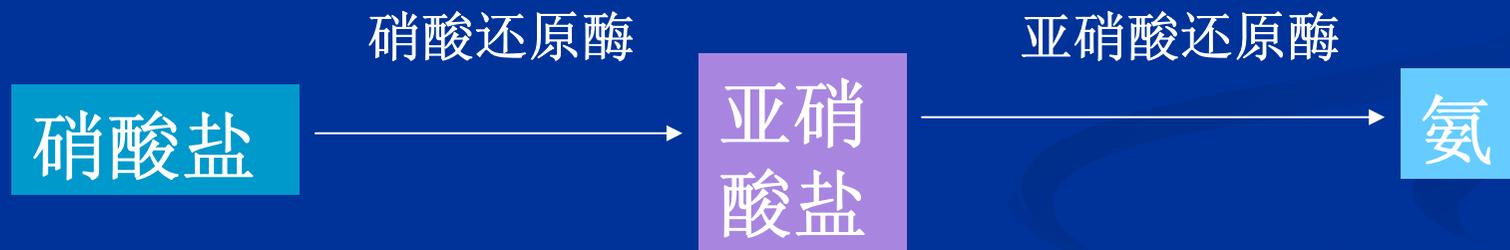


植物生物学实验-植物生理部分

实验二 植物体内硝酸还原酶 活力的测定

- NO_3^- 和 NH_4^+ 是能被植物利用的最主要的氮源。在一般田间条件下， NO_3^- 是植物吸收的主要形式。

硝酸盐的还原



硝酸还原酶是一种诱导酶，在植物体内本来不含有，但在特定外来物质的如 NO_3^- 诱导下可以生成硝酸还原酶。

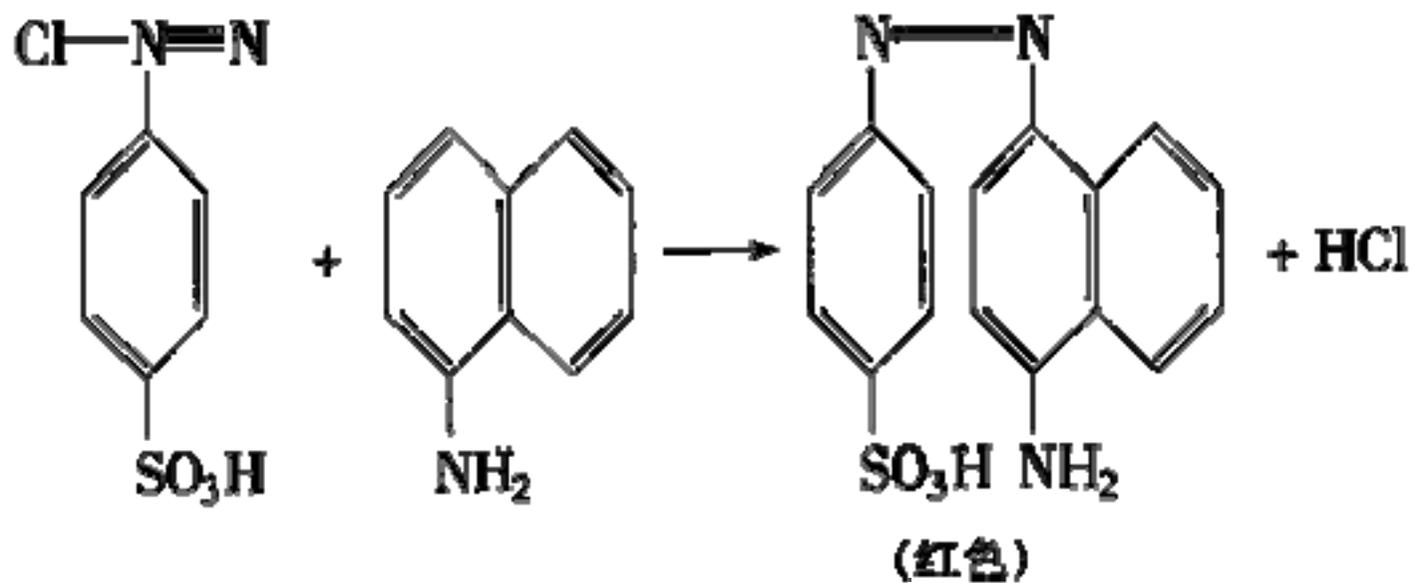
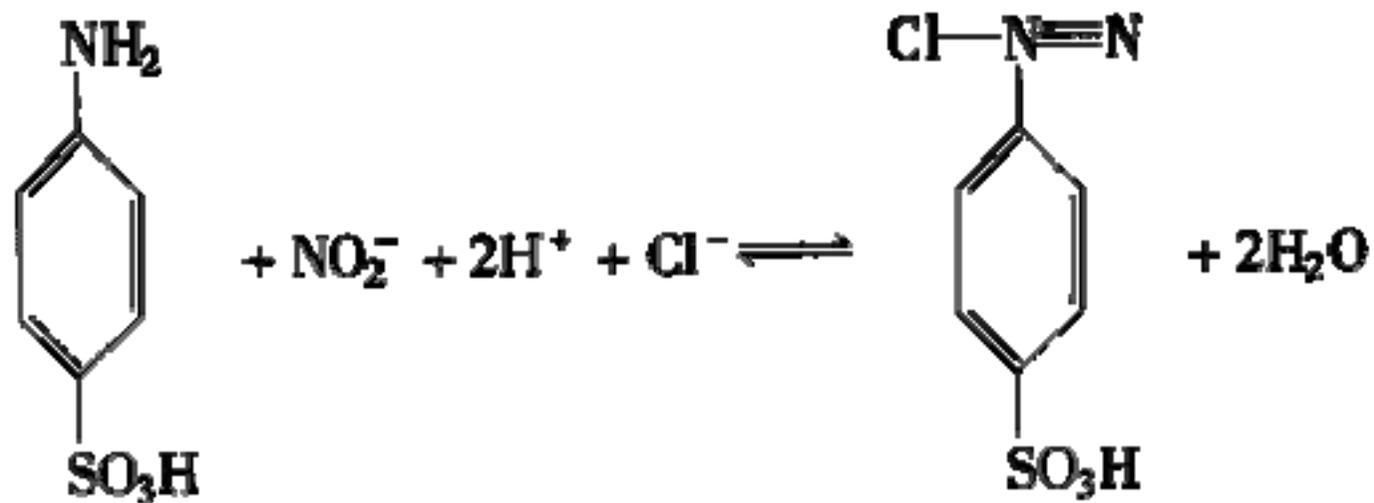
【实验原理】

- 硝酸还原酶（NR）是植物氮素同化的关键酶，它催化植物体内的硝酸盐还原为亚硝酸盐：



产生的亚硝酸盐与对-氨基苯磺酸（或对氨基苯磺酰胺）及 α - 萘胺（或萘基乙烯胺）在酸性条件下定量生成红色偶氮化合物。

生成的红色偶氮化合物在540nm有最大吸收峰，可用分光光度法测定。硝酸还原酶活性可由产生的亚硝态氮的量表示。一般以单位时间内每克鲜重含氮量表示，即以 $\mu\text{g/g/h}$ 为单位。NR的测定可分为活体法和离体法。活体法步骤简单，适合快速、多组测定。离体法复杂，但重复性较好。



【实验材料】

- 小麦的新鲜叶片（诱导组和非诱导组）

【实验器材】

- (1)冷冻离心机；(2)分光光度计；(3)天平(0.01g)；(4)冰箱；(5)恒温水浴；(6)研钵；(7)剪刀；(8)离心管；(9)移液管(5、2、1mL)；(10)洗耳球；(11)试管架；(12)胶头滴管。

【实验步骤】

■ 标准曲线制作

取7支洁净烘干的15ml刻度试管按下表顺序加入试剂，配成0-0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准亚硝态氮溶液。摇匀后在25 $^{\circ}\text{C}$ 下保温30min，然后在540nm下比色测定。以亚硝态氮浓度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）为横坐标（X），吸光值为纵坐标（Y）建立回归方程。

	管号	1	2	3	4	5	6	7
试剂 取量 mL	亚硝酸钠标准液	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
	蒸馏水	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0
	1% 磺胺	2	2	2	2	2	2	2
	0.2% 萘基乙烯胺	2	2	2	2	2	2	2
每管亚硝态氮浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$		0	0.02	0.04	0.08	0.12	0.16	0.20

- **酶的提取** 称取0.5-1g 鲜样（诱导组和非诱导组分别进行），剪碎置冰箱冰冻30min，取出置研钵中，冰浴研磨成匀浆，转移入离心管中，洗研钵2-3次，将液体转入离心管中，共用提取液6 mL，4℃ 8000rpm离心15min，上清液即为粗酶提取液。
- **酶反应** 取4个10 mL离心管，按照下表所列进行操作，混匀，25℃保温30min。

反应底物 酶反应管	粗酶液/mL	0.1mol/LKNO ₃ 磷酸缓冲液/mL	NADH 溶液/mL	0.1mol/L pH7.5 磷酸缓冲液/mL
非诱导—对照	1.0	1.6	0	0.2
非诱导—实验	1.0	1.6	0.2	0
诱导—对照	1.0	1.6	0	0.2
诱导—实验	1.0	1.6	0.2	0

- **终止反应和比色测定** 30min后立即加入1 mL磺胺溶液终止酶反应，再加1 mL萘基乙烯胺溶液，显色30min后于4000rpm离心5min，取上清液在540nm下比色测定。根据标准曲线计算出反应液中亚硝态氮浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）。

【结果计算】

$$\text{样品中酶活性 } (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{X * V_3 / V_2 * V_1}{W * t}$$

X —— 反应液酶催化产生的亚硝态氮浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ;

V1 —— 提取酶时加入的提取缓冲液体积 (mL) ;

V2 —— 酶反应时加入的粗酶液体积 (mL) ;

V3 —— 与磺胺等发生颜色反应的总体积 (mL) ;

W —— 样品质量 (g) ;

t —— 反应时间 (h) 。

【注意事项】

- 硝酸还原酶容易失活，离体法测定时，操作应迅速，并且在4℃下进行。
- 制作标准曲线时，从显色到比色时间尽可能保持一致，显色时间过长或过短对颜色都有影响。

【思考与作业】

- 比色测定前加入磺胺和萘基乙烯胺的顺序不能颠倒的原因是什么？