涤水解物并吹干或抽干，最后用蒸馏水将水解物定容到 1mL，经台式离心机离心，除去沉淀后，取上清液 0.5mL（如样品中 Hyp 含量太高，则取其稀释液 0.5mL）进行测定，以下操作过程同标准曲线的制作。

(4) Hyp 含量的计算

$$\text{干细胞壁样品 Hyp 含量}(\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}) = C \times V \times A / W$$

式中，C 为从标准曲线查得反应体系中 Hyp 含量， $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；V 为反应体系（测定液）体积，mL；A 为稀释倍数（样品总量/用于测定量）；W 为干细胞壁样品质量，mg。

## 第二节 质膜微囊泡的分离及纯化技术

分离质膜微囊泡，研究不同植物组织及不同环境下质膜结构、组成、功能的变化，对于探讨植物和环境的相互作用，尤其是逆境条件下植物自身的保护机制，具有重要意义。

### 一、原理

利用大分子多聚物在一定浓度下相互不溶，组成含 85% 水的两相，即可用来进行生物大分子的分离纯化。常用的大分子多聚物是葡聚糖和聚乙二醇（PEG）。在以葡聚糖和聚乙二醇组成的水性两相中，由于密度和分子表面极性特征不同，质膜主要存在于聚乙二醇上相中。将一定量粗提质膜溶液加入到样品系统液中，充分混合两相，待分层清晰后，分离两相，然后分别用相同体积的另一相洗涤，多次重复，以逐步纯化质膜。

### 二、材料、仪器、药品

(1) 材料 烟草叶片。

(2) 仪器 超速离心机、匀浆器或研钵等。

(3) 药品 ①匀浆液： $15\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-MES (pH7.8)， $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA， $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖，6g/L PVP（聚乙烯吡咯烷酮）， $1\text{mmol}$  PMSF（苯甲基磺酰氟）， $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT（二硫苏糖醇）。②悬浮液： $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液（pH 7.8）， $0.1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-MES（2-N-吗啡啉乙磺酸，pH 7.8）， $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT。③样品系统液：含  $64\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  聚乙二醇-3350， $64\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  葡聚糖 T-500， $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖， $4.7\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液（pH 6.8）。④洗涤系统液：含  $64\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  聚乙二醇-3350， $64\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  葡聚糖

T-500,  $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖,  $4.7\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH 6.8)。样品系统液和洗涤系统液的制备依照表 1-2 所示进行。

表 1-2 分离质膜的样品系统液和洗涤系统液的配制

母液	样品系统液	洗涤系统液
$200\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡聚糖 T-500	5.12g	5.12g
$400\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 聚乙二醇-3350	2.56g	2.56g
蔗糖 ( $1.00\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	4.00mL	4.00mL
$200\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{PO}_4$ (pH6.8)	$375\mu\text{L}$	$375\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$	15.0g	15.0g
膜[悬浮在 $5.0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{PO}_4$ (pH 6.8)]	1.0g	

### 三、方法

(1) 质膜的提取 取一定量的烟草叶片置研钵中, 加入少量的液氮使之变脆, 按  $2\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$  (以组织质量计) 加入匀浆液和加少许石英砂快速研磨。4 层纱布过滤, 采用差速离心的方法使质膜富集,  $10000g$  离心 15min 除去组织和细胞器, 上清液  $80000g$  离心 30min, 收集沉淀, 加悬浮液, 由于此溶液中不含渗透保护剂蔗糖, 溶液渗透势降低, 从而使包在膜微囊中的膜释放出来, 成为粗提质膜。

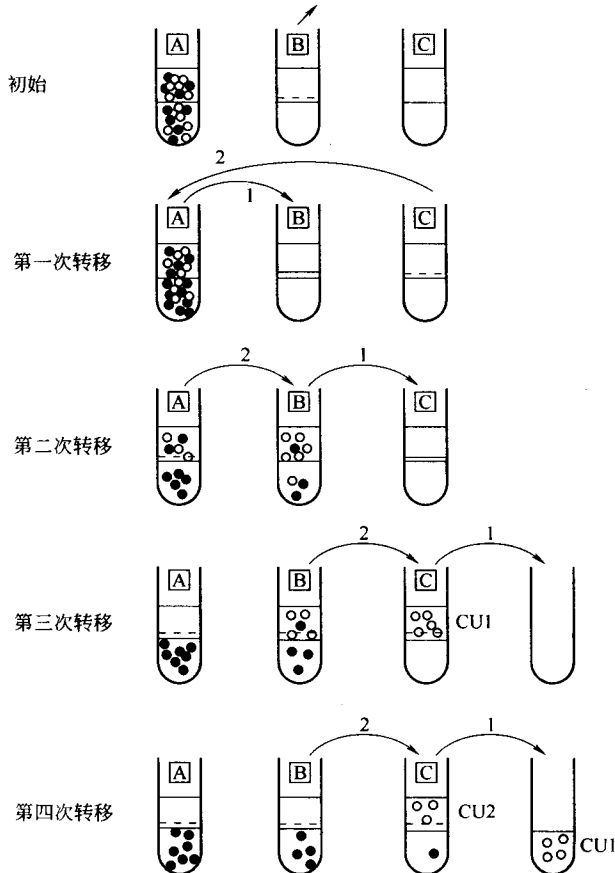


图 1-1 两相法纯化质膜程序

(2) 水性两相法纯化质膜 按粗提质膜与样品系统液体积为 1:15 的比例充分混合, 另外准备同样体积的充分混合的两份洗涤系统液 (按表 1-2 方法配制, 混合时上下反转多次), 分别放在 3 支离心管中。1000g 离心 5min, 将上相 (PEG) 和下相 (葡聚糖 T-500) 分层。具体纯化程序按图 1-1 进行。图 1-1 中空点代表质膜, 实心点代表杂膜。第一次转移时, 将 A 管上相 90% 的液体转移到去掉 90% 上相的 B 管, 然后将 C 管 90% 的上相转移到 A 管, 充分混合后离心分相。第二次转移时, 将 B 管 90% 上相转移到 C 管, 将 A 管 90% 的上相转移到 B 管, 弃 A 溶液, 离心分相。第三次转移时将 C 管 90% 上相 (CU1) 转移到收集管, 将 B 管 90% 上相转移到 C 管, 离心分相。第四次转移时将 C 管 90% 上相 (CU2) 转移到收集管。

在将上相质膜沉淀时, 需将上相稀释 3~5 倍, 120000g 离心 30min, 收集沉淀。如果纯化质膜得率较低, 为了使样品不损失, 可将下相稀释 8~10 倍离心, 收集沉淀。合并两次沉淀, 加悬浮液 [ $215\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-MES (pH 7.8),  $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT,  $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖] 用玻璃匀浆器匀浆, 此为纯化质膜。纯化质膜按每次需要量分装, 保存于液氮中备用。

#### 四、注意事项

- (1) 纱布过滤时为防止污染, 需戴一次性塑料手套。
- (2) 粗提质膜的浓度不宜太大, 否则易产生沉淀, 影响纯化, 一般蛋白含量在  $1 \sim 5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围为宜。
- (3) 质膜纯化后需检测纯度, 即测定不同膜特异性酶抑制剂存在下的酶活。

### 第三节 液泡膜微囊的制备

液泡是植物细胞内多种无机离子及小分子有机化合物的储存库。对液泡膜上各种物质转运载体 (carrier)、离子通道 (channel) 以及液泡型  $\text{H}^+$ -ATPase 和  $\text{H}^+$ -PPase 活性的研究都需要进行液泡膜微囊的制备。

#### 一、材料、仪器、药品

- (1) 材料 具有液泡的植物组织均可。
- (2) 仪器 高速和超速离心机、玻璃匀浆器、过滤用尼龙纱布等。
- (3) 药品 ①匀浆缓冲液:  $30\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HEPES-Tris 缓冲液 (pH 7.5), 内含  $250\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘露醇,  $5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA (牛血清蛋白), 10% 甘油,  $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  PMSF,  $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EGTA [乙二醇双(2-氨基乙基)醚四乙酸],  $2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT, 10% PVPK-30,  $4^\circ\text{C}$  预冷。②悬浮缓冲液:  $6\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HEPES-Tris 缓冲液 (pH 7.5), 内含 10% 甘油,  $250\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘露醇,  $2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT,  $0.1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  PMSF。

#### 二、方法

(1) 具有液泡的植物组织均可用来制备液泡膜微囊, 但是应该避免采用那些组织坚硬、细胞壁老化及含有叶绿体的材料。一般将萌发种子置于暗或  $150\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  的弱光照下通气培养, 光照时间  $12\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ , 温度  $25^\circ\text{C}$ , 相对湿度 60%~70%。培养液为

1/10 浓度的 Hoagland 营养液。采用幼苗根尖部位的组织。

(2) 取植物幼根 20g 用蒸馏水冲洗干净, 以每克植物幼根加入 10mL 匀浆缓冲液, 快速匀浆后, 4 层纱布过滤, 滤液以 480g 离心 10min, 上清液以 6000g 离心 10min, 取上清液 60000g 离心 30min, 取沉淀以预冷的悬浮缓冲液悬浮。悬浮液铺于 6% 葡聚糖 T-70 的离心管中进行梯度离心, 70000g 离心 2h, 收集 0~6% 的界面, 即为液泡膜微囊制剂, 然后于 -70℃ 或液氮中保存 (在操作中, 样品应置于冰浴条件下)。

### 三、注意事项

(1) 根部通气是材料培养过程中所必需的。通气状况良好则根部发达、根质白嫩, 所提液泡膜微囊酶活性及 H<sup>+</sup> 转运活性较高。

(2) 如需测定液泡膜微囊 H<sup>+</sup> 转运活性, 最好是制备后立即进行, 随着保存时间的延长 H<sup>+</sup> 转运活性下降。

(3) 该方法制备的液泡膜微囊有原位微囊 (right-side-out vesicles) 和反转微囊 (in-side-out vesicles), 由于液泡膜上一些酶位于液泡膜的内侧, 因此在测定液泡膜蛋白含量及酶活性时, 应加入 0.1% (体积分数) Triton X-100, 以使测定值反映总的含量和酶活性。

## 第四节 过氧化物酶体的分离

过氧化物酶体 (peroxisomes) 是只具一层膜的细胞器, 光呼吸途径的主要部分定位于其中。在生理渗透压条件下获得完整的过氧化物酶体, 对研究其代谢、生物发生、膜透性和物质运输以及光呼吸机制都是十分重要的。

### 一、材料、仪器、药品

(1) 材料 菠菜叶片或其他叶片材料。

(2) 仪器 Beckman 高速离心机、带离心头 SW27、分光光度计、梯度混合器等。

(3) 药品 ① 研磨介质: 蔗糖 0.35mol · L<sup>-1</sup>, DTT 2mmol · L<sup>-1</sup>, Tricine-KOH (pH 7.5) 0.15mol · L<sup>-1</sup>。② 蔗糖 0.4mol · L<sup>-1</sup>。③ Percoll (二氧化硅溶胶)。④ 0.21 和 0.25mol · L<sup>-1</sup> 蔗糖 (含 1mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸钾盐缓冲液, pH 7.5)。⑤ 0.1mol · L<sup>-1</sup> 磷酸钾缓冲液 (pH 6.7)。⑥ 0.14mmol · L<sup>-1</sup> NADH。⑦ 5mmol · L<sup>-1</sup> 羟基丙酮酸。⑧ 5% Triton X-100。⑨ 13μmol · L<sup>-1</sup> 细胞色素 C [溶解在 0.1mol · L<sup>-1</sup> 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0), 加入少许固体联二亚硫酸钠, 轻摇, 颜色由红变为浅红黄]。⑩ 14mmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

### 二、方法

(1) 过氧化物酶体的分离 在 4℃ 下进行。取 10g 菠菜叶片, 洗净, 去中脉, 剪成小片, 按 4mL · g<sup>-1</sup> 加入研磨介质, 在研钵中温和地进行研磨。匀浆用 8 层纱布过滤后于 1000g 离心 10min, 上清液于 10000g 再离心 10min, 沉淀悬浮于 1.2mL 研磨介质, 并将其铺于 Percoll 梯度上, 每管 0.6mL, 共 4 管。Percoll 梯度含蔗糖 0.4mol · L<sup>-1</sup> 和 10mmol · L<sup>-1</sup> Tricine-KOH (pH 7.5) 的 0 和 70% 的硅溶胶各 15mL, 用梯度混合器组成 0~70% 的连续 Percoll 梯度于一个透明的离心管中, 梯度于 Beckman 离心头 SW27 中

10000r · min<sup>-1</sup> 离心 10min, 离心时间包括加速和减速耗时在内, 减速时加刹闸。

将梯度取出, 用针将梯度管底部刺穿一小孔进行分部收集, 每管 1mL。测定每管过氧化氢酶活性。将含过氧化氢酶活性峰的管及其相邻的 3 管合并, 并与 4 倍体积的 0.21mol · L<sup>-1</sup> 蔗糖 (含 1mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸钾盐缓冲液, pH 7.5) 混合, 于 15000g 离心 15min。用吸管将上清液除去, 留下约 0.5mL。轻轻摇动使沉淀充分散开。加入 0.25mol · L<sup>-1</sup> 蔗糖 (含 1mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸钾盐缓冲液, pH 7.5) 12mL, 于 15000g 离心 15min 洗涤细胞器 1 次。洗涤手续重复 1 次。所得沉淀溶解在少量 0.25mol · L<sup>-1</sup> 蔗糖 (含 1mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸钾盐缓冲液, pH 7.5) 中。4 个 Percoll 梯度可获得过氧化物酶体蛋白约 1mg, 完整性高于 90%, 没有叶绿体和线粒体污染。在 4°C 或 25°C 稳定至少 2h。

(2) 完整性的测定 过氧化物酶体完整性用羟基丙酮酸还原酶活性检测法确定。羟基丙酮酸还原酶活性用光谱法于 340nm 监测 NADH 氧化。在 1mL 反应混合物中, 含 0.1mol · L<sup>-1</sup> 磷酸钾盐缓冲液 (pH 6.7), 0.14mmol · L<sup>-1</sup> NADH, 5mmol · L<sup>-1</sup> 羟基丙酮酸和 0.4mol · L<sup>-1</sup> 蔗糖和过氧化物酶体。反应由加入羟基丙酮酸启动。在反应达到稳定速度后, 加入 50μL 5% Triton X-100 并继续监测活性。有 Triton 存在时的活性代表过氧化物酶体制剂的总活性。没有 Triton 存在时的活性代表已破碎的过氧化物酶体活性。制剂中过氧化物酶体完整性为:

$$\frac{\text{过氧化物酶体总活性} - \text{破碎的过氧化物酶体总活性}}{\text{总活性}} \times 100\% = \text{过氧化物酶体的完整性}$$

NADH 在 340nm 的摩尔吸光系数为  $6.2 \times 10^3$ 。

(3) 细胞色素氧化酶活性的测定 细胞色素氧化酶为线粒体标记酶, 测定其在过氧化物酶体制剂中的活性是为了确定分离制剂的纯度。细胞色素氧化酶活性用光谱法于 550nm 测定细胞色素 C 的氧化确定。在 1mL 反应混合物中含 0.1mol · L<sup>-1</sup> 磷酸钾盐缓冲液 (pH 7.0), 13μmol · L<sup>-1</sup> 细胞色素 C [溶解在 0.1mol · L<sup>-1</sup> 磷酸钾盐缓冲液 (pH 7.0), 加入少许固体联二亚硫酸钠, 轻摇, 颜色由红变为浅红黄], 50μL 5% 的 Triton X-100 和过氧化物酶体制剂。反应由加入细胞色素 C 启动。记录 550nm 的吸光度变化, 即可计算出细胞色素氧化酶的活性。细胞色素 C (马心制剂 Type III) 在 550nm 的摩尔吸光系数为  $1.3 \times 10^5$ 。

(4) 过氧化氢酶活性测定 过氧化氢酶是过氧化物酶体的标记酶, 测定其活性是为了确定过氧化物酶体在分部收集样品中的位置。过氧化氢酶活性用光谱法在 240nm 测定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的分解确定。在 1mL 反应混合物中, 含 0.1mol · L<sup>-1</sup> 磷酸钾盐缓冲液 (pH 7.0), 14mmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和过氧化物酶体制剂。反应由加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 启动, 测定 240nm 处吸光度的变化, 计算过氧化物酶的活性。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 240nm 处的摩尔吸光系数为  $3.6 \times 10^1$ 。

## 第五节 乙醛酸循环体的分离

乙醛酸循环体 (glyoxysomes) 是过氧化物酶体的一种, 乙醛酸循环主要定位于其中, 是脂肪代谢的重要细胞器。在生理水势条件下分离完整的乙醛酸循环体, 对研究其代谢和形成, 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。

### 一、材料、仪器、药品

(1) 材料 取 25°C 暗发芽 5d 的蓖麻子叶为材料。



(2) 仪器 高速离心机、分光光度计。

(3) 药品 ①研磨介质：含蔗糖  $0.4\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，K-HEPES (pH 7.5) 缓冲液  $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，BSA 0.1%，PVP 1%，EDTA- $\text{Na}_2$   $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。② $0.21\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖：含  $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HEPES (pH 7.5) 的  $0.21\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖。③ $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖：含  $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HEPES (pH 7.5) 的  $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖。

## 二、方法

(1) 乙醛酸循环体的分离 所有操作均在  $4^\circ\text{C}$  下进行。将剥离的蓖麻子叶洗净，取 15g 放在培养皿中，加 35mL 研磨介质缓冲液，用单面刀片将其充分剁碎，再用研钵细心温和地研磨至糊状，用一层孔径为  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$  的尼龙布过滤，滤液于  $1000g$  离心 10min，得到的上清液再于  $10000g$  离心 10min。沉淀加入  $10\sim 15\text{mL}$  洗涤介质悬浮，于  $10000g$  离心 10min 洗涤 1 次，沉淀悬浮于 1mL 洗涤介质。洗涤介质与研磨介质相同，但不加 PVP。

1mL 洗涤过的沉淀悬浮物铺在 Percoll 梯度上。梯度于  $25000g$  离心 45min。用针将梯度管底部刺一小孔，从底部进行分管收集，每管 1.5mL。测定每管过氧化氢酶和细胞色素氧化酶的活性。过氧化氢酶活性在梯度上部和下部形成两个活性峰，上部峰较小，没有细胞色素氧化酶活性，下部峰较高，但与细胞色素氧化酶活性有重叠。取上部含过氧化氢酶活性峰管及其邻近 7 管合并，加入 4 倍体积的  $0.21\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 [含  $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HEPES (pH 7.5) 的  $0.21\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖]，小心混合，于  $10000g$  离心 10min，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  $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 [含  $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HEPES (pH 7.5) 的  $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖]，于  $10000g$  离心 10min 进行洗涤。离心沉淀重复 1 次。沉淀溶解于  $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 [含  $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HEPES (pH 7.5) 的  $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖] 中为乙醛酸循环体制剂。

(2) 乙醛酸循环体完整性测定 将乙醛酸循环体制剂铺在 5mL  $0.4\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖垫上，于  $10000g$  离心 15min，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，沉淀悬浮于含  $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HEPES (pH 7.5) 的  $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖中。分别测定糖垫和沉淀的过氧化氢酶活性，计算乙醛酸循环体的完整性：

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

(3) 过氧化氢酶活性和细胞色素氧化酶活性测定 参见本章第四节。

## 第六节 脂质体的分离及制备

脂质体 (油体, lipid bodies, spherosomes, oleosomes) 为细胞中储存油脂的细胞器，直径约  $1\mu\text{m}$ ，外面为单层膜，为已知植物细胞中结构最简单的细胞器，膜上有脂肪水解酶类及某些特殊的蛋白质。在研究膜结构及脂肪代谢时，常需制备脂质体。

### 一、材料、仪器、药品

(1) 材料 油料种子或其他脂肪含量较高的植物材料。