

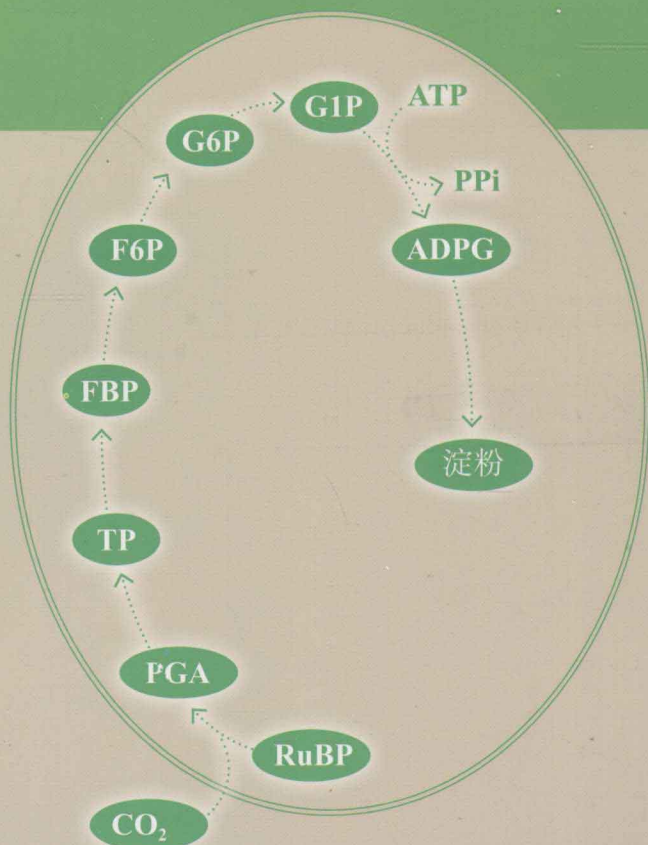
□ 全国高等学校“十二五”农林规划教材



植物生理学实验教程

Experimental Course of Plant Physiology

主编 苍晶 赵会杰



植物生理学实验教程

Z H I W U S H E N G L I X U E S H I Y A N J I A O C H E N G

主 编 苍 晶 (东北农业大学) 赵会杰 (河南农业大学)

副主编 张 达 (东北农业大学) 张东向 (齐齐哈尔大学)
张治安 (吉林农业大学) 丁国华 (哈尔滨师范大学)
李秀霞 (佳木斯大学)

参 编 于 晶 (东北农业大学) 王军虹 (东北农业大学)
赫福霞 (东北农业大学) 李富恒 (东北农业大学)
梁喜龙 (黑龙江八一农垦大学) 赵长江 (黑龙江八一农垦大学)
徐庆华 (东北农业大学) 彭立新 (天津农学院)
金忠民 (齐齐哈尔大学) 邵 红 (佳木斯大学)
于龙凤 (临沧师范高等专科学校) 孟 婧 (东北农业大学)
刘丽杰 (齐齐哈尔大学) 卢宝伟 (黑龙江生态工程职业学院)
王多佳 (东北农业大学)

主 审 郝再彬 (桂林理工大学)

校 对 朱祥春 (东北农业大学)

内容简介

本书是在多年的植物生理学实验教学综合改革基础上编写而成。全书包括实验训练综合指导、72个实验项目和附录三部分。实验训练综合指导主要介绍了植物生理实验基本要求与常识；实验项目涵盖了细胞生理、水分生理、矿质营养、光合作用与呼吸作用、有机物代谢、生长物质、植物生长发育、逆境生理8个方面的基础性与综合性实验及15个研究设计性实验（含参考选题），涉及植物生理学的基本原理、基础知识和基本实验技能与综合实践应用。通过每章的“学习引导”，概括本章实验技术的应用，引导各基础性实验的组合及综合应用训练；每个实验后设有“学以致用”小栏目，激发学生兴趣，启发学生思考；通过每章思考与作业题，帮助学生理解并及时复习相应内容。

本书配有数字课程，其提供了教材相应内容的36个扩展实验或相关知识，可供学生对不同方法进行比较和思考，也可对不同层次学生及不同条件的学校提供不同的教学选择；同时提供了部分实验教学录像及多媒体课件和彩色照片；也为学生自学和开展科技创新性研究提供必要的参考资料。

该书可作为全国高等院校生物类及农学类等相关专业的本科生和研究生实验教学指导教材，也可作为植物生理学相关科技工作者的研究参考书。

图书在版编目（C I P）数据

植物生理学实验教程 / 苍晶, 赵会杰主编. -- 北京 : 高等教育出版社, 2013.4

ISBN 978-7-04-036936-6

I. ①植… II. ①苍…②赵… III. ①植物生理学—实验—高等学校—教材 IV. ①Q945-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2013）第 048636 号

策划编辑 潘 超 责任编辑 李 融 封面设计 张 楠 责任印制 赵义民

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 100120
印 刷 北京东君印刷有限公司
开 本 787mm×1092mm 1/16
印 张 13.5
字 数 300千字
购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598
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>
版 次 2013年4月第1版
印 次 2013年4月第1次印刷
定 价 27.50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 36936-00

数字课程（基础版）

植物生理学 实验教程

登录方法：

1. 访问 <http://res.hep.com.cn/36936>
2. 输入数字课程账号（见封底明码）、密码
3. 点击“LOGIN”、“进入 4A”
4. 进入学习中心，选择课程

账号自登录之日起一年内有效，过期作废。

使用本账号如有任何问题，

请发邮件至：lifescience@pub.hep.cn

登录以获取更多学习资源！

植物生理学实验教程

苍晶 赵会杰 主编

内容介绍 | 纸质教材 | 相关资料 | 版权信息 | 联系方式

4A

学习中心

欢迎登录

账号

密码

LOGIN

■ 内容介绍

本数字课程与《植物生理学实验教程》配套使用，是纸质教材的拓展和补充。该数字课程不仅包含植物生理学的理论知识，还提供了实验教材相应内容的 36 个扩展实验，可供学生对不同方法进行比较和思考，也可对不同层次的学生及不同条件的学校提供不同的教学选择；同时提供了植物生理学实验的部分教学录像及多媒体课件；也为学生自学、开展科技创新性研究提供必要的参考资料。

高等教育出版社版权所有 2013

<http://res.hep.com.cn/36936>

数字资源目录及编写者

实验训练综合指导

数字资源 0-1:离心技术基本原理与应用(张东向,金忠民)

数字资源 0-2:电泳技术基本原理与应用(张东向,金忠民)

数字资源 0-3:层析技术基本原理与应用(张东向,金忠民)

数字资源 0-4:研究设计性实验学生论文范例(于晶,苍晶)

第1章 细胞生理

数字资源 1-1:组织(细胞)化学染色技术(赵长江)

数字资源 1-2:细胞荧光检测技术(赵长江)

数字资源 1-3:鬼笔环肽(赵长江)

第2章 水分生理

数字资源 2-1:压力室法测定植物组织水势(于龙凤)

数字资源 2-2:热电偶温度计法测定植物组织水势(于龙凤)

第3章 矿质营养

数字资源 3-1:无土栽培技术(徐庆华)

数字资源 3-2:设施农业(徐庆华)

数字资源 3-3: α -萘胺氧化法测定植物根系活力(徐庆华,彭立新)

数字资源 3-4:离体法测定硝酸还原酶活性(徐庆华,彭立新)

第4章 光合作用与呼吸作用

数字资源 4-1:叶绿体色素的理化性质与分离(梁喜龙)

数字资源 4-2:叶绿素荧光分析技术及应用(于晶)

数字资源 4-3:蛋白质复合体非变性凝胶电泳技术及应用(于晶)

数字资源 4-4:同位素法测定 RuBPCase 活性(丁国华)

数字资源 4-5:二氯靛酚还原法测定乙醇酸氧化酶活性(丁国华)

数字资源 4-6:植物光合速率和呼吸速率的测定(I 红外 CO_2 分析仪法、II 便携式光合测定仪法、III 改良半叶法)(梁喜龙)

第5章 有机物代谢

数字资源 5-1:蒽酮法测定可溶性糖含量(王多佳)

- 数字资源 5-2: 斐林试剂法测定还原糖含量(王多佳)
- 数字资源 5-3: 苯酚法测定还原糖含量(王多佳)
- 数字资源 5-4: 凯氏定氮法测定蛋白质含量(王多佳)
- 数字资源 5-5: Folin-酚比色法测定蛋白质含量(王多佳)
- 数字资源 5-6: 双缩脲法测定蛋白质含量(王多佳)
- 数字资源 5-7: 紫外吸收法测定蛋白质含量(王多佳)
- 数字资源 5-8: 薄层层析法分离纯化大豆异黄酮(刘丽杰, 卢宝伟)
- 数字资源 5-9: 高效液相色谱法测定大豆异黄酮含量(刘丽杰, 卢宝伟)
- 数字资源 5-10: 电化学发光法测定大豆异黄酮含量(刘丽杰, 卢宝伟)
- 数字资源 5-11: 烟碱的分析方法(张东向)
- 数字资源 5-12: 植物次生代谢(苍晶, 赵会杰)

第6章 生长物质

- 数字资源 6-1: 植物激素的生物鉴定(I 生长素的生物鉴定、II 赤霉素的生物鉴定、III 细胞分裂素的生物鉴定、IV 脱落酸的生物鉴定、V 乙烯的生物鉴定)(李秀霞, 邵红)
- 数字资源 6-2: 植物激素提取、分析的基础知识(于晶)

第7章 植物生长发育

- 数字资源 7-1: 植物组织培养的应用(赫福霞, 赵会杰)

第8章 逆境生理

- 数字资源 8-1: H_2O_2 的激光共聚焦显微检测(张治安)
- 数字资源 8-2: 紫外分光光度法测定还原型抗坏血酸含量(张治安)
- 数字资源 8-3: 2,6-二氯酚滴定法测定还原型抗坏血酸含量(张治安)
- 数字资源 8-4: 碘量滴定法测定还原型抗坏血酸含量(张治安)
- 数字资源 8-5: 2,4-二硝基苯肼比色法测定还原型抗坏血酸含量(张治安)
- 数字资源 8-6: 高效液相色谱法测定还原型抗坏血酸含量(张治安)

第9章 植物生理学研究技术拓展

- 数字资源 9-1: 膜片钳技术及其在植物生理学研究中的应用(张达)
- 数字资源 9-2: 非损伤微测技术及其在植物生理学研究中的应用(于晶)

附录

- 数字资源 10-1: 植物生理学常用仪器、设备操作要点(张达)
- 数字资源 10-2: 标准计量单位及其换算(张达)
- 数字资源 10-3: 常用固态酸、碱、盐的物质的量浓度配制参考表(张达)

前言

植物生理学实验技术是验证和探索植物生命活动规律的重要手段,植物生理学的快速发展有赖于实验技术的不断创新。通过实验教学不仅能够加深学生对理论知识的理解,而且对于培养学生的观察和动手能力、分析和解决问题能力,以及科研创新能力,具有重要意义。为了适应新世纪我国高等学校研究应用型人才培养的需要,我们在多年实验教学综合改革基础上编写了这本《植物生理学实验教程》,其内容和编写思路特别注重对学生综合实践能力和创新意识的培养,体现植物生理实验教学“基础性、综合性、研究创新性、系统应用性”有机融合的创新理念。该教材具有较强的可操作性和较好的系统性、先进性与实用性,其主要特色如下:

(1) 内容体系完整,综合训练实用。全书分三部分,一是实验训练综合指导,主要介绍了实验样品和数据的采集与处理、实验报告(论文)的撰写和答辩、“三性(综合性、设计性、研究创新性)实验”的原则及选题、实验室安全常识等;二是实验项目,共编排 72 个实验,其中基础性与综合性实验 57 个,结合生活、生产实际的研究设计性实验 15 个(含参考选题);三是附录,主要介绍了常用数据表、常用试剂的配制方法等。

(2) 项目组合优化,经典现代融合。在实验选材上,既保留一些对加强学生基本技能训练行之有效的传统、经典实验,同时,通过综合性实验项目,将一些单个小实验有机结合,系统探讨植物生理生化相关问题,使学生深入理解实验、了解其应用,启发学生对实验方案综合设计的创新思维,培养其综合实践能力。实验方法适当引入了一些现代植物生理技术手段,如荧光标记、叶绿素荧光、酶联免疫、气相和液相色谱、组织培养等技术。

(3) 栏目设计新颖,引导学习应用。每章设置的“本章学习引导”,概括了本章实验技术的应用,引导各基础性实验的组合及综合应用训练;每个实验后的“学以致用”小栏目,可激发学生兴趣,启发思考,拓展技术理论应用;每章的思考与作业题,可帮助学生理解并及时掌握相应内容。

(4) 出版形式现代,纸质数字结合。为了方便学生灵活自主学习,本教材配套制作了“植物生理学实验教程”数字资源。该数字课程不仅包含植物生理学的理论内容,还提供了实验教材相应内容的 36 个扩展实验,可供学生对不同方法进行比较和思考,也可对不同层次学生及不同条件的学校提供不同的教学选择;同时提供了植物生理学实验部分教学录像及多媒体课件;也为学生自学、开展科技创新性研究提供必要的参考资料。

该书由多年从事植物生理学教学和科研的教师编写,汇集了丰富的实践经验和研究成果。本书编写分工如下:实验训练综合指导,张达、张东向、金忠民;第一章,苍晶、王军虹、赵长江;第二章,张达、于龙凤;第三章,张达、徐庆华、彭立新;第四章,于晶、张东向、丁国华、梁喜龙;第五

章,张达、王多佳、刘丽杰、卢宝伟、张东向、苍晶;第六章,于晶、李秀霞、邵红、于晶;第七章,赫福霞、赵会杰;第八章,于晶、张治安;第九章,苍晶、李富恒、于晶;附录,张达、孟婧、于晶。全书由苍晶、赵会杰统稿。感谢朱祥春高级实验师对书稿的校对,感谢郝再彬教授对书稿的审阅。本书编写过程得到高等教育出版社生命科学与医学出版事业部的大力支持和帮助,在此表示衷心感谢。

由于编者水平和时间有限,书中纰漏和错误在所难免,欢迎读者批评指正。

编 者

2012 年 12 月于东北农业大学

目 录

实验训练综合指导 1

- 一、实验材料的处理与保存 1
- 二、实验数据的处理与分析 6
- 三、实验记录与实验报告(论文)的撰写 7
- 四、“三性”实验及其实施原则 10
- 五、实验室安全 13
- 本章思考与作业 14

第1章 细胞生理 15

- 本章学习引导 15
- 实验1 细胞色素氧化酶的组织化学鉴定 16
- 实验2 酸性磷酸酯酶的组织化学鉴定 17
- 实验3 三磷酸腺苷酶的组织化学鉴定 19
- 实验4 植物肌动蛋白细胞骨架的荧光标记 21
- 实验5 植物微管蛋白的免疫荧光染色 22
- 实验6 荧光探针法检测气孔保卫细胞中的游离钙 24
- 本章思考与作业 26

第2章 水分生理 28

- 本章学习引导 28
- 实验7 植物组织自由水和束缚水含量的测定 29
- 实验8 植物组织汁液浓度(可溶性固形物)的测定 32
- 实验9 植物组织水势的测定 34
- 实验10 植物组织渗透势的测定 37
- 实验11 K^+ 对气孔运动的影响 39

本章思考与作业 41

第3章 矿质营养 42

- 本章学习引导 42
- 实验12 植物的溶液培养及其缺素观察 43
- 实验13 植物根系活力的测定 45
- 实验14 植物体内硝态氮的测定 48
- 实验15 硝酸还原酶活力的测定 50
- 实验16 原子吸收光谱法测定植物组织矿质元素 53
- 本章思考与作业 55

第4章 光合作用与呼吸作用 56

- 本章学习引导 56
- 实验17 叶绿体色素含量的测定 57
- 实验18 叶绿体的分离及离体叶绿体对染料的还原作用(希尔反应) 60
- 实验19 叶绿素荧光参数的测定 62
- 实验20 类囊体膜蛋白复合体的分离与分析 64
- 实验21 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶活性测定 67
- 实验22 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性测定 70
- 实验23 乙醇酸氧化酶活性测定 72
- 实验24 叶绿体中甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性测定 74
- 实验25 氧电极法测定植物光合速率和呼吸速率 77
- 本章思考与作业 80

第5章 有机物代谢 82

本章学习引导 82

- 实验 26 还原糖含量测定 83
- 实验 27 可溶性蛋白质含量测定 85
- 实验 28 有机酸含量测定 88
- 实验 29 种子粗脂肪含量测定 90
- 实验 30 谷物种子赖氨酸含量测定 92
- 实验 31 植物组织总黄酮含量测定 95
- 实验 32 烟碱含量测定 97
- 实验 33 植物组织 ATP 酶活性测定 99
- 实验 34 谷氨酰胺合成酶活性测定 102
- 实验 35 苯丙氨酸解氨酶活性测定 105

本章思考与作业 106

第6章 生长物质 108

本章学习引导 108

- 实验 36 植物激素的提取及纯化 109
- 实验 37 植物激素的酶联免疫测定 110
- 实验 38 液相色谱法测定生长素含量 113
- 实验 39 气相色谱法测定乙烯含量 115
- 实验 40 植物内源激素脱落酸和赤霉素的提取、分离及测定 117
- 实验 41 赤霉素诱导 α -淀粉酶的合成 120

本章思考与作业 122

第7章 植物生长发育 123

本章学习引导 123

- 实验 42 花粉活力测定 124
- 实验 43 种子生活力快速测定 126
- 实验 44 谷物种子萌发时淀粉酶活力的测定 131
- 实验 45 愈伤组织的形成与分化 134

本章思考与作业 138

第8章 逆境生理 140

本章学习引导 140

- 实验 46 电导仪法测定植物细胞质膜透性 141

- 实验 47 游离脯氨酸含量测定 143

- 实验 48 丙二醛含量测定 145

- 实验 49 超氧化物歧化酶活性测定 147

- 实验 50 过氧化物酶活性测定 150

- 实验 51 过氧化氢酶活性测定 151

- 实验 52 多酚氧化酶活性测定 153

- 实验 53 过氧化氢含量测定 156

- 实验 54 超氧阴离子含量测定 158

- 实验 55 还原型谷胱甘肽含量测定 160

- 实验 56 还原型抗坏血酸含量测定 163

- 实验 57 膜脂脂肪酸含量测定 165

本章思考与作业 167

第9章 研究设计性实验 169

本章学习引导 169

- 实验 58 植物缺素培养的形态观察及其生理代谢分析 170
- 实验 59 植物对低温胁迫生理适应的研究 173
- 实验 60 CaCl_2 在提高作物抗旱性中的作用 176
- 实验 61 不同种作物光合能力的比较研究 177
- 实验 62 外源激素对植物幼苗生长及抗冷性影响的研究 179
- 实验 63 不同抗性作物品种苗期耐逆性的筛选鉴定 180
- 实验 64 逆境胁迫对作物幼苗抗氧化酶影响的研究 181
- 实验 65 逆境胁迫对作物幼苗脯氨酸代谢影响的研究 182
- 实验 66 外界因素对植物叶片气孔运动的调节(参考选题) 184
- 实验 67 外界因素调控种子萌发的研究(参考选题) 184
- 实验 68 果蔬组织部位、货架期及烹调方式等对

· X · 目 录

其营养成分的影响(参考选题)	184	附录 3	实验中常用酸、碱的相对密度和浓度的关系	191
实验 69 重金属对植物生长发育的影响(参考选题)	185	附录 4	常用有机溶剂及其主要性质	192
实验 70 植物生长物质对植物抗逆性的影响(参考选题)	185	附录 5	常用酸、碱指示剂	194
实验 71 植物次生代谢活性成分分析(参考选题)	185	附录 6	植物组织培养常用培养基	195
实验 72 植物生理学理论和技术在农业生产中的应用调查与分析(参考选题)	186	附录 7	常见的植物生长调节物质及其主要性质	196
本章思考与作业	186	附录 8	植物激素与生长调节剂在农业生产中的应用	197
附录 1 试剂的配制	187	附录 9	常用缓冲溶液的配制	199
附录 2 硫酸铵饱和度常用表	189	附录 10	离心机转速与离心力的换算	203
		参考文献		204

实验训练综合指导

一、实验材料的处理与保存

(一) 植物材料的选取

实验分析的准确性在很大程度上取决于选用的材料是否具有最大的代表性。如果取样方法不科学,没有充分考虑样品的代表性,即使结果分析准确无误,也不可能得出正确的结论。为了保证植物材料的代表性,取样时需遵循随机性和均匀性原则。从大田、实验地或实验器皿中采取的植物材料,称为“原始材料”。“原始材料”有根、茎、叶、花、果实、种子之分,进一步选出“平均样品”和“分析样品”。“平均样品”或者是整株植物(即不分根、茎、叶、花、果实、种子),或者是多株植物的某个部位(如根系)的混合样;“分析样品”是指从“平均样品”中选取出将要检测分析使用的材料。即根据分析目的、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“分析样品”。

1. 原始样品的取样法

(1) 随机取样

在实验地(或大田)中选择有代表性的取样点,取样点的数目视实验地面积大小而定。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从中选取样株。

(2) 对角线取样

在实验地(或大田)可按对角线选定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从中选取样株。

2. 平均样品的取样法

(1) 混合取样

一般对颗粒状(如种子等)或已碾磨成粉状的样品可采取混合取样法。具体做法是:将供采取样品的材料铺在光滑的纸(或玻璃板、木板)上成均匀一层,按照对角线划分为4等份;取对角的2份为进一步取样的材料,而将其余对角的2份淘汰;再把已取的2份样品充分混合后重复上述方法取样。反复操

作,每次均淘汰 50% 的样品,直至所取样品达到所要求的量为止。这种取样方法叫做“四分法”。

一般对禾谷类、豆类及油料作物的种子取样均可采用此法,但应注意样品中不能混有未成熟的种子及其他杂物。

(2) 按比例取样

对生长不均等的作物、果品等材料取样时,应将原始样品按不同类型的比例选取平均样品。例如,对胡萝卜、甜菜、马铃薯等块根、块茎材料选取平均样品时,应按大、中、小不同类型样品的比例取样,然后再将每一单个样品纵切剖开,每个切取 $1/4$ 、 $1/8$ 或 $1/16$,混在一起组成平均样品。

在采取桃、梨、苹果、柑橘等果实的平均样品时,即使是从同一株果树上取样,也应考虑到树冠上各个不同方位和部位的果枝,以及果实体积的大小和成熟度的差异,各按相关的比例取样混合成平均样品。

3. 取样注意事项

(1) 取样地点。一般在距田埂或地边一定距离的株行取样,或在特定的取样区内取样。取样点的四周不应有缺株现象。

(2) 取样后,按分析目的分成各部分(如根、茎、叶、果等),然后捆齐,并附上标签,装入纸袋。有些多汁果实取样时,应用锋利的不锈钢刀子,并注意勿使果汁流失。

(3) 对于多汁的瓜、果、蔬菜及幼嫩器官等样品,因含水分较多,容易变质或霉烂,可放在冰箱中冷藏,或进行灭菌处理或烘干以供分析之用。

(4) 选取平均样品的量不应当少于供分析用样品的两倍。

(5) 为了了解供试植物在不同生育期的生理状况,常按植物不同的生育期采取样品进行分析。取样方法是在植物的不同生育期先调查植株的生育状况并区分为若干类型,计算出各种类型株所占的百分比,再按此比例采取相应数目的样株作为平均样品。

(二) 分析样品的前处理及保存

1. 种子样品的前处理及保存

一般种子(如禾谷类种子)选取平均样品需清除杂质后进行磨碎,最好使用电动磨粉机,并尽量保证使用前后磨粉机(或其他碾磨用具)内部的清洁。最初磨出的少量样品可弃去不要,然后正式磨碎,并使样品全部通过 80 ~ 100 目筛子,混合均匀,作为分析样品贮存于具磨口玻塞的广口瓶中,并随即贴上标签,注明样品的采取地点、处理方法、采样日期和采样人姓名等。长期保存样品时,其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二氯甲苯。

测定油料作物种子(如花生、亚麻、芝麻、蓖麻等)的含油量时,不宜用磨粉机磨碎,以免样品中所含的油分吸附在磨粉机上影响分析的准确性。应将少量油料种子样品放在研钵磨碎或用切片机切成薄片作为分析样品。

2. 茎叶样品的前处理及保存

新鲜样品(平均样品)采回后,根据用途需经过净化、杀青、烘干(或风干)等一系列前处理。

(1) 净化

从田间或实验地取回新鲜样品时,常沾有泥土等杂质,应用柔软湿布擦净,不应用水冲洗。

(2) 杀青

为了保持样品化学成分不发生转变和损耗,务必及时终止样品中酶的活动,因此,需要将样品置于 105 ℃ 烘箱中处理 15 ~ 20 min。

(3) 烘干

样品经杀青后,应立即降低烘箱温度,维持在 70 ~ 80 ℃,直到样品烘干至恒重。一般样品所需的烘干时间大约为 1 天。烘干时应注意温度不能过高,否则会把样品烤焦。

烘干(或风干)的茎叶样品,均要进行磨碎,磨茎叶用的粉碎机与磨种子的磨粉机结构不同,不宜用后者来代替。如果茎叶样品中的水分偏高而不利于磨碎时,需进一步烘干再磨碎。磨碎后样品的保存方法同种子干粉。

此外,在测定植物材料中酶的活性或某些成分(如维生素 C、DNA、RNA 等)含量时,需要用新鲜样品。取样时注意保鲜,取样后应立即进行待测组分提取;也可采用液氮速冻,再放入 -70 ℃ 冰箱中保存或冰冻真空干燥法得到干燥的制品,放在 0 ~ 4 ℃ 冰箱中保存等方法。在鲜样已进行了匀浆,尚未完成提取、纯化,不能进行分析测定等特殊情况下,也可加入防腐剂(甲苯、苯甲酸),以液态形式保存在缓冲液中,置于 0 ~ 4 ℃ 冰箱即可,但保存时间不宜过长。

(三) 待测组分的提取、分离、纯化和测定

1. 待测组分的提取

提取是指将经过破碎或预处理的细胞置于溶剂中,使被分离的物质充分释放到溶剂中,并尽可能保持原来的天然状态而不丢失生物活性的过程。这一过程是将目的产物与细胞中其他化合物和生物物质分离开来,由固相转入液相,或从细胞内的生理状况转入外界特定的溶液中。

影响提取的因素主要包括目的产物在提取液中溶解度的大小、由固相扩散到液相的难易程度、溶剂的 pH 及提取时间等。一种物质在某一溶剂中溶解度的大小与该物质的分子结构及使用溶剂的理化性质有关。一般来说,极性物质(亲水性的)易溶于极性溶剂,非极性物质(亲脂性的)易溶于非极性有机溶剂;碱性物质易溶于酸性溶剂,反之亦然;温度升高,溶解度加大;远离等电点的 pH,溶解度增加。提取时所选择的条件应有利于目的产物溶解度的增加和保持其生物活性。

对于色素、植物激素、氨基酸、可溶性糖、有机酸等小分子物质的提取,首要是选择适当性质的溶剂。例如,叶绿素可以用 95% 乙醇或 80% 丙酮溶液提取;脱落酸、赤霉素可用丙酮、甲醇溶液提取;还原糖可用蒸馏水提取;维生素 C 可用 2% 草酸溶液提取。两性物质氨基酸在等电点以外任何 pH 的溶液中都呈解离态,一般可用 10% 乙酸提取。为使待测组分更快、更充分地从其他细胞组分中分离出来,可以采用电炉加热、煮沸、恒温水浴保温、剧烈搅拌或振荡等方法,使待测组分最大限度地存在于提取液中,再经过离心或过滤除去残渣,即可得到较理想的粗提液。

对于核酸、蛋白质及酶等生物大分子的提取,相对要复杂些。由于不同蛋白质分子中含有不同比例的极性基团与非极性基团,氨基酸排列顺序存在很大差别,因此,提取蛋白质时,要根据蛋白质的结构、溶解性质及等电点等因素配制不同的蛋白质提取液。一般而言,蛋白质提取液以水为主,再加少量酸、碱或盐组成,这样可以通过少量离子的作用,减少蛋白质分子极性基

团之间的静电引力,加强蛋白质与提取液之间的相互作用,从而提高其溶解性。缓冲液的 pH 应选择在偏离等电点的两侧,使蛋白质分子带净电荷,以提高其溶解度。因此,稀盐溶液和缓冲液是提取蛋白质和酶常用的试剂。提取液的用量一般为组织的 1 ~ 5 倍,增大用量有利于提高得率,但工作量大。用水溶液提取生物大分子应注意盐浓度(或离子浓度)、pH、温度、防止蛋白酶或核酸酶的降解作用、搅拌与氧化、降低酚类物质的影响等。

在提取酶时,一般情况下要在冰浴上或低温室内进行。其提取液应为偏离等电点两侧的 pH 缓冲液,离子强度适中,以维持酶结构的稳定。此外,还应加入适量的巯基乙醇和聚乙烯吡咯烷酮(PVP),以防止酶分子中的巯基氧化和样品中的酚氧化。重金属离子的络合剂乙二胺四乙酸(EDTA)也是提取液中常用的成分之一,可防止酶变性失活。为防止酶蛋白在分离过程中发生降解,有时还需加入蛋白酶抑制剂。

核酸的提取方法有多种。提取核酸时,常采用盐溶法,即根据 DNA 核蛋白易溶于高盐($1 \sim 2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$)溶液、难溶于低盐($0.14 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$)溶液,而 RNA 核蛋白则易溶于低盐($0.14 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$)溶液这一原理进行提取。对 RNA 和 DNA 的分离也可根据 RNA 易被碱解,DNA 易被酸解的性质进行。在提取植物组织中的 DNA 时,常用液氮冻融法改善匀浆效果,缩短匀浆时间,并具有抑制 DNA 酶活性的效果。匀浆缓冲液中加入溴化乙锭,可显著提高 DNA 的纯度和相对分子质量。

2. 待测组分的分离纯化

在一般的生理生化分析中,如果待测组分与分析试剂(如显色剂、氧化还原剂)反应的专一性程度高,受其他杂质干扰少,则不需要进一步纯化。但在制备性生化实验中,必须采用一系列生化分离纯化技术,除去粗提液中的杂质(异类物质和同类物质),以制成高纯品。常用的生化分离纯化技术有:盐析、透析、离心(数字资源 0-1)、电泳(数字资源 0-2)和层析(数字资源 0-3)等技术,这里重点介绍盐析和透析技术。

(1) 盐析

向含有待测组分的粗提液中加入高浓度中性盐达到一定饱和度,使待测组分沉淀析出的过程称为盐析。蛋白质、酶、多糖、核酸等都可应用盐析技术进行沉淀分离。盐析是一种由提取到分离纯化的衔接技术,在蛋白质或酶的分离纯化中应用最广,其原理是:当溶液中的中性盐浓度增至一定程度时,蛋白质分子表面电荷被中和,包围蛋白质分子的水膜被破坏,导致蛋白质分子溶解度下降,而凝聚析出。

在盐析中使用中性盐种类有硫酸铵、硫酸镁、氯化钠、醋酸钠等。硫酸铵以其溶解度大、受温度影响小、不易引起蛋白质变性、价格便宜等优点而得到广泛应用。在使用硫酸铵进行蛋白质盐析时,要选用纯度较高的或重结晶的硫酸铵。硫酸铵的浓度常用饱和度表示,达到饱和状态时的硫酸铵饱和度为 100%。不同的硫酸铵饱和度可用加入固体盐法、加入饱和溶液法及透析平衡法任意调节。不同浓度的蛋白质溶液,使用硫酸铵的饱和度范围不同。蛋白质浓度较高时,需硫酸铵量较少;蛋白质浓度较低时,需硫酸铵量较多。在具体进行盐析时,因制备阶段不同,其操作方法各异。一般在制备早期,应保持一定的 pH 和温度,而改变离子强度(盐浓度)进行蛋白质的分步分离;在制备后期,分离纯化及结晶阶段,则往往保持一定的离子强度,而改变 pH 和温度。为保证实验的重现性,对盐析的条件如 pH、温度和硫酸铵的纯度和用量都必须

严加控制。盐析后放置 0.5 ~ 1 h, 沉淀完全后, 可采用离心法或过滤法进行固液分离。

(2) 透析

透析用于分离大小不同的分子, 是膜分离技术的一种。透析膜只允许小分子通过, 阻止大分子通过。盐析得到的蛋白质沉淀, 用缓冲液悬浮, 装入透析袋内进行脱盐, 可除去硫酸铵等盐类。具体方法是: 把盛有蛋白质溶液的透析袋两端系紧, 悬挂在装有缓冲液的三角瓶中, 置磁力搅拌器上, 在低温 (4 ℃ 左右) 条件下透析 30 ~ 36 h, 由于透析袋只允许小分子盐类透过, 而蛋白质大分子不能逸出膜外, 经多次更换透析外液, 不断降低膜外液中小分子盐类的浓度, 即可将混杂于蛋白质大分子中的盐类等杂质透析掉。透析时, 要选用透析速度快、透性界限明确的透析袋。

3. 浓缩与干燥

(1) 浓缩

浓缩是指通过对水或溶剂的吸收和透析等方法, 使低浓度溶液变为高浓度溶液的过程。浓缩的方法很多, 如加热蒸发、加沉淀剂、离子交换法、吸收法、减压浓缩法、膜浓缩法、亲和层析法等。在实验室中最常用的是吸收浓缩法, 即通过向溶液中投入吸收剂 (如聚乙二醇、聚丙烯酰胺干凝胶等), 直接吸收溶液中的水分, 使溶液浓缩的方法。在使用吸收剂时, 也可先将生物大分子溶液装入透析袋里, 扎紧袋口, 外加聚乙二醇覆盖, 袋内水分渗出, 即被聚乙二醇迅速吸收而被浓缩, 称为高渗透析法, 兼有脱盐效果。在实验室中也经常用到超滤法, 即使用一种特制的薄膜对溶液中各种溶质分子进行选择性的过滤的方法。应用超滤法, 关键在于滤膜类型和规格的选择。该法除浓缩、脱盐外, 还可应用于生物大分子的分离纯化, 如进行多成分提取液的分离时, 可先用超滤器分组, 再进行柱层析, 可将多种待测组分分离。

此外, 也常用减压浓缩法对不耐热的生物大分子及生物制品进行浓缩, 其原理是通过降低液面上的气体压力使液体沸点降低, 加快蒸发。

(2) 干燥

干燥就是将潮湿的固体及液体中的水或溶剂清除干净的过程。在生化研究中最常用的干燥方法是真空干燥法 (减压干燥法) 和冰冻真空干燥法 (升华干燥法)。前者适用于不耐高温、易氧化物质的干燥和保存, 其真空度越高, 溶液沸点越低, 蒸发越快; 后者适用于蛋白质、酶等各类生物大分子的干燥保存, 可保持其天然结构与活力。在相同压力下, 水蒸气压力随温度的下降而下降, 因而在低温和高度真空下, 水分变成固态冰, 冰可以升华为气体, 并直接被真空泵抽走而得以干燥。

4. 待测组分的测定

样品中待测组分的测定可采用化学分析、物理分析等方法, 而现代植物生理生化实验则更依赖于仪器分析方法。这就要求待测样品在上机之前, 需进行一些特殊处理, 提供特异信号, 使仪器做出反应。如比色技术、色谱技术等, 多以化学变化过程中待测组分与试剂反应发生颜色的消长, 通过仪器检测得知某组分的含量。其中像茚三酮比色法测定氨基酸含量, 就是利用氨基酸在酸性条件下与水合茚三酮作用后产生的二酮茚胺的取代盐等蓝紫色化合物, 在一定范围内其颜色的深浅与氨基酸的含量成正比的原理来进行。

在植物生理实验技术中, 对同一待测组分含量可以采用不同的测定方法。实际工作中应当根据测试目的、要求、样品的特点以及实验设备条件等, 选择合适的方法, 制定合理的检测实施方案。

二、实验数据的处理与分析

在植物生理实验定量测定中,正确运用统计方法是对实验数据进行统计分析的关键。首先,应注意实验测定结果中有效数字位数的确定问题。记录数据时,只应保留一位不定数字,在去掉多余尾数时以“四舍五入”为原则。计算所得数字有几位有效,取决于计算时所用原始数字中有效数字的位数。在乘法中乘数与被乘数,或除数与被除数有效位数不等时,其积或商的有效位数取决于有效数字位数最少的那一个数据。而在加减法中有效数字的位数,由小数点后位数最少的一个数据决定。在运算过程中,也可以暂时多保留一位不定数字,得到计算结果后,再去掉多余的尾数。

在待测组分定量测定中,误差是绝对存在的,因此,必须善于利用统计学方法,分析实验结果的正确性,并判断其可靠程度。实验中,每种处理至少要设2次重复,定量测定数据要有3次重复,否则,无法进行统计分析。而且,在统计分析之前,不能只就数据进行选择统计。由于取材误差、仪器误差、试剂误差、操作误差等一些经常性的原因所引起的误差称为系统误差;由于一些偶然的外因所引起的误差,称为偶然误差。前者影响分析结果的准确度,后者影响分析结果的精密度。准确度是指测得值与真实值符合的程度,用误差表示。误差分为绝对误差和相对误差。精密度是指几次重复测定彼此间符合的程度,显示其重现性状况,用偏差来表示。偏差也分为绝对偏差和相对偏差。准确度和精密度共同反映测定结果的可靠性。误差小表示可靠性好,误差大表示可靠性差。

在对实验结果进行分析时,对同一待测组分所得到的多个实验数据,最简单的办法是计算其算术平均值,但这还不能很好地反映测定结果的可靠性,尚需要计算出偏差或相对偏差。在分析中,如果实验数据不多,则可采用算术平均偏差或相对平均偏差表示精密度即可;但当实验数据较多或分散程度较大时,用标准偏差(即均方差) S 或相对标准偏差(即变异系数) $C.V$ 表示精密度则更可靠。还可利用置信区间表示指定置信度 α 的偏差。几种数据计算方法如下:

$$1. \text{ 算术平均值 } \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$2. \text{ 平均偏差 } = \frac{\sum |x_i - \bar{x}|}{n}$$

$$3. \text{ 相对平均偏差 } = \frac{\sum |x_i - \bar{x}|}{n\bar{x}} \times 100\%$$

$$4. \text{ 标准偏差(均方差) } S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$5. \text{ 变异系数 } C.V = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

$$6. \text{ 置信区间的界限 } P = \frac{t_{(\alpha, n-1)} S}{\sqrt{n}}$$

$$\text{置信区间} = \bar{x} \pm P$$