

高等学校试用教材

植物生理生化实验

袁晓华 杨中汉 主编

高等教育出版社

高等学校试用教材

植物生理生化实验

袁晓华 杨中汉 主编

高等教育出版社

高等学校试用教材
植物生理生化实验
袁晓华 杨中汉 主编

高等教育出版社出版
新华书店北京发行所发行
北京印刷一厂印装

*

开本 850×1168 1/32 印张9.375 字数220,000

1983年3月第1版 1983年8月第1次印刷

印数 00,001—8,500

书号 13010·0861 定价 1.15元

序 言

这本实验教材，是为综合性大学和其他高等院校主修植物生理学和植物生物化学的高年级学生或研究生编写的，也可供从事植物生理生化方面工作的教师和科技人员参考。本书内容主要包括植物的物质代谢方面的实验，如糖类化合物、含氮类化合物、脂类化合物和一些酶的分离和活力等的测定方法；光合作用的实验，有植物色素含量、光合强度和光合磷酸化等的测定；呼吸作用的实验，有测定某些酶的活性、线粒体的分离和氧化磷酸化等；种子生理和生长发育方面的实验，有种子萌发过程中某些物质消长的变化，胚珠的离体受精，植物激素对形态建成、性别分化等的影响等。本书力求用生物化学中目前常用的实验技术，去研究植物生理学领域中的生理问题和代谢过程，以便使选修这门课程的学生，既能学到现代的基本实验技术，又能初步掌握从生理的角度去分析问题，为独立进行课题的研究打下一定的基础，避免实验技术与生理和代谢的研究彼此脱节。

但是，由于我们的设备和其他条件，以及实验课学时的限制，因此，本书只能从教学和培养学生实验技能的要求，选择实验内容，不可能容纳这门学科的所有实验，也不可能照顾到本学科各个方面的实验内容，同时，根据每学年的学时安排，只能选做其中的一部分，所选内容亦不尽相同。

本书所列实验，都要求学生自己处理实验材料，配制试剂，安装和调试有关的仪器，亲自操作和分析计算结果，也就是要求学生在教师指导下，亲自动手，独立地完成实验的各个环节。因此，选修这门实验课的学生，应具有一定的分析化学和基础生物化学实

验训练,在进行实验之前,还必需充分预习实验教材。

本书中所选的实验,一小部分是长期以来植物生理大实验课的内容,绝大部分是近年来陆续增加的新内容。在引进国外先进的实验方法时,考虑到目前国内植物生理学科的现有条件和设备,力求使这些方法成为切实可行。书中所列的实验,都是我们自己亲自实践过的,有的是经过了几届学生的实验课教学,有的是教师在科研工作中经常使用的方法。

本书的大部分编写工作是由袁晓华、杨中汉两同志承担的。在编写过程中,曹宗巽教授给予了热情关怀和指导,并审阅和修改了部分实验;梅镇安教授审阅了实验内容,提出了许多宝贵意见,吴相钰教授最后对全书作了统一审校和修改润饰。

黄展同志为本书描绘了全部插图,并得到高等教育出版社绘图科符昂扬同志的指导,特此致谢。

由于我们的条件和水平的限制,书中不足甚至错误之处在所难免,敬请读者指正。

编者序于北京大学

1982年6月

实验执笔人员

袁晓华 实验 3, 5, 12, 13, 15, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 及附录的编辑。

杨中汉 实验 1, 2, 6, 7, 11。

朱广廉 实验 8, 9, 28, 30, 31, 32。

王兰仙 实验 4, 14, 16。

李锡涇 实验 18, 23。

徐典朋 实验 10。

梅慧生 实验 17。

容寿榆 实验 19。

吴光耀 实验 21。

钟海文 实验 29。

何笃修、方昭希、刘厚田、戴尧仁、张爱琴等同志虽未能参加编写工作,但是参加了作为本书基础的教学和科研工作,以及某些实验方法的建立。

目 录

实验 1	植物组织中糖含量的测定——几种比色法	1
(甲)	蒽酮比色法	1
(乙)	二硝基水杨酸法	6
(丙)	硫酸-酚法测定糖含量	9
实验 2	糖的薄层层析	12
实验 3	大豆和小麦种子中淀粉含量的比较	19
实验 4	植物材料中总氮量的测定	24
实验 5	谷类作物种子中赖氨酸含量的测定	32
实验 6	植物可溶性蛋白的分离和酸性磷酸酯酶同工酶的鉴定 ——淀粉胶电泳	36
实验 7	用亲和层析法分离和纯化刀豆球蛋白 A(Con A)	41
实验 8	用等电聚焦法测定果糖二磷酸酯酶(FBP 酶)的等电点	50
实验 9	用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定 植物蛋白质的分子量	57
实验 10	植物组蛋白和 HMG 蛋白质的分离	66
实验 11	植物糖蛋白中单糖成分的气液色谱分析	71
实验 12	豌豆幼苗 RNA 的分离和降解	77
实验 13	豌豆幼苗 RNA 降解产物的分析	90
实验 14	油料种子中脂类的脂肪酸组成的分析	98
实验 15	微量元素锌和锰对番茄生长的影响	116
实验 16	满江红固氮能力的测定	122
实验 17	植物根系活力的测定	128
实验 18	植物净光合强度的测定	134
实验 19	叶绿素 a 与 b 的提纯和鉴定	148
实验 20	菠菜叶片中果糖-1, 6-双磷酸酯酶的分离和提纯	159
附:	果糖-1, 6-双磷酸钡盐转成钠盐法	171
实验 21	双磷酸核酮糖羧化酶活性的测定	173

实验 22	叶绿体中甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的测定	177
实验 23	叶绿体的光合磷酸化	182
实验 24	绿豆线粒体的呼吸和氧化磷酸化	190
实验 25	绿豆线粒体中琥珀酸脱氢酶的动力学性质	199
附:	一、Folin-酚法测定蛋白质含量	207
	二、紫外吸收法测定蛋白质含量	208
实验 26	小麦萌发前后还原糖含量的变化	210
实验 27	水稻萌发前后游离氨基酸的变化	217
实验 28	小麦幼苗中可溶性蛋白的分离, 以及过氧化物酶、 酯酶和淀粉酶的同工酶的鉴定	233
附:	一、丙烯酰胺原料的纯化	245
	二、预电泳	245
	三、电泳脱色	245
实验 29	植物激素对植物形态建成的作用	247
实验 30	赤霉素诱导大麦糊粉层细胞内 α -淀粉酶的形成	253
实验 31	赤霉素(GA ₃)和矮壮素(CCC)对黄瓜性别分化的影响	259
实验 32	烟草胚珠的离体受精	265
附录 1	摩尔数与摩尔浓度	269
附录 2	常用酸、碱和其它化合物的浓度	272
附录 3	几种 pH 标准溶液的组成和性质	272
附录 4	硫酸铵饱和浓度换算表	270
附录 5	酸碱指示剂	273
附录 6	一些常用的缓冲溶液	275
附录 7	离心力(g)与离心机转速测算表	281
附录 8	几种蛋白质的物理性质	282
附录 9	一些化合物的摩尔消光系数(ϵ)	283
附录 10	常用离子交换树脂的某些理化性质	284
附录 11	常用的离子交换纤维素	284
附录 12	葡聚糖和生物-胶的交换剂	285
附录 13	分子筛物质的特性	286
附录 14	实验中常见化合物的分子量	287

19 20 9
 2.7 7.84

0.58
 1090
 1490
 实验 1
 1490
 1490

1507 1500 1500 1498 1500 1560
 植物组织中糖含量的测定
 ——几种比色法
 10 min
 15 min
 1500 1490

目的与要求

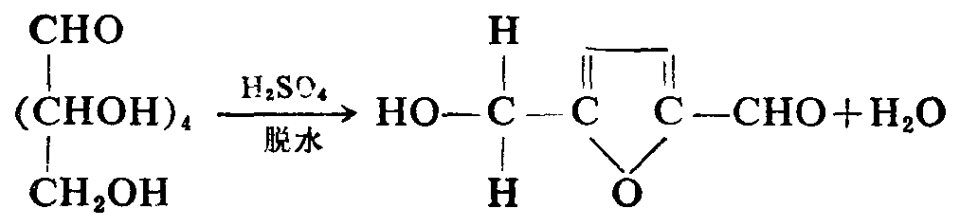
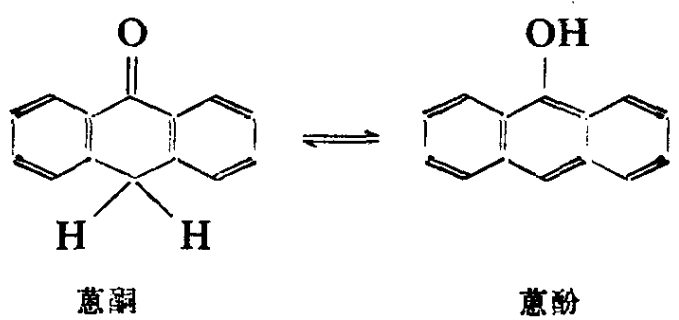
学会用几种比色法测定植物组织中糖含量的原理和方法。

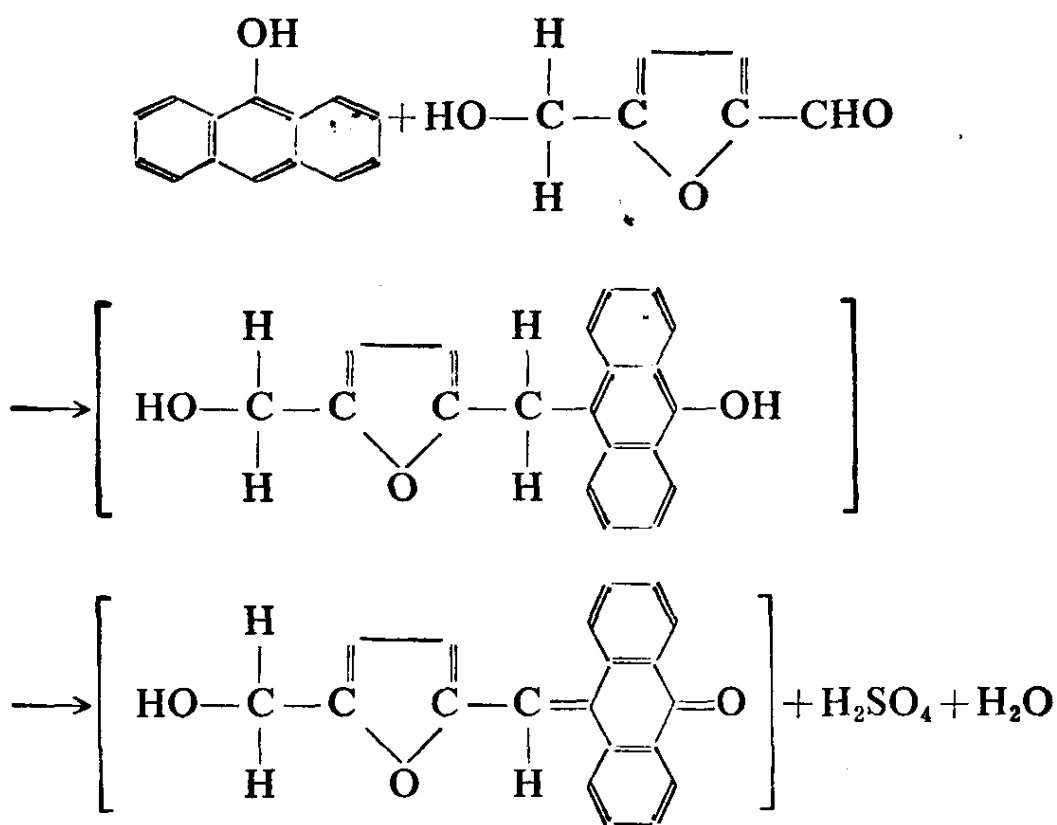
(甲) 蒽酮比色法

原 理

蒽酮与碳水化合物在浓硫酸存在下发生反应，产生蓝绿色的化合物，其颜色的深浅与碳水化合物的含量有一定量的关系。这就是蒽酮比色法的原理。能与蒽酮发生颜色反应的糖类，包括五碳糖(如木糖、核糖和阿拉伯糖)、六碳糖(如葡萄糖、果糖、山梨糖、半乳糖和甘露糖等)、蔗糖、糖元、多缩葡萄糖和苷等。

蒽酮反应的机理如下：碳水化合物及其衍生物经浓硫酸处理后，脱水形成羧醛，继续脱水形成环后，产生糠醛衍生物(如在六碳糖中形成甲基糠醛)，蒽酮即与之缩合而成有色物质。





浅蓝色物质

蒽酮反应的颜色深浅，随温度条件和加温时间而变化。葡萄糖显色高峰在 100°C 下，加热 10 分钟后出现；而核糖显色高峰在同样温度下，加热 3 分钟后出现。因此，应用此法时，反应条件的一致是很重要的。

不同性质的糖与蒽酮反应，其颜色的强度是不同的，并且各种糖的有效浓度范围也不相同。因此，待测样品的稀释倍数，应使含糖量在有效范围内，才能获得正确的结果。在一般情况下，不同糖的混合液与蒽酮作用时，所产生的颜色强度和混合液中个别糖的颜色强度的总和是符合的。因此，在应用时，由于其他糖的存在而发生的干扰并不很大，可根据实验目的考虑选用何种糖作为分析样品的标准。

关于一般糖的浓度范围、加热时间及其变异如下：

六碳糖胺与蒽酮反应不产生颜色。色氨酸与蒽酮反应产生红

糖	加热时间 (分)	有效范围 ($\mu\text{g/ml}$)	混合的变异* ($\pm\%$)
D-葡萄糖	10	10—100	3.8
D-果糖	10	10—80	2.0
蔗糖	10	10—80	3.2
L-山梨糖	10	10—100	2.0
D-半乳糖	10	10—125	2.8
D-甘露糖	10	10—125	3.4
L-鼠李糖	3	10—70	2.0
L-岩藻糖	3	10—70	2.0
D-木糖	3	3—300	10.7
D-核糖	3	35—350	4.5
L-阿拉伯糖	3	40—400	5.0

* 以有效浓度范围内数值的百分比计算

色，在 530 毫微米处有最大的吸收。所以，当样品中含有大量的色氨酸时，由于它同糠醛争着与葱酮反应，从而减少 620 毫微米处所产生的颜色。

材料与设备

一、材料

将植物材料的提取液除去蛋白和色素(详见下文)。

二、设备

1. 水浴锅及温度计;
2. 50 毫升酸式滴定管;
3. 光电比色计或分光光度计。

三、试剂

1. 葱酮试剂 准确称取 0.2 克葱酮结晶粉末和 1 克硫脲(阻氧化剂)放入烧杯中，向烧杯中缓缓地加入 100 毫升浓硫酸(分析纯试剂)，边加边搅拌。溶解后呈黄色透明溶液，贮存于棕色瓶中。最好当天使用当天配制，在冰箱中保存，可以延长使用时间(约二

周)。

2. 标准葡萄糖母液(1毫克/毫升) 在分析天平上准确称取100毫克(0.1000克,准确到小数后第四位)分析纯无水葡萄糖,溶于蒸馏水中,定容至100毫升。

操作程序

一、标准曲线的制作

配制每毫升含10, 20, 40, 60, 80, 100微克的葡萄糖标准溶液各10毫升。将试管编号,依次将每管内加入1毫升上述葡萄糖标准溶液及5毫升冷的蒽酮试剂,震荡使之完全混合。为防止水分蒸发,试管口盖上一个玻璃球,在沸水浴中加热10分钟,取出后在自来水中冷却。20分钟后,在分光光度计上620毫微米下,测定各溶液的光密度。各种浓度做三个重复。注意必须将比色杯内的水空干,有水会发生混浊。每一样品比色后,可用少量的下一待测样品洗比色杯,切不可用水洗。由于蒽酮试剂本身有颜色,所以用蒸馏水代替糖液作为空白对照。以光密度值为纵坐标,糖溶液浓度为横坐标,在坐标纸上绘制标准曲线。至少必须有五个点形成通过原点的直线,并计算出该曲线的斜率(斜率=光密度/单位浓度,见图1-1)。

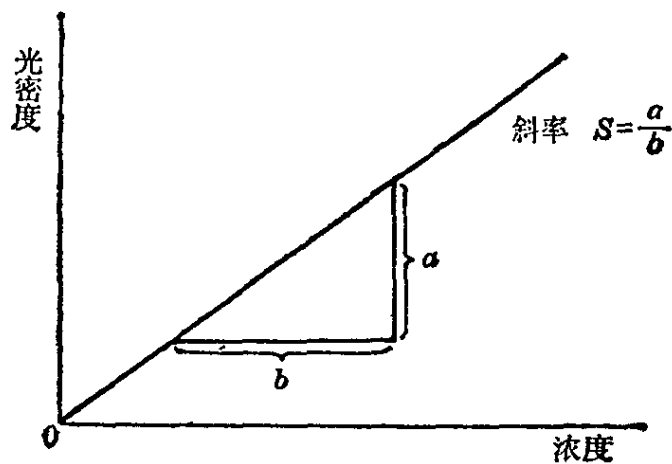


图 1-1 标准曲线斜率计算法

二、测定样品的含糖量

取 1 毫升植物样品提取液, 加入 5 毫升蒽酮试剂, 混匀后立即置于沸水中, 煮沸 10 分钟, 取出用自来水冷却后比色。其他条件与标准曲线相同。如果提取液中存在很多可溶性蛋白质和色素, 会影响比色。可用 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 作为沉淀剂, 既可沉淀蛋白质, 又可吸附色素。用硫酸锌 (ZnSO_4) 中和后, 再离心, 可获得较好的效果。

计 算

根据光密度值从标准曲线上查出相应的糖含量。按下列公式算出样品含糖量:

$$X = \frac{a \cdot b}{c} \times 100$$

X 为样品中含总糖量的百分数;

a 为样品待测液的稀释倍数;

b 为样品的待测液中含总糖毫克数;

c 为样品重量(克)。

也可用光密度值被标准曲线斜率除, 求出待测液中糖毫克数。

思 考 题

1. 本法是否可以用来测定水果、糖蜜及蔬菜的总糖含量? 是否可以用来测定这些物质中的还原糖含量? 为什么?
2. 72 型分光光度计或比色计的原理及操作注意事项是什么?
3. 当比色液滴出或溢出比色杯时, 能否用滤纸擦, 为什么?

参 考 文 献

1. E. W. Yemm and A. J. Willis, 1954. The estimation of carbohydrate in plants by Anthrone. *Biochem. J.* 57, 508.
2. J. E. Hodge and B. T. HoFreiter, Determination of Reducing

sugars and carbohydrate. in "Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. 1, P. 388." Academic Press.

(乙) 二硝基水杨酸法

原 理

3,5-二硝基水杨酸与还原糖共热后, 被还原成棕红色的氨基化合物, 在一定范围内, 还原糖的量和反应液的颜色强度成比例关系; 利用比色法可测知样品的含糖量。

该方法为半微量定糖法, 操作简便, 快速, 较少受其他杂质的干扰。

材料与设备

一、材料

桃子或葡萄。

二、设备

- | | |
|------------|--------------|
| 1. 试管及试管架; | 4. 白瓷板; |
| 2. 碱滴定管; | 5. 恒温水浴; |
| 3. 水浴锅; | 6. 72型分光光度计。 |

三、试剂

1. 3,5-二硝基水杨酸试剂(Dinitrosalicylic acid reagent, 以下称 DNS 试剂)

甲液——溶解 6.9 克结晶的重蒸馏的酚于 15.2 毫升 10% 氢氧化钠中, 并稀释至 69 毫升, 在此溶液中加入 6.9 克亚硫酸氢钠。

乙液——称取 225 克酒石酸钾钠, 加入到 300 毫升 10% 氢氧化钠中, 再加入 880 毫升 1% 3,5-二硝基水杨酸溶液。

将甲液与乙液相混合,即得黄色试剂,贮于棕色试剂瓶中。在室温下,放置7—10天以后使用。

2. 0.1%葡萄糖标准液(见实验1)。
3. 6*N* 盐酸溶液。
4. 10%氢氧化钠溶液。
5. 碘试剂(碘化钾-碘溶液) 将碘化钾20克及碘10克溶于100毫升水中。使用前需稀释10倍。
6. 酚酞指示剂。
7. 85%乙醇。

操 作 程 序

一、葡萄糖标准曲线的制定

取9支大试管,依次加入0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.6毫升的标准葡萄糖溶液,加蒸馏水补足至2毫升,再在每支试管中加入1.5毫升DNS试剂。以2毫升蒸馏水作为空白对照,同样加入1.5毫升DNS试剂,摇匀后放在沸水浴中加热5分钟,立即用自来水冷却。向每管加入21.5毫升蒸馏水,使总体积为25毫升,混匀后,在72型分光光度计上520毫微米下比色测定。以空白对照管溶液调零点,记录光密度值。以葡萄糖浓度为横座标,光密度值为纵座标,绘制出标准曲线。

二、水果中总糖和还原糖的测定

1. 样品中还原糖的提取 准确称取10克桃肉或葡萄(去核),磨碎(或捣碎),加入85%乙醇50毫升,混匀,在50°C恒温水浴中保温30分钟,过滤,滤渣再用85%乙醇提取二次。将滤液合并,蒸去乙醇,加少量水,移入100毫升容量瓶中,用水稀释至刻度,备用。

2. 样品中总糖的水解及提取 准确称取桃肉或葡萄(去核)10克,磨碎,转入100毫升锥形瓶中,用15毫升蒸馏水洗涤研钵,洗涤液一并转入锥形瓶中。加入10毫升6*N*盐酸,混匀,在沸水浴中加热半小时后,用碘化钾-碘溶液检查淀粉水解程度。若已水解完全,则不呈蓝色。冷却后加入酚酞指示剂一滴,以10%氢氧化钠中和至溶液呈微红色,过滤并定容至100毫升。再精确吸取上述溶液10毫升,放入50毫升容量瓶中,稀释至刻度,备用。

3. 样品中含糖量的测定 取7支大试管,编号,还原糖和总糖各取三份平行样品测定,一支空白对照。按标准曲线制作要求,加入1毫升样品、1毫升蒸馏水和1.5毫升DNS试剂,空白以2毫升蒸馏水代替样品溶液,在沸水浴中加热5分钟,自来水冷却后各加入21.5毫升蒸馏水,混匀,在520毫微米下测定光密度值,在标准曲线上查出相应的还原糖含量。按下述公式计算出水果的还原糖和总糖的百分含量。

$$\text{还原糖}\% = \frac{\text{还原糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品重量}} \times 100$$

$$\text{总糖}\% = \frac{\text{水解后还原糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品重量}} \times 100$$

思 考 题

1. 比色测定时为什么要设计空白管?
2. 总糖包括哪些部分? 哪些化合物? 如何断定水解完全与否? 如果没有特殊简便的检验办法(非淀粉类多糖), 该如何办?

参 考 文 献

1. 北京大学生物系生物化学教研室, 1979. 生物化学实验指导, 第22—23页, 人民教育出版社。

2. Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. 31:426.

(丙) 硫酸-酚法测定糖含量

原 理

糖类物质与硫酸作用脱水, 生成糠醛或糠醛的衍生物。此衍生物遇芳香族酚类或胺类化合物, 能缩合生成有色物质。这就是硫酸-酚法测定糖的原理。薄层层析中, 糖的显色反应多半属于此类。

这种方法简单, 迅速, 灵敏度高, 重复性好, 不要求特殊条件, 几乎可应用于任何还原糖及其衍生物的测定。用以测定从纸层析或薄层层析斑点上洗脱下的糖时, 效果特别好, 因为这时没有展层溶剂的干扰。除单糖外, 寡糖、多糖都能用此法测定, 所产生的颜色稳定, 在适当的条件下, 此法准确到 $\pm 2\%$ 。

材料与设备

一、材料

植物组织提取液(除去色素和蛋白质的方法, 见实验1)或实验2中用薄层层析中分离的单糖样品。

二、设备

1. 150×18mm 大试管(最好硬质玻璃试管);
2. 721型分光光度计或581G光电比色计;
3. 木制大孔试管架;
4. 恒温水浴。

三、试剂

1. 硫酸(A. R., 比重1.84)。
2. 5%酚水溶液 称取重蒸酚(分析纯)5克用蒸馏水溶解,