

植物生物学实验-植物生理部分

实验六 激动素对叶片的保绿效应 及对离体叶片中SOD活性的影响

【实验原理】

- 采摘下来得植物叶子，由于蛋白质分解而容易发生衰老和变黄。激动素可以通过维持蛋白质和核酸的合成而延缓叶片衰老并使代谢产物积累，从而延长了离体植物叶片的寿命。生产上利用激动素的这种效应进行蔬菜贮藏，延长市场上蔬菜的供应。这也是生物试法的一种。

- 离体的植物叶片会很快衰老，但如提供外源激动素(一种细胞分裂素)则能明显地延缓叶片的衰老过程，其中一个重要的原因是使SOD的活性维持在一个较高的水平上。所以在生产上常利用激动素的这种效应延长蔬菜贮藏和市场上的供应时间。
- 超氧化物歧化酶活性的测定是根据照光时，体系中产生的氧自由基使硝基四唑蓝还原成蓝色甲腈(后者在560nm处有最大吸收)，而超氧化物歧化酶作为氧自由基的清除剂可抑制此反应。

细胞分裂素



维持SOD酶活



SOD等消除了活性氧的毒害作用



延缓叶片的衰老



SOD



【实验材料】

■ 小麦叶片

【前期处理】

- 配制激动素：将配制好的40ppm激动素，用蒸馏水稀释至10ppm 20mL加入到培养皿中，并取20mL蒸馏水和20mL 40ppm激动素移入至另外两个培养皿中（培养皿中铺有大小适合的滤纸并已经灭菌）。
- 培养小麦叶片：选择绿色均匀的小麦叶片(30片)，取叶片中段约2-4cm，即剪去叶尖和叶基部，置于22℃恒温箱中培养。
- 第三天和第七天时观察圆片褪色变黄情况并记录之。

激动素含量与叶片衰老变黄随时间变化的关系

观察时间 处理	3天	7天
0ppm		
10ppm		
40ppm		

记录以“+”、“-”号多少表示绿色和黄色

【实验步骤】

- 酶的提取 将处理过的叶片吸干表面水分，分别称取0.5g，置预冷的研钵中，加入5mL预冷的提取介质(分几次加入)，研磨成匀浆，4℃15000g离心10min，将上清液倒入另一试管中，冰浴保存备用，上清液为酶提取液。

- **酶活性测定** 取5支试管，编号，按下表加入试剂，将4号管用黑纸包住，与其它试管一起放在500w白炽灯旁， $54\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强下照光10min后关灯，用黑纸罩上试管（如室内光线不强，不罩黑纸也可）；以4号试管溶液为空白，测定样品在560nm处的吸光度。不加酶的5号试管溶液颜色最深；加入酶的由于超氧化物歧化酶抑制了硝基四唑蓝的光还原，颜色变浅。

编号	1	2	3	4	5
反应介质/mL	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
酶提取液/mL	0.02	0.02	0.02		
核黄素/mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
50mmol/L磷酸缓冲液/mL				0.02	0.02
备注	叶片浸泡在蒸馏水中	叶片浸泡在10ppm激动素溶液中	叶片浸泡在40ppm激动素溶液中	(黑纸包裹)空白	无酶反应液

【结果计算】

$$\Delta A \times N$$

$$\text{酶活力(u/g/h)} = \frac{\Delta A \times N}{A_0 \times W \times T \times V \times 50\%}$$

$$A_0 \times W \times T \times V \times 50\%$$

- 酶活力单位（U）：一个酶活单位定义为将硝基四唑蓝的还原抑制到对照一半（50%）时所需的酶量。
- A_0 ：未加入酶提取液的溶液反应后在560nm处的吸光值；
- ΔA ：所测定的加入酶提取液后的吸光值与 A_0 之间的差值的绝对值；
- N ：提取酶液的总体积（mL）；
- W ：植物材料的鲜重（g）；
- T ：照光时间（h）；
- V ：加入酶液的体积(mL)。

- 对植物生理学实验课的意见和建议?
- 谈一下综合实验一的开设对理论知识的学习及实验技能的提高有何意义?