

全国高等学校农林规划教材

植物生理学 实验指导

高俊凤 主编



高等教育出版社
Higher Education Press

内容提要

本实验指导内容分为两篇:上篇为植物生理学实验,下篇为植物生理学基本实验技术原理。编入本书的植物生理学实验是按照“细胞—代谢—生长发育—逆境生理”的体系编排,总计 85 个实验。本书实验既有操作简便不需精密仪器的传统方法,也有反映现代技术的新方法,供教学中根据课程学习、毕业论文要求和实验条件选择使用。

本书主要作为高等农林院校本科生教材,也可供综合性大学、师范院校本科生使用,还可作为从事相关教学和研究人员参考书。

图书在版编目(CIP)数据

植物生理学实验指导/高俊凤主编. —北京:高等教育出版社,2006.5

ISBN 7-04-019170-9

I. 植... II. 高... III. 植物生理学—实验—高等学校—教学参考资料 IV. Q945-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 037660 号

策划编辑 李光跃 责任编辑 田 军 版式设计 王艳红
责任校对 王 雨 责任印制 毛斯璐

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 100011
总 机 010-58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 北京宏伟双华印刷有限公司

开 本 787×1092 1/16
印 张 19
字 数 450 000

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.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2006 年 5 月第 1 版
印 次 2006 年 5 月第 1 次印刷
定 价 22.00 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 19170-00

主 编 高俊凤

副主编 孙 群 曹翠玲 梁宗锁 王玉国

参 编

西北农林科技大学:高俊凤 胡景江 梁宗锁 孙 群
曹翠玲 魏永胜 龚月桦 王渭玲
逢焕明 高 梅 林 岭 吕金印
姚雅琴 周春菊 慕自新 李绍军

山西农业大学: 郭金耀 赵 娟 王玉国

河南大学: 周 云

山西师范大学: 樊保国

审 稿

山东农业大学: 邹 琦

西北农林科技大学:张继澍

前 言

植物生理学实验指导是按照教育部高等教育出版社“全国高等农林教育出版规划”项目“植物生理学立体化系列教材建设”，由西北农林科技大学、河南大学、山西农业大学、山西师范大学等院校长期在教学第一线的教师分工协作共同编写。主要作为高等院校作物生产类、林学类、资源环境类及生物类本科大学生的植物生理学实验指导教材，也可作为从事相关教学和研究人员参考书。

植物生理学是研究植物生命活动规律及其调控的一门学科。近年来植物生理学的实验技术不断进步，推动着植物生理学的研究和发展。为了适应 21 世纪生命科学发展、挑战和高素质人才培养的教学改革需要，促使我们必须将国内外先进的实验内容反映到教学中来，只有这样才能培养出适应 21 世纪的合格人才。

本实验指导内容分为两篇：上篇为植物生理学实验，下篇为植物生理学基本实验技术原理。编入本书的植物生理学实验是按照“植物生理学立体化教材建设”中《植物生理学》“细胞—代谢—生长发育—逆境生理”教材体系编排，总计 85 个实验。在编写中，参考了国内外有关文献，反映了编者所在各院校植物生理学实验教学经验和科研工作积累，努力体现科学性、先进性和实用性。内容上既有操作简便不需精密仪器的传统方法，也有反映现代技术的新方法，供教学中根据课程学习、毕业论文要求和条件选择使用。

本实验指导初稿完成后，经高俊凤、孙群、曹翠玲讨论、修改、统稿。由山东农业大学邹琦教授和西北农林科技大学张继澍教授审稿。最后，由高俊凤、孙群根据审稿意见进行了修改和定稿。教育部高等教育出版社生命科学分社领导、编辑同志对本书的顺利出版给予了大力支持和帮助。在此我们对所有参与本教材编写、绘图、审稿的同志们，一并表示诚挚的谢意。

由于我们的理论水平和实践范围的局限性，书中的缺点和错误在所难免，敬请读者批评指教。

编者

2005 年 4 月

实验室规则

1. 自觉地遵守课堂纪律,维护课堂秩序,不迟到,不早退,保持室内安静,不大声谈笑。
2. 实验前及时清点仪器药品,清洗前发现仪器破损及时报告指导教师予以更换,否则责任自负。在实验过程中要服从教师的指导,严肃认真地按操作规程进行实验,并简要、准确地将实验结果和数据及时、准确地记录在实验记录本上。
3. 实验室内的环境和仪器的清洁整齐是做好实验的重要条件。实验台面、试剂药品架上必须保持整洁,仪器药品要井然有序。公用试剂用毕后应立即盖上盖子放回原处。勿使试剂药品撒在实验台面或地上。实验完毕,需将药品试剂排列整齐,仪器要洗净放好,将实验台面抹拭干净,经教师验收仪器后,方可离开实验室。
4. 使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约,不要使用过量的药品和试剂。应特别注意保持药品和试剂的纯净,严防混杂污染。不要将滤纸和称量纸做其他用途。使用和洗涤仪器时,应小心仔细,防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时,应严格遵守操作规程,发生故障立即报告教师,不要自己动手检修。要爱护国家财产,厉行节约。
5. 注意安全。实验室内严禁吸烟!煤气炉应随用随关,必须严格做到:火着人在,人走火灭。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热,并要远离火源操作和放置。实验完毕,应立即关好电门、煤气阀门和水龙头,各种玻璃器皿应放置稳妥。离开实验室以前应认真负责地进行检查,严防事故的发生。
6. 废弃液体、废纸、火柴头及其他固体废物和带有渣滓沉淀的废物都应倒入废品缸内,不能倒入水槽或到处乱扔。
7. 仪器损坏时,应如实向教师报告,认真填写损坏仪器报销赔偿单,视情况予以报销、赔偿。并及时办理补领。
8. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准严禁携带出室外,借物必须办理登记手续。
9. 每次实验后,值日生主要负责当天实验室的卫生、安全和一些服务性的工作。
10. 对实验的内容和安排不合理的地方可提出改进意见。对实验中出现的一切反常现象应进行讨论,并大胆提出自己的看法,做到生动、活泼、主动地学习。

实验记录及实验报告

(一) 实验记录

实验课前应认真预习,将实验名称、目的和要求、原理及方法步骤等简单扼要地写在记录本中。

实验记录本应标上页数,不要撕去任何一页,更不要擦抹及涂改,写错时可以准确地划去重写。记录时必须使用铅笔或钢笔。

实验中观察到的现象、结果和数据,应该及时准确地直接记在记录本上,绝对不可以用单片纸做记录或草稿。原始记录必须准确、简练、详尽和清楚。从实验课开始就应养成这种良好的习惯。

记录时,应做到正确记录实验结果,切忌夹杂主观因素,这是十分重要的。在实验条件下观察到的现象,应如实仔细地记录下来,在定量实验中观测的数据,如称量物的重量、滴定管的读数、光电比色计或分光光度计的读数等,都应设计一定的表格准确记下正确的读数,并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如,吸光度为 0.050,不应写成 0.05。每一个结果最少要重复观测两次以上,当符合实验要求并确认仪器工作正常后再写在记录本上。实验记录上的每一个数字,都是反映每一次的测量结果,所以,重复观测时即使数据完全相同也应如实记录下来。数据的计算也应该写在记录本的另一页上,一般写在正式记录左边的一页。总之,实验的每个结果都应正确无遗漏地做好记录。

实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、相对分子质量、准确的浓度等,都应记录清楚,以便总结实验时进行核对和作为查找成败原因的参考依据。

如果发现记录的结果有疑问、遗漏、丢失等,都必须重做实验。将不可靠的结果当作正确的记录,在实际工作中可能造成难以估计的损失。因此,在学习期间就应当一丝不苟,努力培养严谨的科学作风。

(二) 实验报告

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告。按照实验内容可分为定性和定量实验两大类,下面分别列举这两类实验报告的格式供参考。

1. 关于定性实验报告的书写形式

实验(编号) (实验名称)

- (1) 目的
- (2) 实验原理
- (3) 方法步骤
- (4) 结果(原始数据及观察记录)与讨论

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

传 真：(010) 82086060

E - mail: dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118

目 录

实验室规则

实验记录及实验报告

上篇 植物生理学实验

第一章 细胞生理	3	实验 12 植物组织汁液浓度测定	31
实验 1 植物细胞原生质流动的观察	3	实验 13 蒸腾速率测定	31
实验 2 高等植物叶绿体的分离制备 与活性鉴定	4	一、吸水剂法	32
实验 3 高等植物线粒体的分离制备	6	二、吸水纸法	33
实验 4 植物细胞的死活鉴定及质壁 分离	8	实验 14 稳态气孔计测定扩散阻力和 蒸腾速率	34
一、植物细胞的活体染色与死活鉴定	8	实验 15 气孔开闭状况测定	38
二、质壁分离的不同形式	9	一、印迹法测定气孔开张度	38
实验 5 PAS 法显示多糖	10	二、透明胶带法测定气孔开张度	39
实验 6 植物染色体荧光原位杂交	11	三、气孔密度和孔口总面积测定	40
第二章 水分生理	15	实验 16 K^+ 对气孔开度的影响及气孔 保卫细胞内 K^+ 变化的观察	42
实验 7 植物组织含水量、相对含水量 及水分饱和亏测定	15	一、 K^+ 对气孔开度的影响	42
实验 8 植物叶片保水力测定	16	二、气孔保卫细胞内 K^+ 变化的观察	42
实验 9 植物组织水势测定	17	实验 17 植物水分利用效率(WUE) 测定	43
一、小液流法	17	一、单叶水分利用效率	44
二、压力室法	19	二、个体或群体水分利用效率	44
三、热电偶湿度计法	21	实验 18 伤流液的收集和伤流量测定 ..	45
实验 10 植物组织渗透势测定	23	一、加压法	46
一、质壁分离法测定细胞渗透势	23	二、容积法	46
二、冰点下降法测定植物组织渗透势	24	三、重量法	47
三、用压力-容积曲线技术测定植物叶片渗 透势	26	实验 19 伤流液中主要化学成分的 分析与鉴定	48
四、蒸汽压渗透计测定植物组织渗透势	27	一、纸层析法鉴定伤流液中氨基酸与酰胺 ..	49
实验 11 植物组织自由水和束缚水 含量测定(马林契克法)	29	二、氨基酸自动分析仪测定伤流液中氨 基酸含量	50
		三、伤流液中无机磷的定量测定	51

实验 20 植物根系水力学导度(水导) 测定	53	三、CO ₂ 补偿点测定	94
第三章 矿质营养	55	实验 36 光合作用系统测定植物净光 合速率、蒸腾速率及其他相 关参数	95
实验 21 植物的溶液培养和缺素症状	55	实验 37 RuBP 羧化酶活性测定	100
实验 22 根系活力测定	57	一、同位素法	101
一、根系总吸收面积和活跃吸收面积测定	58	二、分光光度法	102
二、氯化三苯基四氮唑(TTC)法测定根系 活力	59	实验 38 淀粉磷酸化酶活性测定	103
实验 23 硝酸还原酶活性测定	61	实验 39 蔗糖合成酶、蔗糖磷酸合 成酶活性测定	105
一、活体法	61	实验 40 酸性转化酶和碱性转化酶 活性测定	107
二、离体法	63	实验 41 ADPG 焦磷酸化酶活性 测定	108
实验 24 根系体积测定	64	实验 42 植物 ¹⁴ CO ₂ 光合标记	111
一、水位取代法测定根系体积	65	实验 43 植物样本宏观放射自显影	112
二、图像扫描法测定根系体积	65	第五章 呼吸作用	115
实验 25 质膜微囊泡的分离、纯化及 质膜 H ⁺ -ATPase 活性测定	66	实验 44 植物呼吸速率测定	115
实验 26 硝态氮含量测定	68	一、干燥器法	115
第四章 光合作用	71	二、小筐子法	117
实验 27 叶绿体色素的提取分离	71	三、微量减压法	118
实验 28 叶绿素的理化性质	73	实验 45 呼吸抑制剂对呼吸作用的 影响	121
实验 29 叶绿素含量的定量测定	74	实验 46 植物体内维生素 C 氧化酶、 多酚氧化酶活性测定	123
实验 30 叶绿素荧光动力学参数测定	77	实验 47 细胞色素氧化酶活性测定	126
实验 31 改良半叶法测定光合速率	79	实验 48 生物发光法测定腺苷三磷 酸(ATP)	127
实验 32 植物净同化率测定	81	实验 49 植物氧化磷酸化效率(P/O) 和呼吸控制(RC)测定	130
实验 33 氧电极法测定光合和呼吸 速率	82	第六章 物质代谢	133
实验 34 叶面积的测定方法	85	实验 50 植物体内蛋白氮和非蛋白氮 含量测定	133
一、叶面积仪测定法	85	一、微量凯氏定氮法	134
二、透明方格法	86	二、凯氏自动定氮仪法	138
三、印相重量测定法(纸样称重法)	87	三、纳氏比色定氮法	138
四、打孔测定法	88	实验 51 植物组织中可溶性蛋白质 含量测定	140
五、排水量测定法	88	一、Folin-酚试剂法(Lowry 法)	140
六、系数测定法	89		
七、回归方程法	89		
实验 35 红外线 CO ₂ 气体分析仪测 定光合、呼吸、光呼吸、CO ₂ 补偿点	90		
一、光合及呼吸速率测定	92		
二、光呼吸测定	93		

二、考马斯亮蓝 G-250 染色法	142	实验 64 H ⁺ 流向与植物生长模式	181
三、紫外吸收法	143	实验 65 花粉活力测定	182
实验 52 植物组织中糖、淀粉和纤维 素含量的系统测定	144	一、I ₂ -KI 染色测定法	182
实验 53 植物组织中粗脂肪含量 测定	149	二、TTC 法测定花粉活力	183
实验 54 植物组织中核酸的提取 与测定	151	实验 66 花粉管生长测定	184
一、基因组总 DNA 的提取	151	实验 67 种子生活力快速测定	185
二、DNA 浓度、纯度的快速测定	152	一、TTC 法	185
三、植物组织总 RNA 的提取	154	二、红墨水染色法	187
四、RNA 浓度、纯度的快速测定	155	三、荧光法	187
第七章 植物激素	158	实验 68 谷物种子萌发时淀粉酶活 性测定	188
实验 55 植物激素的提取分离与 纯化	158	实验 69 植物激素对愈伤组织形成 及器官分化的影响	191
一、溶剂萃取法	158	第十章 成熟衰老	195
二、薄层层析法分离纯化	160	实验 70 乙烯对果实的催熟作用	195
三、C ₁₈ 胶柱分离法	161	实验 71 气相色谱法测定乙烯含量	196
实验 56 酶联免疫法测定植物激素 含量	163	实验 72 乙烯合成酶活性测定	198
一、双层固相抗体型 ELISA 测定 ABA 含量	163	实验 73 植物组织中有有机酸含量 测定	199
二、固相抗原型 ELISA 测定 IAA 含量	167	实验 74 植物组织中维生素 C 含量 测定	200
实验 57 芽鞘伸长法测定生长素类 物质	169	一、2,6-二氯酚酚滴定法	200
实验 58 赤霉素对 α-淀粉酶的诱导 形成	171	二、荧光比色法	202
实验 59 植物生长调节剂 NAA 对植 物生根的效应	172	三、钼蓝比色法	203
实验 60 细胞分裂素对萝卜子叶的 保绿和增重作用	173	实验 75 果实成熟时果胶酯酶(PE)、 多聚半乳糖醛酸酶(PG)活 性测定	205
实验 61 IAA 氧化酶活性测定	175	第十一章 逆境生理	208
第八章 信号转导	177	实验 76 逆境对植物细胞膜的伤害	208
实验 62 脱落酸对植物气孔运动和保 卫细胞质膜 K ⁺ 通道的影响	177	实验 77 丙二醛含量测定	210
实验 63 激光扫描共聚焦技术测定气 孔保卫细胞内游离 Ca ²⁺ 浓度 的变化	179	实验 78 植物组织中超氧化物歧化酶 活性测定	211
第九章 生长发育	181	实验 79 植物组织中过氧化氢酶活性 测定	214
		一、紫外吸收法	214
		二、碘量滴定法	215
		实验 80 植物组织中过氧化物酶活性 测定	217
		一、过氧化物酶活性测定	217

二、维生素 C 过氧化物酶活性测定	218	一、还原型谷胱甘肽含量测定	223
实验 81 苯丙氨酸解氨酶活性测定	219	二、胡萝卜素含量测定	224
实验 82 植物超氧阴离子自由基含量 测定	221	三、维生素 E 含量测定	226
实验 83 植物体中谷胱甘肽、类 胡萝卜素、维生素 E 含量 测定	223	实验 84 脯氨酸含量测定	228
		实验 85 气相色谱法测定植物样品 膜脂中脂肪酸的含量	231

下篇 植物生理学基本实验技术原理

第一章 植物材料的准备与分析

方法	237
一、植物材料的种类	237
二、植物材料的培养	237
三、植物材料的采取	239
四、分析样品的处理与保存	240
五、待测植物样品的分析方法	241

六、实验结果的数据处理与分析	241
----------------------	-----

第二章 植物生理学基本实验

技术	244
一、细胞器及质膜分离技术	244
二、植物组织培养技术	251
三、植物光合、呼吸测定技术	259
四、光谱分析技术	271

附录	277
一、常用酸碱主要性质及配制参考表	277
二、常用缓冲液	277
三、几种渗透溶液的配制表	282
四、混合溶液的配制方法	283
五、容易变质及需要特殊方法保存的试剂	283
六、各种冷却剂的组成及冷却效果表	284
七、常用植物激素及生长调节剂	284
八、标准剂量单位	285
九、离心机转速与相对离心力的换算	287

植物生理学实验

上
篇



第一章

细胞生理

实验 1 植物细胞原生质流动的观察

【原理】

在多种植物细胞中都能观察到原生质的流动现象,它是细胞活动强弱的重要指标。细胞原生质流动现象的产生,是细胞骨架中微丝肌动蛋白与肌球蛋白相互滑动的结果,此过程要消耗能量,受各种因素诸如温度、渗透压及各种离子的影响。

【仪器设备】

1. 显微镜。
2. 载玻片。
3. 盖玻片。
4. 尖头镊子。
5. 刀片。

【试剂】

1. $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaF}$ 。
2. $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙二酸钠。
3. $0.17 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-二硝基苯酚(DPN)。

【材料】

黑藻(也称水王荪、轮叶黑藻)叶,轮藻,洋葱鳞茎(最好使用萌发的鳞茎)或紫鸭跖草雄蕊花丝或小麦幼苗的根毛(种子在培养皿中湿滤纸上萌发,当根长到 $1 \sim 2 \text{ cm}$,有许多根毛时最合适)。

【方法步骤】

1. 取 1 块干净的载玻片,在中央滴 $1 \sim 2$ 滴蒸馏水;取紫鸭跖草(或其他材料)花 1 朵,用镊子取 1 枚雄蕊,迅速置于载玻片水滴中,切去花药,加盖玻片,用显微镜低倍物镜($10 \times$)进行观察,注意花丝周围附着许多“念珠链”状的花丝毛,每 1 粒“念珠”是 1 个单毛细胞。

2. 转换高倍物镜($40 \times$)观察,可以看到薄而透亮的细胞质成薄层沿着细胞质膜以一定的速度和方向循环流动。细胞质流动可朝一个方向,也可朝不同的方向,其流动方式为转动式(旋转式、环流式)。这时细胞器随细胞质基质一起运动,并非只是细胞质的运动。细胞中央是含水溶性花青素(anthocyanin)的液泡。注意观察花丝毛细胞核的部位。

3. 用吸水纸吸干水,加 1 滴 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaF}$,注意观察细胞质停止流动的时间。细胞质停止流动后,用吸水纸吸去氟化钠,滴入清水,注意流动是否能恢复。

4. 依上述操作,加 1 滴 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙二酸钠或 $0.17 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-二硝基苯酚,注意观察细胞质流动速度是否发生改变;用吸水纸吸去药液后,加入蒸馏水,再观察细胞质流动的变化。

【注意事项】

用洋葱鳞片内表皮、鸭跖草雄蕊花丝上的表皮毛、轮藻幼嫩的节间细胞进行观察时,如一时找不到原生质流动的细胞,可将载玻片置于温箱里或白炽灯泡上很短时间,待温度有所提高后再观察。

【思考题】

如何理解细胞质流动原理?

【参考文献】

李玲等. 细胞生物学. 长沙:湖南科学技术出版社,2003. 6~7

(山西农业大学 郭金跃)

实验2 高等植物叶绿体的分离制备与活性鉴定

叶绿体是植物细胞中的重要细胞器,也是形成光合产物的重要部位,因此,与光合作用密切相关。为了研究叶绿体的精细结构和功能,常常需要从完整细胞中将其分离出来。利用差速离心技术可以对其进行分离和纯化。并利用其特征反应鉴定生理活性。

【原理】

叶绿体的颗粒比较大,分离和制备时一般采用差速离心技术,当细胞破碎后选择 500~1 500 g 离心力进行分步离心,即能分离沉淀出叶绿体。再通过测定叶绿体的光合速率或希尔反应中的放氧情况则可以鉴定其生理活性。

离体后的完整叶绿体与 2,6-二氯酚靛酚(2,6-D)在光下可使水光解释放氧气,同时 2,6-D 由原来的蓝色被还原为无色或粉红色。可用分光光度计测定反应前后染料吸光度的变化,表示氧气的释放量。叶绿体中的叶绿素含量可用丙酮提取后,用 Anon 法计算。

【仪器设备】

1. 高速冷冻离心机。
2. 匀浆器。
3. 分光光度计。
4. 生物显微镜。
5. 400 W 白炽灯。
6. 玻璃水槽。
7. 15 mL 具塞刻度试管。
8. 烧杯、玻璃研钵、移液器等。

【试剂】

1. 85%丙酮溶液。
2. 叶绿体制备液,由以下成分组成:山梨糖醇 $0.33 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; EDTA $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; MgCl_2 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; K_2HPO_4 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; HEPES $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 7.6 (用 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 调节)。
3. 叶绿体悬浮液用叶绿体制备液代替。
4. 叶绿体反应介质:在叶绿体悬浮液中加入 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 , pH 调节至 7.3。
5. $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,6-D:称取 8.7 mg 2,6-二氯酚靛酚钠盐,加蒸馏水定容至 100 mL。
6. $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.3 磷酸缓冲液。

以上所有的试剂均为分析纯。

【材料】

菠菜、豌豆和大麦等植物的新鲜叶片。

【方法步骤】

1. 叶绿体制备

(1) 摘取 5 g 新鲜菠菜叶片,去叶脉后用自来水洗净,再用蒸馏水洗 1~2 次。在 0~4 °C 冰箱中放置 1 h 左右预冷(注意避免叶片冻结,放置时间不宜过长)。

(2) 将预冷后的叶片剪碎,在玻璃研钵中(研钵置于冰浴中)加少许石英砂和少量叶绿体制备液,快速磨成匀浆,然后再加 2 倍量的制备液(制备液:材料=2:1,V/W),磨成匀浆后立即用 4 层纱布过滤(需要带上一一次性手套),滤液移至离心管。

(3) 4 °C 下,500g 离心 3 min,将上清液收集在另一离心管,用 1 500g 离心 5 min,倾去上清液即得叶绿体沉淀。

(4) 将所得沉淀悬浮在 25 mL 叶绿体悬浮液中备用。

2. 叶绿体活性鉴定

(1) 叶绿素含量测定:取 50 μL 叶绿体悬浮液于 25 mL 刻度试管中,加入 18 mL 85% 丙酮溶液和 1.95 mL 蒸馏水,过滤或在 4 000g 下离心 10 min,在 652 nm 波长下测定吸光度,并按下式计算叶绿素含量(注意结果乘以稀释倍数)。

$$C_T(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{A_{652}}{34.5}$$

(2) 叶绿体的希尔反应测定

① 取 3 支干净试管 1~3 编号,然后按下表加入试剂:

管号	磷酸缓冲液/mL	叶绿体悬浮液/mL	煮沸时间/min	2,6-D/mL
1	9.4	0.1	0	0.5
2	9.4	0.1	5	0.5
3	9.9	0.1	0	0

表中 1 号管为测定管,2 号管为煮死叶绿体对照,3 号为空白管调节零点,各管分别重复 3 次,注意在加染料前于冰浴中保存,并避免光照。

② 当加入染料后,立即倒入比色杯中,迅速测定 620 nm 下的吸光度,此值代表作用时间为 0 时的吸光度。然后将比色杯置 400 W 白炽灯下(距离 60 cm 左右)照光,每隔 1 min 快速读一次吸光度,连续测定 5 min,严格控制光照时间。

将结果以每分钟 A_{620} 的变化量($\Delta A_{620}/\text{min}$)为纵坐标,时间(min)为横坐标作图。

③ 叶绿体的希尔反应活性计算:根据 ΔA_{620} 值查工作曲线,以单位时间内 A_{620} 下降值表示希尔反应活性。

$$\text{希尔反应活性}[\Delta A_{620}/(\text{mg 叶绿素}\cdot\text{min})] = \frac{\Delta A_{620}}{C_T \times V \times t} \times n$$

式中, C_T : 叶绿体中的叶绿素含量, V : 测定用叶绿体悬浮液的体积(mL), t : 测定时间(min), n : 对叶绿体悬浮液稀释倍数。

3. 叶绿体光合速率测定(氧电极法, 详见光合呼吸测定技术)

在反应杯中加入 8.2 mL 反应介质和 0.8 mL 叶绿体悬浮液, 在 25 °C, 2 000 lx 光强下测定光合速率。

$$\text{叶绿体光合速率} = (\mu\text{molO}_2/\text{格}) \times \text{移动格数} / (\text{mg chl} \times \text{h})$$

【注意事项】

1. 制备叶绿体时, 整个操作要保持温和、快速, 避免强烈振动影响叶绿体的完整性和生理活性。
2. 进行再悬浮时不能用坚硬的玻璃棒搅拌, 可缓慢摇动或用软毛笔轻搅。

【思考题】

1. 分离叶绿体的过程中应注意哪些问题?
2. 还有哪些方法可以鉴定叶绿体活性?

【参考文献】

1. 李玲等. 细胞生物学. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2003. 20~22
2. 高俊凤. 植物生理学实验技术. 西安: 世界图书出版公司, 2000
3. 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

(西北农林科技大学 孙群 山西农业大学 郭金跃)

实验 3 高等植物线粒体的分离制备

【原理】

线粒体(mitochondria)是真核细胞特有的可进行能量转换的重要细胞器。细胞中的能源物质——脂肪、糖、部分氨基酸在此进行最终的氧化, 并通过偶联磷酸化生成 ATP, 供给细胞生理活动之需。对线粒体结构与功能的研究通常利用离体的线粒体进行。

制备线粒体时首先对植物材料进行匀浆, 然后用差速离心方法分离线粒体。一般先用低速(500~1 000g)去除细胞或组织碎片, 然后在(10 000~20 000g)下沉降线粒体; 再通过密度梯度离心可获得较高纯度的线粒体。詹纳斯绿 B(Janus green B)是线粒体的专一活性染料, 毒性很小, 属于碱性染料, 解离后带正电, 由电性吸引而堆积在线粒体膜上。线粒体膜上的细胞色素氧化酶使该染料保持在氧化状态而呈现蓝绿色, 而胞质中的染料被还原成无色。

【仪器设备】

1. 温箱。
2. 冰箱。
3. 高速冷冻离心机。
4. 组织匀浆器或玻璃研钵。
5. 纱布。

【试剂】

1. 分离介质: 0.25 mol·L⁻¹蔗糖, 50 mmol·L⁻¹的 Tris-盐酸缓冲液(pH7.4), 3 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.75 mg·mL⁻¹牛血清清蛋白(BAS)。