

植物生理生化 实验教程

ZHIWU SHENGLIHUA SHIYAN JIAOCHEN

第 2 版

主 编 / 叶尚红

副主编 / 张志明 陈疏影



云南出版集团公司
云南科技出版社

植物生理生化 实验教程

第2版

主 编 叶尚红

副主编 张志明 陈疏影

云南出版集团公司
云南科技出版社
· 昆 明 ·

图书在版编目(CIP)数据

植物生理生化实验教程/叶尚红主编. —昆明: 云南
科技出版社, 2004. 2 (2007 年 3 月重印)

ISBN 978 - 7 - 5416 - 1945 - 8

I. 植... II. 叶... III. ①植物生理学—实验—高
等学校—教材 ②植物学: 生物化学—实验—高等学
校—教材 IV. Q94 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 006590 号

云南科技出版社出版发行

(昆明市环城西路 609 号云南新闻出版大楼 邮政编码: 650034)

昆明市五华区教育委员会印刷厂印刷 全国新华书店经销

开本: 787mm × 1092mm/16 印张: 13. 75 字数: 300 千字

2007 年 2 月第 2 版 2007 年 2 月第 2 次印刷

印数: 1 ~ 2000 定价: 19. 50 元

主 编 叶尚红

副主编 张志明 陈疏影

编写人员

实验导论 叶尚红

第一部分 陈疏影

第二部分 （以姓氏笔画为序）

于虹漫 毛自朝 叶尚红 字淑慧 向 红

林 春 陈疏影 张志明 梁艳丽

第三部分 叶尚红 字淑慧

附 录 毛自朝 梁艳丽

内 容 简 介

本书是为实验单独设课而编写,按照实验导论——实验理论——实验技术——综合实验——附录的体系编排。实验导论概述了植物生理生化实验的内容、过程及学习目的和要求。实验理论介绍了四种植物生理生化实验技术(离心技术、层析技术、电泳技术和分光光度技术)的基本原理。实验技术部分共选编了45个实验项目,内容涉及植物体内糖类、脂类、蛋白质、氨基酸、核酸、酶、激素、叶绿素等物质的定性及定量检测和植物光合作用、呼吸作用、水分代谢、矿质营养、物质运输、生长发育、抗逆性等生命活动现象的观察和指标测定。综合实验部分共组合了技术型、比较型、研究型三种类型的综合实验。附录摘录了植物生理生化实验中常用仪器使用方法和常用试剂配制方法等。

前 言

为适应植物生理生化实验单独设课的需要,我们编写了这本《植物生理生化实验教程》。教程按照实验导论——实验理论——实验技术——综合实验——附录的体系编排。实验导论概述了植物生理生化实验的内容、过程及学习目的和要求,是学习前必须了解的内容。植物生理生化实验技术原理部分,介绍了离心、层析、电泳、分光光度等技术的基本原理,是为提高学生的实验理论基础而编写,供实验理论讲授和自学。植物生理生化实验技术部分,选编了45个实验项目,内容涉及植物体内糖类、脂类、蛋白质、氨基酸、核酸、酶、激素、叶绿素等物质的定性及定量检测和植物光合作用、呼吸作用、水分代谢、矿质营养、物质运输、生长发育、抗逆性等生命活动现象的观察和指标测定,是学生学习实验技术的主要内容,可按教学大纲规定的学时和内容选用。植物生理生化综合实验部分,组合了分光光度技术、营养分析、矿质营养及逆境生理等6个综合实验,是为提高学生的综合分析能力和科研能力而编写,供教师在教学安排上选用。附录摘录了植物生理生化实验中常用仪器使用方法和常用试剂配制方法等内容,是实验的基础资料,供需要时查阅。

本教程的特点如下:

1. 传统的“实验指导”只是实验方法的学习指导,缺少实验过程的总体介绍,实验技术原理及实验方法综合应用等三部分内容。《植物生理生化实验教程》作为实验单独设课的教材增加了这些部分,拓宽了实验教学内容,这在实验教材编写体系上是一种新的尝试。

2. 教程编写了“综合实验”这一新内容。这是云南农业大学实验教学改革成果,并以教材这一载体形式固定下来。综合实验以循序渐进地培养学生不同能力作为综合的依据,编写了技术型、比较型和研究型三种类型的综合实验,它是各实验方法综合应用的一种探索。作为教学安排上的一种组合,可供教学选用。

3. 为满足各个教学环节(理论讲授、实验、作业、考核、考试)的需要,教程还编写了实验报告及实验课程论文写作指导、分光光度技术考核指标和方法、实验设计考核作业等。另外,各部分还列出思考题,供笔试时学生复习参考。综合实验后列出的例文供学生撰写实验课程论文参考。

《植物生理生化实验教程》是我们植物生理教研室多年实验教学改革的积

淀。教程中,大部分实验内容已在云南农业大学实验教学中采用多年,并经反复实践,不断完善。实验理论和综合实验部分的内容已经过多届学生试用。本书可供植物生产类、环境资源类、生物类本专科各专业学生使用,亦可供函授学生使用。

本书的编写和出版得到了云南农业大学的支持和帮助,在此深表感谢。本书内容由各编写人编写,全书最后由叶尚红统稿。书中插图由陈疏影、梁艳丽绘制。

限于编者水平,本书的缺点和遗漏之处诚望批评、指正,以便今后修订补充。

编者

2007 年 1 月

目 录

植物生理生化实验导论	(1)
------------------	-------

第一部分 植物生理生化实验技术基本原理

第 1 章 离心技术	(8)
第 2 章 层析技术	(15)
第 3 章 分光光度技术	(22)
第 4 章 电泳技术	(30)

第二部分 植物生理生化实验

实验 1 谷物种子赖氨酸含量的快速测定(茚三酮比色法)	(40)
实验 2 氨基酸的薄层层析	(42)
实验 3 常量克氏定氮法测定粗蛋白	(46)
实验 4 谷物蛋白含量的快速测定(双缩脲法)	(48)
实验 5 植物组织中可溶性蛋白含量的测定(考马斯亮蓝 G-250 法)	(51)
实验 6 谷物种子蛋白质的提取及脱盐	(53)
实验 7 用凝胶等电聚焦电泳法测定蛋白质等电点	(55)
实验 8 影响酶作用的因素	(57)
实验 9 硝酸还原酶活性的测定	(60)
实验 10 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离过氧化物同工酶	(63)
实验 11 淀粉酶活性的测定	(66)
实验 12 总糖和还原糖的测定	(69)
I 3,5-二硝基水杨酸法	(70)
II 斐林试剂比色法	(72)
实验 13 植物组织中可溶性糖与淀粉的测定(蒽酮法)	(74)
I 可溶性糖的测定	(76)
II 淀粉的测定	(78)
实验 14 糖的硅胶 G 薄层层析	(79)
实验 15 植物组织中纤维素含量的测定	(81)
实验 16 种子粗脂肪的定量测定(索氏法)	(83)

实验 17	酵母 RNA 的提取和鉴定	(87)
实验 18	DNA 的提取及鉴定	(88)
实验 19	硝酸盐含量的测定(紫外吸收法)	(90)
实验 20	植物组织中自由水和束缚水含量的测定	(92)
实验 21	植物组织水势的测定	(95)
	I 小液流法	(95)
	II 电导法	(98)
实验 22	植物细胞汁液浓度的测定(手持糖量计法)	(100)
实验 23	植物蒸腾速率和保水力的测定(快速称重法)	(102)
实验 24	植物的无土培养	(104)
	I 植物的缺素培养和生长测量	(104)
	II 植物氮素营养水平的砂基培养	(108)
实验 25	植物根系活力的测定	(109)
	I 根系总吸收面积和活跃吸收面积的测定(甲烯蓝吸附法)	(110)
	II 根系活力的测定(TTC 比色法)	(112)
实验 26	单盐毒害及离子间的颀颀现象	(114)
实验 27	植物组织中游离氨基酸总量的测定(茆三酮显色法)	(116)
	I 方法 1	(117)
	II 方法 2	(118)
实验 28	高等植物光合色素提取、分离和理化性质	(120)
	I 提取与分离	(120)
	II 理化性质	(122)
实验 29	叶绿体色素的含量测定(分光光度法)	(124)
实验 30	光合速率的测定(改良半叶法)	(127)
实验 31	呼吸速率的测定(广口瓶法)	(130)
实验 32	植物光合速率与呼吸速率的测定	(132)
	I 红外 CO ₂ 分析仪法	(132)
	II 氧电极法	(136)
实验 33	苹果酸脱氢酶活性的测定	(140)
实验 34	琥珀酸脱氢酶活性的测定	(142)
实验 35	过氧化物酶活性的测定	(144)
实验 36	固相抗体型 ELISA(酶联免疫吸附检测法)测定植物激素含量	(146)
实验 37	生长素类物质对根、芽生长的影响	(148)
实验 38	种子生活力的快速测定	(150)
	I 染色法	(150)
	II 荧光法	(153)
实验 39	花粉活力的测定	(154)
	I 氯化三苯基四氮唑(TTC)法	(154)

II	花粉萌发测定法	(155)
实验 40	植物春化作用与光周期诱导的观察	(156)
I	春化现象的观察	(156)
II	光周期现象的观察	(157)
实验 41	植物组织中丙二醛含量的测定	(159)
实验 42	氮蓝四唑测定超氧化物歧化酶活力(NBT 法)	(161)
实验 43	过氧化氢酶活性测定	(164)
I	氧量法	(164)
II	高锰酸钾标定法	(166)
实验 44	植物组织逆境膜伤害程度的测定(电导仪法)	(168)
实验 45	植物体内游离脯氨酸含量的测定	(171)

第三部分 植物生理生化综合实验与实验设计

I	技术型综合实验	(174)
综合实验 1	分光光度技术及应用	(174)
II	比较型综合实验	(175)
综合实验 2	不同蔬菜硝酸盐含量比较	(176)
综合实验 3	不同谷物的蛋白质及赖氨酸含量比较	(177)
综合实验 4	植物不同氮素营养水平差异比较	(178)
III	研究型综合实验	(179)
综合实验 5	矿质元素对植物生长的影响	(180)
综合实验 6	不同植物材料抗逆性比较	(182)
IV	实验设计	(184)
V	综合实验报告和实验课程论文写作指导	(186)

附录

附录 1	常用仪器使用与精密仪器的保养	(194)
附录 2	常用试剂及缓冲液配制	(203)
主要参考文献		(212)

植物生理生化实验导论

植物生理生化实验是采用生物化学和植物生理学的原理和方法探究植物生命现象化学本质和生命活动规律的实验科学。它的内容大致可分为两个方面：一是定性定量地分析检测植物体内的化学物质，如：糖类、脂类、蛋白质、核酸、酶、氨基酸、核苷酸、维生素、植物激素、色素及矿质元素等；二是观察植物生命活动现象，如：光合作用、呼吸作用、水分代谢、矿质营养、物质运输、生长发育和抗逆性等，并测定生命活动指标，如各种代谢反应的速率，植物器官的活力和酶的活性等。植物生理生化实验课的目的在于：学习掌握植物生理生化基本实验技术的理论、方法及操作；培养理论联系实际、严谨求实的实验作风和良好的实验习惯；提高分析问题、解决问题的能力及初步的科学研究能力。要达到这些目的，首先应全面了解植物生理生化实验的过程。

一个完整的植物生理生化实验过程大致包括植物材料准备、实验、数据处理和结果分析、撰写实验报告四个阶段。

一、植物材料准备

实验的植物材料是实验研究的对象，取材也是实验操作的第一步，取材的正确与否关系到实验结果的准确性。

1. 植物材料的种类

植物生理生化实验使用的材料非常广泛，根据来源可划分为天然的植物材料（实验室培养、大田栽培的幼芽、幼苗、成熟的根、茎、叶、花等器官或组织等）和组织培养、人工选育的植物材料（如杂交种、诱导突变种、植物组织培养突变型细胞、愈伤组织、酵母等）两大类；按其水分状况、生理状态可划分为新鲜植物材料和干材料两大类。可按实验目的和条件适当加以选择和培养。

2. 实验室培养的植物材料

根据实验需要，可在实验室培养一些植物材料。如用培养皿或瓷盘（下垫1~3层滤纸）培养发芽材料；或用无土栽培方法培养幼苗和营养生长的植株（参见实验24）；也可用花盆栽培植物材料。

3. 植物材料的采取

采样是植物生理生化实验的首要工作。采样是从一大批材料中取出一小部分作为样品，样品应具有最大的代表性。若样品没有代表性，即使实验很认真、分析很精确，也很难说明问题。样品采集可分为三种方式：

(1) 原始样品采集

从实验室外（大田、试验区、野外）采集的植物样品或实验室培养的植物材料，一般数量较大，称为“原始样品”。原始样品的采集可采用随机取样或对角线取样。

随机取样是在取样地选择有代表性的取样点，取样点的数目应视取样地大小而定。选好点后，随机采取一定数量的样株，或在每一个取样点上按规定的面积采取样株。

对角线取样是在取样地按对角线选定 5 个取样点，然后在每个点上随机取一定数量的样株，或在每个取样点上按规定的面积采取样株。

(2) 平均样品的采取

从原始样品的不同部位（如植物的根、茎、叶、花、果实、种子等）选出“平均样品”，平均样品的采取可采用混合取样法（四分法、每次均淘汰 50% 的样品）和按比例取样法（按原始样品中大、中、小或上、中、下不同类型的比例选取样品）。选取平均样品的数量应不少于供分析样品的两倍。

(3) 分析样品的预处理

根据分析的目的、要求和样品种类的特征，采用适当的方法，从“平均样品”中选出供分析用的样品称为“分析样品”。分析样品在用做分析之前，首先要经过净化（去灰、除渣、壳或洗净）；分析新鲜样品可剪成碎丝或切成小块放乳钵中研磨。多汁样品也可放入匀浆机中捣碎；如分析干样品（根、茎、叶）需先杀青，即置于 105℃ 的烘箱中烘 15min 以终止样品中酶的活动；再降低烘箱的温度，维持在 70 ~ 80℃ 直到烘至恒重。再用粉碎机粉碎，全部无损地通过 80 ~ 100 目的筛子，贮存于具有磨口玻塞的广口瓶中，贴上标签，注明样品的采取地点、试验处理、采样日期和采样人姓名等。长期保存的样品，贮存瓶上的标签还需要涂蜡。为防止样品在贮存期间生虫，可在瓶中放置一点樟脑或对位二氯甲苯。

取样时还应考虑实验要求，如是为动态地了解供试植物在不同生育期的生理状况，常按植物的生育期采取样品进行分析。取样方法系在植物不同生育期调查植株的生育状况并区分为若干类型，计算出各种类型植株所占的百分比，再按此比例采取相应数目的样株作为平均样品。

二、实验阶段

实验阶段是指按实验方案进行操作、观察现象、测量数据的过程，同时应做好详细的记录。对于不同的实验项目，实验方法不尽相同，这已在第二部分各实验的方法中列出。但各实验中按方法操作、观察现象、测量数据和做好记录则是完成实验的共同内容，并应在实验前做好预习。

1. 实验预习

实验预习是顺利完成实验的保证，通过预习，清楚本次实验要做什么，怎么做和为什么这样做，才能有计划地安排好自己的实验。预习应备有专门的实验预习本。

2. 实验操作

实验操作是按实验操作程序和技术要求进行的。根据实验方法的要求，将材料及各试剂严格按照所需的数量和顺序添加，并反应足够的时间，切不可图快而颠倒进行或随意改变反应时间。操作中应注意提高基本实验技能，如：容量仪器的使用（定容、移液、滴定）应正确操作和读数；分析仪器使用应了解其使用方法后再操作，切忌乱动仪器（参见附录1）。操作中还应注意养成良好的实验习惯：边做、边看、边思、边记；合理安排实验时间；保持整洁的实验环境；节约使用一切实验用品；爱护仪器；听从教师指导；遵守实验室规则。

3. 现象观察

观察即用眼睛远“观”近“察”，直观地了解和认识事物的真实情况和本来面貌。植物生理生化实验中观察现象可分为观察各种实验反应中的现象和植物生命活动现象。

（1）观察各种实验反应中的现象

在各种测定反应中都会产生许多现象，如：颜色的产生和变化；沉淀的生成或溶解；气体的释放；溶液的分层；折光率的改变；体积、重量、大小的改变等。这些现象有时只是瞬间出现，应仔细观察、及时记录在专门的记录本上。

（2）观察生命活动现象

植物生命活动的外在表现是实验中的观察点，如：光合作用和呼吸作用中 O_2 与 CO_2 的释放或吸收；植物生长缺乏矿质元素的症状；单盐毒害对根的影响；激素引起的生长改变和植物受到不良环境危害后的表现等。观察到的这些现象应随时记录在专门的记录本上。

4. 数据及记录

植物生理生化实验中植物内含物质的定量检测 and 生命活动指标测定都由一定的数据定量表示。如：称量的重量（W）、定容体积（ml）、仪器的读数等都是测量中获取的原始数据。原始数据的读数应根据仪器的精确度准确读取有效数字（只读取一位不定数字），如：吸光度为 0.050 不能读成 0.05。应重复读数两次，记录两个有效数字，即使两个有效数字完全相同也要如实记录下来，因为记录上的每一个数字，都反映一次测量结果。对实验中获取的原始数据可设计一定的表格记录（参见第二部分各实验）。

三、实验结果的数据处理与分析

植物生理生化实验中获取的原始数据按照各实验的计算方法经计算或处理后得到结果。一般情况下，在定量分析的计算公式中 C 代表样品浓度或含量， V 代表样品第一次定容体积， V_1 代表测定时所取待测液体积（即反应液体积）， W 代表样品重量， T (t) 代表时间。

原始数据及结果还需进行统计分析。

1. 有效数字计算

分析测定过程中，往往要经过几个不同的测量环节，如：材料称重、定容、取一定量的溶液最后进行滴定，此过程最少要取四次数据，这四个数据的有效数字不完全相等。在进行计算时应按下列计算规则，合理地取舍各数字的有效数字位数，确保运算结果的正确。

(1) 加减法

进行数字加减时，最后结果所保留的小数点后的位数应与参与运算的各数中小数点后位数最少者相同，其尾数“四舍五入”。如： $0.124 + 1.2345 + 12.34 = 13.6985$ ，应取 13.70。

(2) 乘除法

进行数字乘除时，最后结果的有效数字应与参与运算的各数中有效数字位数最少者为准，而与小数点的位数无关，其尾数“四舍五入”。如： $1.23 \times 0.12 = 0.1476$ ，应取 0.15。

2. 误差分析

在分析测定中，由于受分析方法、测量仪器、所用试剂和人为因素等方面的限制，很难使测量值与客观存在的真实值完全一致，即分析过程中误差是客观存在的。

误差为实验分析的测定值与真实值之间的差值。误差越小，测定值越准确，即准确度越高。误差可用绝对误差和相对误差表示。

$$\text{绝对误差} = \text{测定值} - \text{真实值}$$

$$\text{相对误差} = \text{绝对误差} \div \text{真实值} \times 100\%$$

如：配制葡萄糖标准溶液时，用分析天平称得两份葡萄糖的重量各为 1.0000g 和 0.1000g。假定两者的真实值各为 1.0001g 和 0.1001g，则称量的绝对误差分别为：

$$1.0000 - 1.0001 = -0.0001\text{g}$$

$$0.1000 - 0.1001 = -0.0001\text{g}$$

它们的相对误差分别为：

$$-0.0001 \div 1.0000 \times 100\% = -0.01\%$$

$$-0.0001 \div 0.1000 \times 100\% = -0.1\%$$

由此可见，两份葡萄糖称量的绝对误差虽然相等，但当用相对误差表示时，就可看出第一份称量的准确度比第二份的准确度大 10 倍。显然，当被称量物体重量较大时，相对误差较小，称量的准确度就较高。因此，做标准曲线时，标准溶液的配制都是先称较多量的药品，配成母液后再稀释成所需浓度。

从上可见，应该用相对误差表示结果的准确度，但因真实值是并不知道的，因此，实际工作中无法求出分析的准确度，只得用精确度来评价分析的结果。

3. 偏差分析

在分析测定中，测试者常在相同条件下，对同一试样进行多次重复测定（称平行测定），所得结果不完全一致，每一测定值与真实值都有差别，但若取它们的平均值，就有可能更接近真实值，如果多次重复的测定值比较接近，表示测定结果的精确度较高。

精确度表示在相同条件下，进行多次实验的测定值相近的程度。一般用偏差来衡量分析结果的精确度。偏差也有绝对偏差和相对偏差两种表示方法。

绝对偏差 = 单次测定值 - 算术平均值（不计正负号）

相对偏差 = 绝对偏差 ÷ 算术平均值 × 100%

例如：分析某一材料糖含量，共重复测定 5 次，其结果分别为：16.1%，15.8%，16.3%，16.2%，15.6%，用来表示精确度的偏差可计算如下：

分析结果	算术平均值	个别测定的绝对偏差（不计正负）
16.1%	16.0%	0.1%
15.8%		0.2%
16.3%		0.3%
16.2%		0.2%
15.6%		0.4%

平均绝对偏差 = $(0.1\% + 0.2\% + 0.3\% + 0.2\% + 0.4\%) \div 5 = 0.24\%$

平均相对偏差 = $0.24 \div 16.0 \times 100\% = 1.5\%$

在实验中，有时只做两次平行测定，这时就应用下式表达结果的精确度：

两次分析结果的差值 ÷ 平均值 × 100%

另外，对实验结果的分析还可以做 t 检验和方差分析，具体可参看统计分析的书。

4. 实验结果的表述

生理生化实验中经常会遇到大量数据的处理和计算，为了明确、直观地表达这些数据的内在关系，常将实验结果用列表法和作图法来表示。

（1）列表法

用列表法处理实验数据时应注意：表格设计要求紧凑、简明并有标号和标题，有时还需紧接在标题下面加一详细的说明或在表格后加注释。在每一纵行数据的顶端注明所使用的单位，而不要在表格的每一行中都重复地书写数据的单位。

表格法的优点是简单，但不能表示出数值间连续变化的规律和实验数值范围内任意自变量与因变量的对应关系，故常与作图法混合应用。

（2）作图法

将实验数据用几何图形表示出来的方法称为作图法。图是数据的直观表现。植物生理生化实验中，一般常使用线图和柱图（见图 0-1）。连续性数据资料一般用线图表达，不连续性数值资料则用柱图表达。

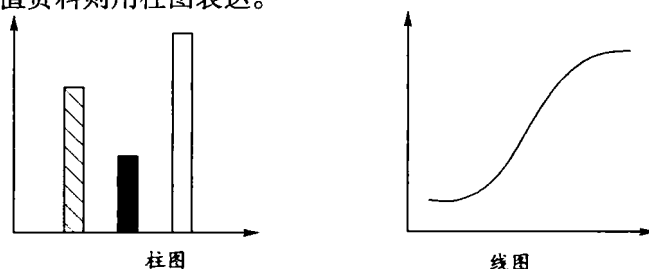


图 0-1 实验数据的图示法

作图时应注意：图应有明白、简洁的标题；应清楚地标明两个轴的计量单位。

表示层析、电泳图谱时，层析斑点、电泳区带形状、位置、颜色深浅都应与原物一致，并应有图的标题。如图 1. 小麦幼苗过氧化物同工酶酶谱。

四、实验报告

实验报告是每次实验完成后都应交的作业，它主要报道本次实验的过程和结果。实验报告是根据实验记录进行整理、计算、总结，对实验中的问题从理论上加以分析和讨论。它是使感性认识上升到理性认识的必要手段。因此，实验结束后应及时整理实验数据写出实验报告，它一般应包括以下几方面的内容：

1. 实验日期

2. 实验题目

3. 实验目的

实验目的应简单、明了。

4. 实验原理

简单说明实验所根据的理论。

5. 实验材料

指植物材料，应注明材料的植物名称、状况（如干样、鲜样）取样部位和预处理等情况。

6. 操作流程及注意事项

操作流程一般按照时间顺序进行，如：加 A → 加 B → 加 C；反应时间、温度、pH 或注意事项等可写在箭头上下或加括号说明。

7. 实验结果

(1) 原始数据记录

原始数据指实验测定值，不允许任意修改。原始数据少可直接列出，如分光光度法的 A、C、W、V 等；原始数据多应设计专门的表格。

(2) 结果

原始数据经计算（应列出计算过程）或整理后得到结果。如结果的数据多可列表或作图。

8. 结论或讨论

根据结果，进一步从理论上加以分析，最后做出结论，结论应有概括性，如不能直

接下结论的，可进行讨论。

一般而言，应以自己所得到的实验结果为依据做出结论或进行讨论；必要时，可参考理论推出的结果或其他人的结果，但不能篡改结果来适应结论。

思考题

- (1) 实验课的目的是什么？实验过程包括哪些内容？
- (2) 实验材料的采取有何意义？
- (3) 实验操作中应注意什么问题？应如何观察实验现象？
- (4) 误差分析和偏差分析有何意义？以一次实验结果进行偏差分析。
- (5) 名词：原始样品，分析样品，相对偏差，绝对误差。