

现代植物生理学实验指南

中国科学院上海植物生理研究所 编
上海市植物生理学会

科学出版社

内 容 简 介

本书是全国各地从事植物生理学及相关学科研究或教学的专家以及有实践经验的技术人员,根据自己的工作经验,并结合国际最新实验技术的进展撰写而成的。内容比较系统、全面,既适应当前分子生物学的发展状况,又顾及整体和细胞水平研究的需要,并适当介绍一些生产中与植物生理学有关的应用技术。全书共13章(另加附录),包括细胞生理、植物的离体培养、水分生理和矿质营养、光合作用、呼吸和碳水化合物代谢、氮代谢、脂类代谢、次生物质代谢、生长与发育、植物激素、环境和抗性生理、分子生物学和现代农业技术等。本书可供植物生理学及相关学科的专业研究、教学和从事检测分析的有关工作等各方面人员,以及大专院校的学生和研究生参考备用。

现代植物生理学实验指南

中国科学院上海植物生理研究所
上海市植物生理学会 编

责任编辑 范淑琴 梁淑文

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

江苏省句容市排印厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1999年12月第一版 开本:787×1092 1/16

1999年12月第一次印刷 印张:27 1/4

印数:1-3000 字数:615 000

ISBN 7-03-008099-8/Q·929

定价:48.00元

目 录

前言

第 1 章 细胞生理	(1)
1-1 一些细胞器的分离	(1)
1-1.1 离体叶绿体的制备	(1)
1-1.1.1 破碎叶绿体的制备	(1)
1-1.1.2 完整叶绿体的制备	(2)
1-1.2 质膜微囊泡的分离及纯化技术	(3)
1-1.3 液泡膜微囊的制备	(5)
1-1.4 过氧化物酶体的分离	(6)
1-1.5 乙醛酸循环体的分离	(8)
1-1.6 脂质体的分离及制备	(9)
1-2 原生质体的分离	(10)
1-3 去液泡原生质体的制备	(13)
1-4 细胞突变体的诱发、选择和鉴定	(14)
1-4.1 用低浓度 <i>N</i> -乙基- <i>N</i> -亚硝基脲(ENU)诱变烟草原生质体,筛选 抗氯酸盐和硝酸还原酶缺陷突变体	(14)
1-4.2 紫外线(UV)诱变烟草叶肉原生质体筛选抗缬氨酸突变体	(15)
1-5 细胞生物学研究中的流式细胞技术	(17)
1-5.1 测定细胞周期	(18)
1-5.2 测定细胞内游离 Ca^{2+}	(20)
1-5.3 测定细胞内蛋白质含量	(21)
1-5.4 测量同一细胞中的蛋白质和核酸	(22)
第 2 章 植物的离体培养	(23)
2-1 胡萝卜体细胞培养	(23)
2-2 离体根培养	(24)
2-2.1 番茄或紫花苜蓿的离体根尖的培养法	(24)
2-2.2 水稻离体根段上的胚胎发生	(26)
2-3 茎尖培养和脱毒	(26)
2-3.1 菊花生长点培养法(目的:脱病毒)	(27)
2-3.2 杜鹃花的芽培养法(目的:丛芽繁殖)	(28)
2-4 花器官和叶片的培养	(29)
2-4.1 花器官培养	(29)

2-4.2	叶片培养	(30)
2-5	胚培养	(30)
2-5.1	无核葡萄胚培养(液-固两步培养的工作流程)	(31)
2-5.2	水稻幼胚培养	(32)
2-6	胚乳培养	(32)
2-7	薄层细胞培养	(34)
2-8	小孢子培养	(35)
2-9	悬浮细胞培养	(37)
2-10	原生质体培养	(38)
2-10.1	水稻原生质体的分离及培养	(40)
2-10.2	原生质体存活率、密度及产量的测定	(41)
2-10.3	原生质体植板率的测定	(42)
2-11	原生质体融合	(43)
2-11.1	植物原生质体的 PEG 融合技术	(43)
2-11.2	植物原生质体电融合	(46)
2-11.3	碘乙酸-罗丹明原生质体融合筛选体系的建立及杂交后代的鉴定	(47)
2-12	植物的无性快繁技术	(49)
2-12.1	由叶组织诱导不定芽——非洲紫罗兰的快速繁殖	(51)
2-12.2	由腋芽诱导丛生芽——薄荷的快速繁殖	(52)
2-12.3	甘蓝下胚轴通过愈伤组织培养再诱导产生不定芽	(52)
2-12.4	日本茄 F ₁ 离体快速繁殖	(53)
2-13	离体培养条件下的花芽分化	(54)
第3章	水分生理和矿质营养	(55)
3-1	水势的测定	(55)
3-1.1	压力室法	(55)
3-1.2	热电偶湿度计法	(56)
3-2	水分利用效率(WUE)的测定	(58)
3-2.1	单叶水分利用效率	(58)
3-2.2	个体或群体水分利用效率	(59)
3-2.2.1	盆栽法	(59)
3-2.2.2	碳同位素辨别率法	(59)
3.3	蒸腾速率的测定	(60)
3-3.1	气孔蒸腾的测定	(60)
3-3.2	角质层蒸腾的测定	(63)
3-3.2.1	用稳态气孔计测算角质层蒸腾	(63)
3-3.2.2	离体叶片连续称重同步测定气孔和角质层蒸腾	(64)

3-4	植物根系对离子的吸收和运输	(66)
3-4.1	液泡膜 H^+ - ATPase 活性的测定	(66)
3-4.2	质膜 H^+ - ATPase 活性的测定	(67)
3-4.3	测定植物全细胞跨膜钾离子流的膜片钳技术(以蚕豆保卫细胞原生质体为例)	(68)
3-4.4	用平面脂双层技术测定离子通道活性	(71)
3-5	植物的溶液培养及微量元素培养	(74)
3-6	水孔蛋白的检测	(78)
3-6.1	水渗透性检测法	(78)
3-6.2	水扩散透性检测法	(80)
第4章	光合作用	(83)
4-1	叶片光合速率的测定	(83)
4-1.1	气流法测定叶片的光合速率	(83)
4-1.2	氧电极法测定叶片的光合作用放氧	(86)
4-1.3	改进干重法测定光合作用速率	(87)
4-2	叶片表观光合量子效率的测定	(89)
4-3	光呼吸的测定	(91)
4-3.1	叶片光呼吸的测定	(91)
4-3.2	乙醇酸氧化酶活性的测定	(92)
4-4	二氧化碳补偿点的测定	(93)
4-5	光合作用中有关色素的测定	(95)
4-5.1	叶绿素测定	(95)
4-5.2	β -胡萝卜素测定	(96)
4-5.3	植物叶片中 δ -氨基乙酰丙酸的测定	(97)
4-6	光系统 II 反应中心的提取及测定	(98)
4-6.1	光系统 II 颗粒的制备	(98)
4-6.2	光系统 II 反应中心复合物的制备	(99)
4-6.3	缺失不同外周多肽的光系统 II 颗粒的制备	(100)
4-6.4	原子吸收光谱测定光系统 II 中 Mn 的含量	(101)
4-6.5	光系统 II 中 EPR 信号 II 的测定	(101)
4-7	紫细菌光合反应中心的提纯	(102)
4-8	叶绿体膜上 Mg^{2+} - ATPase 活性的测定	(104)
4-9	叶绿体偶联因子(CF_1)提取、纯化及 ATPase 活性测定	(104)
4-10	叶绿体光合磷酸化活力的测定($^{32}P_i$ 标记法)	(106)
4-11	叶绿体 Hill 反应活力的测定	(108)
4-12	叶绿素荧光和延迟荧光的测定与分析	(109)
4-13	生物发光法测定植物组织中的腺苷酸含量	(111)

4-14	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)羧化活性的测定	(113)
4-15	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)加氧活性的测定	(115)
第5章	呼吸及碳水化合物代谢	(117)
5-1	呼吸速率的测定	(117)
5-2	磷酸化酶活性的测定	(117)
5-3	磷酸果糖激酶活性的测定	(118)
5-4	果糖-1,6-二磷酸酯酶活性的测定	(119)
5-5	磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性的测定	(120)
5-6	焦磷酸:果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶活性的测定	(121)
5-7	丙酮酸激酶活性的测定	(122)
5-8	α -和 β -淀粉酶活性的测定	(123)
5-9	淀粉合成酶、ADPG 焦磷酸化酶和 UDPG 焦磷酸化酶活性的测定	(124)
5-10	蔗糖合成酶、蔗糖磷酸合成酶活性的测定	(126)
5-11	植物材料中可溶性糖的测定	(127)
5-12	β -1,3-葡聚糖酶活性的测定	(128)
5-13	几丁酶活性的测定	(129)
5-14	几种糖苷酶活性的测定	(130)
5-15	淀粉的测定	(131)
5-15.1	总淀粉量的测定	(131)
5-15.2	直链淀粉和支链淀粉的测定	(131)
第6章	氮代谢	(133)
6-1	总氮量的测定——微量凯氏(Kjeldahl)定氮法	(133)
6-1.1	蛋白质氮的测定	(134)
6-1.2	非蛋白质氮的测定	(134)
6-2	非蛋白质氮的组分分析	(135)
6-2.1	氨基氮的测定	(135)
6-2.2	羧基的测定	(136)
6-2.3	酰胺氮(谷酰胺、天冬酰胺和酰胺总量)的测定	(137)
6-3	氨态氮的测定	(138)
6-4	硝态或硝酸态氮的测定	(139)
6-5	尿素含量的测定	(140)
6-6	蛋白质的提取和测定	(141)
6-6.1	蛋白质组分的分析	(143)
6-6.2	蛋白质分子量的测定	(144)
6-6.3	蛋白质等电点的测定	(146)
6-6.4	蛋白质中氨基酸组分的分析	(147)
6-6.5	赖氨酸含量的测定	(148)

6-6.6	谷胱甘肽含量的测定	(149)
6-7	蛋白酶(肽酶)活性的测定	(149)
6-8	脲酶的提取和活性测定	(151)
6-9	硝酸还原酶的提取和活性测定	(152)
6-10	转氨酶(GOT 和 GPT)的提取和活性测定	(154)
6-11	谷氨酸脱氢酶的提取和活性测定	(156)
6-12	谷酰胺合成酶的提取和活性测定	(157)
6-13	天冬酰胺酶的提取和活性测定	(158)
6-14	酪氨酸酶的提取和活性测定	(159)
6-15	色氨酸合成酶的提取和活性测定	(160)
6-16	色氨酸转氨酶和色氨酸脱羧酶的提取和活性测定	(161)
6-17	谷氨酸脱羧酶的提取和活性测定	(162)
6-18	根瘤菌的结瘤能力和根瘤固氮活性的测定	(164)
6-19	豆科植物固氮中能量利用的相对效率测定	(165)
6-20	根瘤菌和植物组织培养之间固氮联合体的建立方法	(165)
6-21	植物体内固氮内生菌的分离和鉴定	(167)
6-22	根瘤菌类菌体的制备	(168)
6-23	豆血红蛋白的提取与纯化	(169)
6-24	豆科植物与根瘤菌共生中凝集素和脂多糖的分离和纯化	(169)
6-25	蓝藻异型细胞的分离	(171)
6-26	生物固氮研究中常用的测定固氮活性的方法	(171)
6-26.1	^{15}N 示踪法	(172)
6-26.2	微量氨扩散法	(173)
6-26.3	乙炔还原法	(174)
6-26.4	酰脲含量的测定	(175)
6-27	固氮酶的两个组分蛋白的分离和纯化	(176)
6-28	钼铁蛋白中铁钼辅因子(FeMCo)的分离	(177)
6-29	离体固氮酶固氮活性的测定	(178)
6-30	固氮酶的需还原剂 ATP 水解和需 ATP 放氢的测定	(179)
6-31	氢酶活性的测定	(180)
6-32	固氮微生物遗传学研究中的突变体分离	(181)
6-32.1	根瘤菌共生(sym)突变体的分离	(182)
6-32.2	固氮菌 nif 突变体的分离	(183)
第 7 章	脂类代谢	(184)
7-1	粗脂肪的提取和测定	(184)
7-2	植物的脂肪酸组分分析	(185)
7-2.1	植物油中不饱和脂肪酸的测定	(185)

7-2.2	不饱和脂肪酸结构的分析	(187)
7-2.3	芥酸的测定	(188)
7-2.3.1	气相色谱法	(188)
7-2.3.2	混浊法	(188)
7-2.4	γ -亚麻酸含量测定	(188)
7-3	脂肪氧化的分析	(189)
7-3.1	酸价的测定	(189)
7-3.2	皂化值的测定	(190)
7-3.3	碘价的测定	(190)
7-3.4	过氧化值的测定	(191)
7-3.5	植物脂肪酸氧化	(192)
7-4	脂类酶的分析	(193)
7-4.1	脂肪酶的分离纯化及活性测定	(193)
7-4.2	脂肪水解酶活性的测定	(195)
7-4.3	脂肪氧化酶活性的测定	(196)
7-4.4	磷脂酶活性的测定	(198)
7-4.5	脂酰基载体蛋白(ACP)的提取	(199)
7-4.6	酯酶同工酶的垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分析	(199)
7-4.7	酸性磷酸酶的定位研究法	(201)
7-4.8	酯酶的分离、纯化与活性测定	(202)
7-5	磷脂和糖脂的测定	(203)
7-5.1	磷脂的测定	(203)
7-5.2	糖脂的测定	(205)
第8章	次生物质代谢	(207)
8-1	生物碱	(207)
8-1.1	吲哚生物碱含量的测定	(207)
8-1.2	烟碱含量的测定	(207)
8-1.3	喜树碱含量的测定	(209)
8-1.4	异胡豆甙(strictosidine)合成酶活性的测定	(210)
8-1.5	牻牛儿醇-10-脱氢酶活性的测定	(211)
8-2	皂甙	(212)
8-2.1	人参皂甙含量的测定	(212)
8-2.2	黄芪甲甙含量的测定	(214)
8-2.3	茶皂素含量的测定	(215)
8-3	萘醌-紫草素含量的测定	(216)
8-4	萜	(217)
8-4.1	丹参酮含量的测定	(217)

8-4.2	紫杉醇含量的测定	(218)
8-4.3	倍半萜棉毒素含量的测定	(219)
8-4.4	倍半萜合成酶活性的测定	(220)
8-4.5	3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)活性的测定	(220)
8-5	黄酮	(222)
8-5.1	黄酮含量的测定	(222)
8-5.2	异黄酮含量的测定	(222)
8-6	酚	(223)
8-6.1	多酚含量的测定	(223)
8-6.2	儿茶素含量的测定	(224)
8-7	其他	(226)
8-7.1	精油的分析	(226)
8-7.2	烟草中焦油含量的测定	(227)
8-7.3	缩酚酸含量的测定	(229)
第 9 章	生长与发育	(231)
9-1	光敏色素	(231)
9-1.1	光敏色素调控反应的鉴定	(231)
9-1.2	隐花色素调控反应的鉴定	(232)
9-1.3	光敏色素的提取与纯化	(233)
9-1.4	光敏色素的测定	(234)
9-1.5	获得不同光质辐射的方法	(235)
9-1.6	光形态建成	(236)
9-1.7	拟南芥种子萌发的光敏色素及激素调控	(236)
9-1.8	外源植物激素对拟南芥种子萌发的影响	(237)
9-1.9	白芥菜籽苗中的高辐照度反应	(238)
9-1.10	蕨类植物孢子体发育中的蓝光反应	(239)
9-2	信息传导	(239)
9-2.1	植物细胞信号转导研究中常用药理学试剂	(239)
9-2.2	植物细胞 G 蛋白的检测	(241)
9-2.3	细胞质中自由钙离子浓度的荧光探针测定法	(243)
9-2.4	络合平衡体系中自由钙离子的微机计算方法	(246)
9-2.5	疏水亲和和层析法纯化钙调素(CaM)	(248)
9-2.6	叶绿体类囊体膜磷酸酯酶的提取和测定	(249)
9-2.7	3'-5'-环腺苷酸磷酸二酯酶(PDE)的提取与 CaM 活性的测定	(250)
9-2.8	酶联免疫法(ELISA)测定 CaM 总量	(251)
9-2.9	尼克酸腺嘌呤二核苷酸激酶(NAD ase)法定量钙调素	(252)
9-2.10	生物素标记钙调素检测钙调素结合蛋白	(255)

9-2.11	蛋白质磷酸化活性的测定	(256)
9-2.12	植物细胞壁蛋白的提取和测定	(258)
9-3	胚胎和种子发育	(259)
9-3.1	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)的杂交方法	(259)
9-3.2	水稻胚胎发育的观察(透明法)	(261)
9-3.3	水稻种子储藏蛋白的分离	(261)
9-3.4	拟南芥的萌发和培养	(262)
9-4	营养器官的生长发育	(263)
9-4.1	植物发育过程中组织和器官内几种同工酶的凝胶电泳分析	(263)
9-4.1.1	过氧化物酶	(264)
9-4.1.2	过氧化氢酶	(265)
9-4.1.3	植物酯酶	(266)
9-4.2	植物生长的测定(包括瞬时生长的测定)	(266)
9-4.2.1	胚芽鞘伸长生长的测定	(267)
9-4.2.2	细胞壁延展性的测量	(267)
9-4.2.3	与细胞壁离子型结合和共价型结合的过氧化物酶的提取	(269)
9-4.2.4	细胞壁中异联酪氨酸的提取和鉴定	(269)
第10章	植物激素	(271)
10-1	植物激素的提取	(271)
10-2	植物激素的测定	(272)
10-2.1	毛细管气相色谱法测定脱落酸	(272)
10-2.2	气相色谱法测定乙烯、ACC和MACC	(274)
10-2.3	气相色谱结合连续流动采气法测定乙烯	(276)
10-2.4	气质联用(GC-MS)法测定内源赤霉素	(277)
10-2.5	高压液相色谱法测定内源细胞分裂素	(280)
10-2.6	荧光分光光度法测定吲哚乙酸	(281)
10-2.7	植物激素的免疫定量分析	(283)
10-2.7.1	固相抗体型ELISA法测定ABA	(283)
10-2.7.2	固相抗原型ELISA法测定IAA	(284)
10-3	植物激素的生物检定	(285)
10-3.1	莠苣种子的发芽试验	(286)
10-3.2	莠苣下胚轴的伸长试验	(286)
10-3.3	燕麦幼苗芽鞘法	(287)
10-3.4	燕麦幼苗伸长生长检定法	(287)
10-3.5	水稻幼苗生长试验	(288)
10-3.6	α -淀粉酶生物检定法	(288)
10-3.7	细胞分裂素的检定	(289)

10-3.8	叶绿素生物合成实验	(289)
10-3.9	侧芽生长抑制实验	(290)
10-3.10	气孔关闭实验	(291)
10-3.11	豌豆上胚轴的乙烯反应	(292)
10-3.12	黄化水稻幼苗第二叶片弯曲法	(293)
第 11 章	环境和抗逆生理	(294)
11-1	植物膜类脂的分析	(294)
11-2	植物膜脂脂肪酸的分析	(297)
11-3	膜相变与流动性分析	(298)
11-3.1	差示扫描量热法	(298)
11-3.2	顺磁共振波谱法	(300)
11-3.3	荧光分光光度与荧光偏振法	(301)
11-4	植物细胞质膜透性的测定	(302)
11-5	游离脯氨酸的测定	(303)
11-6	甜菜碱含量的测定	(303)
11-7	丙二醛的测定	(305)
11-8	甜菜碱醛脱氢酶的分离和活性测定	(306)
11-8.1	甜菜碱醛脱氢酶的分离纯化	(306)
11-8.2	甜菜碱醛脱氢酶活性的测定	(307)
11-9	植物体内氧自由基的测定和清除	(308)
11-10	热激蛋白的分离纯化	(309)
11-11	盐胁迫蛋白的测定	(311)
11-12	醇脱氢酶活性及同工酶测定	(312)
11-12.1	醇脱氢酶活性的测定	(313)
11-12.2	ADH 同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳	(313)
11-13	超氧化物歧化酶及其同工酶的活性测定和同工酶显示	(314)
11-13.1	SOD 活性的测定	(314)
11-13.2	SOD 同工酶显示	(315)
11-14	抗坏血酸含量及抗坏血酸过氧化物酶活性的测定	(315)
11-14.1	抗坏血酸含量的测定	(315)
11-14.2	抗坏血酸过氧化物酶(AsA-POD)活性的测定	(316)
11-15	多酚氧化酶活性的测定	(317)
11-15.1	氧电极法	(317)
11-15.2	比色法	(317)
11-16	苯丙氨酸解氨酶(PAL)的提取、纯化及活性测定	(318)
11-16.1	PAL 的提取——离心和盐析法的应用	(318)
11-16.2	PAL 的纯化——分子筛和离子交换层析的应用	(319)

11-16.3	PAL 的进一步纯化——亲和层析法的应用	(321)
11-16.4	PAL 活性的测定——紫外分光光度计的应用	(322)
11-16.5	PAL 纯度的初步鉴定——聚丙烯酰胺凝胶电泳的应用	(323)
11-17	5'-核苷酸酶活性的测定	(324)
11-18	检测植物组织冰冻致死温度的差热分析法	(325)
11-19	空间生命科学中几种常用方法	(327)
11-19.1	微重力的地面模拟	(327)
11-19.1.1	原理	(327)
11-19.1.2	回转器回转作用的力学问题	(327)
11-19.1.3	常用的回转器	(330)
11-19.2	重力感受位点—平衡石的观察	(331)
11-19.3	空间重离子辐射的核径迹探测法	(332)
11-19.4	细胞染色体损伤的检测方法	(333)
11-19.5	测定 DNA 损伤的 ³² P _i 后标记法	(334)
第 12 章	分子生物学	(336)
12-1	植物组织中核酸类物质的分离和提取	(336)
12-1.1	DNA 的快速分离和提取	(336)
12-1.1.1	SDS 法	(336)
12-1.1.2	十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)法	(337)
12-1.2	从含有特殊物质的组织中分离核酸	(337)
12-1.2.1	DNA 的分离和提取	(337)
12-1.2.2	RNA 的分离和提取	(339)
12-1.3	叶绿体中 DNA 的分离和提取	(340)
12-2	植物组织的各种基因转化体系	(341)
12-2.1	根瘤农杆菌介导的烟草叶块组织转化	(341)
12-2.2	根瘤农杆菌介导的水稻幼胚转化	(342)
12-2.3	真空渗透法转化拟南芥	(344)
12-2.4	原生质体的 PEG 转化法	(345)
12-2.5	基因枪导入基因的方法	(346)
12-3	植物体内常用报道基因的检测方法	(347)
12-3.1	GUS 基因的检测	(347)
12-3.2	CAT 基因的检测	(348)
12-3.3	Opine 基因的检测	(349)
12-4	特定基因的分离和检测方法	(350)
12-4.1	cDNA 文库的构建与筛选	(350)
12-4.2	转座因子标签法分离植物基因	(352)
12-4.3	PCR 方法	(354)

12-4.3.1	PCR的一般方法	(354)
12-4.3.2	植物组织的直接PCR	(356)
12-4.4	原位杂交	(356)
12-5	EMS诱变法筛选拟南芥突变体	(358)
第13章	现代农业技术	(360)
13-1	现代温室的特点及其功能简介	(360)
13-2	上海型智能温室	(361)
13-3	葡萄的快速工厂化育苗	(364)
13-4	球茎(根)花卉的花期调节	(364)
13-5	促进果实成熟和上色	(365)
13-6	用植物生长调节剂保花保果	(366)
13-7	岩棉栽培	(366)
13-8	基质栽培	(368)
13-9	营养液膜	(370)
13-10	几种切花的保鲜技术	(372)
附 录:		(374)
I.	植物组织培养常用的几种基本培养基(成分浓度单位 mg/L)	(374)
II.	组织培养常用的植物激素、生长调节物质及一些药品	(376)
III.	一些常用的缓冲溶液	(376)
IV.	一般化学试剂的分级	(379)
V.	实验中常见化合物的分子量	(379)
VI.	常用酸、碱和其它化合物的浓度	(381)
VII.	摩尔数与摩尔浓度	(381)
VIII.	植物生理学中常用计量单位及其换算表	(382)
IX.	几种蛋白质的物理性质	(387)
X.	用于生物研究的放射性同位素	(387)
XI.	易变质及需要特殊方法保存的试剂	(389)
XII.	各种冷却剂的组成及冷却效果表	(389)
XIII.	酸碱指示剂	(390)
XIV.	离心力和离心机转速测算表	(391)
XV.	光的能量单位之间的关系	(392)
XVI.	用考马斯亮蓝 G-250 测定蛋白质	(392)
XVII.	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(394)
XVII-I	垂直板电泳	(394)
XVII-II	双向电泳	(397)
XVII-III	³ H 标记蛋白放射自显影	(399)
XVIII.	平板凝胶的简易快速干燥	(400)

XIX.	密度梯度超离心技术	(401)
	XIX-I 速率区带技术(rate-zonal).....	(401)
	XIX-II 等比重技术(isopycnic)	(407)
XX.	安发马西生物技术公司简介	(412)
XXI.	华美生物工程公司简介	(413)
XXII.	美国贝克曼库尔特公司(BECKMAN COULTER)简介.....	(413)
XXIII.	美国 Cole-Parmer 仪器公司简介	(413)
XXIV.	美国新布伦兹威克科学仪器公司简介	(414)

第1章 细胞生理

1-1 一些细胞器的分离

1-1.1 离体叶绿体的制备

叶绿体是植物进行光合作用的细胞器,富含在叶细胞内。其结构是外周为被膜所包裹,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。本文分别介绍这两类叶绿体的制备。

1-1.1.1 破碎叶绿体的制备

1 仪器设备

普通离心机(最好带有水平离心头)、研钵或电动捣碎器、分光光度计等。

2 操作方法

2.1 叶绿体制备:取菠菜、豌豆或小麦苗等新鲜叶片,洗净后去除中脉,置于研钵或捣碎器中,加入冰冷的提取液[含 0.4 mol/L 蔗糖, 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.6), 0.01 mol/L NaCl (简称 STN 溶液)], 每 10 g 叶片约加 20 ml 冰冷的 STN 溶液。用手工研磨或用电动捣碎器捣碎,使叶片捣碎至碎米粒样大小,经过 4 层纱布过滤,滤液先以 $200 \times g$ 离心 1 min, 去除粗粒沉淀,上层液再以 $1000 \times g$ 离心 3 min, 倒掉上层液,沉淀为叶绿体。用少量 STN 溶液悬浮叶绿体,悬浮时可用棉球分散沉淀,并通过棉球吸取,以过滤叶绿体结块,叶绿体悬浮液置于冰浴中备用。

2.2 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, 摇匀后于 $1000 \times g$ 离心 2 min, 上清液置于 1 cm 光径的比色杯, 在波长为 652 nm 处的分光光度计上比色。再按下列公式计算: $652 \text{ nm 光密度读数(OD 值)} \times 50 \div 34.5 = \text{叶绿素 mg/ml 叶绿体悬浮液}$

3 注意事项

提取叶绿体操作都在低温下进行,所用器皿都需预冷,操作尽可能迅速。破碎的叶绿体制剂储存在液氮中,其 Hill 反应活性可保持较长时间,储存时叶绿体的浓度宜浓些(约 3~4 mg 叶绿素/ml), 并加 25% 体积的甘油。

1-1.1.2 完整叶绿体的制备

分离方法一般有两种,一是酶消化方法,把叶片表皮撕去后,用纤维素酶和果胶酶消化细胞壁,得到原生质体(参考原生质体分离方法),再把原生质体通过尼龙网小孔(孔径 $20\mu\text{m}$),使原生质体破裂而释放出完整叶绿体,但此方法分离得到的叶绿体数量有限。另一种是用机械方法先用捣碎机破碎叶片,再分步离心,可以大量制备叶绿体。这里主要介绍离心法分离完整叶绿体。

1 仪器设备

普通离心机(需带有水平离心头),或低温离心机、电动捣碎器、照光装置、氧电极测氧仪。

2 操作方法

2.1 采摘新鲜菠菜或豌豆叶片。菠菜要选择嫩而厚,无显著皱纹的叶片,最好在早晨摘取,以免日照后在叶绿体内积累淀粉,不利于完整叶绿体的分离。豌豆也要选择嫩而厚的叶片,摘取后应尽快使用。叶片先在强光下照射 $15\sim 20\text{min}$,用以激活叶绿体,尤其用在完整叶绿体的二氧化碳为底物放氧活性测定时,能使其缩短光合作用诱导期。为了防止强光照射下的温度上升,可把叶片铺放在冰块上,并在光源与叶片之间放隔水层。

2.2 叶片去除叶柄及中脉后,以每 10g 叶片约加 $20\sim 30\text{ml}$ 冰冷的提取液[含 0.33mol/L 山梨醇, 0.05mol/L MES^[1]($\text{pH} 6.1$), 0.01mol/L NaCl, 2mmol/L MgCl_2 , 2mmol/L EDTA- Na_2 , 0.5mmol/L KH_2PO_4 , 2mmol/L 抗坏血酸钠(抗坏血酸钠宜在使用前现配现加)]。在电动捣碎器上高速捣碎,约 2s /次,间隔捣碎 $3\sim 4$ 次,使叶片碎成绿豆粒样大小,然后经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。滤液以 $1000\times\text{g}$ 离心,将离心管放入离心机后,使离心机的加速很快上升到预定值,经约 30s 后再很快使其下降停止,整个离心程序大约用 $2\sim 3\text{min}$ 左右完成。小心地倒出上清液,先用少许提取介质漂洗去沉淀表面的浮物,再加入悬浮介质:即把提取介质中的MES换成HEPES^[2]($\text{pH} 7.6$),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,不要用棉球吸滤,以防被膜压破。叶绿体悬浮时要浓一些(含叶绿素 2mg/ml 以上),这样有利于其活性的保持。

2.3 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。被膜未破的叶绿体的Hill反应速率测定,是将上述被膜涨破叶绿体的Hill反应速率测定液: 0.05mol/L Tris-HCl($\text{pH} 7.6$), 5mmol/L MgCl_2 , 10mmol/L NaCl, 10mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10mmol/L NH_4Cl 。先以 $1:1$ 体积与 0.66mol/L 山梨醇混合,使之保持 0.33mol/L 山梨醇浓度,再加入叶绿体(每毫升反应液约含叶绿素 $50\mu\text{g}$),用氧电极方法

[1] MES, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid [2-(*N*-吗啉代)乙磺酸]。

[2] HEPES, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*,-2-ethanesulfonic acid (*N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸)。

测定 Hill 反应速率(参阅氧电极测氧方法)。被膜破碎的叶绿体 Hill 反应速率测定,是先与不含山梨醇的 Hill 反应液混合,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,使测定时也保持 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:

$$\frac{\text{被膜涨破叶绿体的 Hill 反应速率} - \text{完整叶绿体的 Hill 反应速率}}{\text{被膜涨破叶绿体的 Hill 反应速率}} \times 100 = \text{被膜完整率}$$

2.4 叶绿体被膜完整率的进一步提高:上述方法所得叶绿体被膜完整率一般约在 60% 左右,好的时候也可达到 70% 以上。如果需要进一步提纯,一种简单的方法是再次用悬浮介质洗涤叶绿体,并用同样离心方法沉淀叶绿体,把破碎的叶绿体漂洗去,起着浮选作用,但用此方法提高被膜完整率的程度有限,而且叶绿体损失也多。另一种方法是用 Percoll(是一种具有高密度和低渗透势的二氧化硅溶胶)作为密度梯度介质,方法是将 3ml 含有 80% Percoll(以原液为 100% 浓度,用水稀释),铺在 10ml 体积的离心管下层,再把 3ml 40% Percoll 铺在离心管的中层,然后将 1ml 叶绿体悬浮液轻轻地铺在离心管的上层,用水平离心头的离心机在 $1500 \times g$ 下离心 2~3min,注意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,转移到叶绿体悬浮介质里。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。

(叶济宇 米华玲)

1-1.2 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。

质膜常用水性两相法纯化。其原理为: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(Dextran)和聚乙二醇(PEG)。在以 Dextran 和 PEG 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 PEG 上相中。将一定量粗提质膜溶液加入到样品系统中,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。

1 仪器设备

超速离心机、匀浆器等。