

植物生物学实验-植物生理部分

实验十 植物体内氧自由基的测定和清除

【实验原理】

- 通过呼吸作用进入生物体内的氧分子，参与酶促或非酶促反应时，只接受一个电子后转变为超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)， $\text{O}_2^{\cdot-}$ 既能与体内的蛋白质和核酸等活性物质直接作用，又能衍 H_2O_2 ，羟自由基($\cdot\text{OH}$)，单线态氧($^1\text{O}_2$)等。 $\cdot\text{OH}$ 可以引发不饱和脂肪酸脂质(RH)过氧化反应，产生一系列自由基，如：脂质自由基($\cdot\text{R}$)、脂氧自由基($\text{RO}\cdot$)、脂过氧自由基($\text{ROO}\cdot$)和脂过氧化物(ROOH)。

- 基团旁边的小圆点为不成对价的电子，这种基团即称为自由基，带有个-O-O-的是过氧化物， $^1\text{O}_2$ 的电子处于激发状态。这些含有氧而又比 O_2 活泼很多的化合物，称为活性氧，也有人将它们统归为氧自由基类。
- 一切需氧生物均能产生活性氧，在其体内有一套完整的活性氧清除系统(抗氧化酶和抗氧化剂)，能将活性氧转变为活性较低的物质，机体因此受到保护。

- 利用经胺氧化的方法可以检测生物系统中自由基含量。原理是： $\text{O}_2^\bullet$ 与羟胺反应生成 NO_2^- ， NO_2^- 在对氨基苯磺酸和 α -萘胺作用下，生成粉红色的偶氮染料，染料在 λ 540nm有显著吸收，根据 OD_{540} 可以算出样品中的 $\text{O}_2^\bullet$ 含量。

【实验材料和设备】

- 大豆、绿豆、花生3d龄黄化幼苗
- 低温离心机、恒温水浴锅、分光光度计。

【实验步骤】

- 亚硝酸根标准曲线的制作 2mL系列浓度的 NaNO_2 (0、5、10、15、20、30、40和50 $\mu\text{mol/L}$) 分别加入1mL对氨基苯磺酸和1mL α -萘胺，于25℃中保温30min，然后测定 OD_{540} ，以 $[\text{NO}_2^-]$ 和测得的 OD_{540} 值互为函数作图，制得亚硝酸根标准曲线。
- 植物提取液的制备 大豆、绿豆和花生3d龄黄化幼苗的下胚轴0.5-2.5g，加入5mL 50mmol/L磷酸缓冲液(pH7.8)研磨后以纱布过滤，并以10500×g离心20min，上清液即为粗酶液。

- $\text{O}_2^{\cdot -}$ 含量的测定 0.5mL样品提取液中加入0.5mL 50mmol/L磷酸缓冲液(pH7.8), 1mL 1mmol / L盐酸羟胺, 摇匀, 于25℃中保温1h。然后再加入1 mL对氨基苯磺酸混匀, 加入1mL α -萘胺, 混合, 于25℃中保温30min。取出后用分光光度计测定波长530nm的OD值。

- 根据测得的 OD_{540} ，查 NO_2^- -标准曲线，将 OD_{540} 换算成 $[NO_2^-]$ ，然后依照羟胺与 $O_2^{\cdot -}$ 的反应式：



从 $[NO_2^-]$ 对 $[O_2^{\cdot -}]$ 进行化学计量，即将 $[NO_2^-]$ 乘以2，得到 $[O_2^{\cdot -}]$ 的量。

- 根据记录样品与羟胺反应的时间和样品中的蛋白质含量，可求得产生速率(nmol/min/mg蛋白)。

【注意事项】

- 如果样品中含有大量的叶绿素将干扰测定，可在样品与羟胺温浴后，加入等体积的乙醚萃取叶绿素，然后再加入对氨基苯磺胺和 α -萘胺作的 NO_2 -显色反应。