

试剂的配制

1、1mol/LK₂HPO₄ (A): 11.411g K₂HPO₄———50ml

2、1mol/L KH₂PO₄ (B): 3.402g———25ml

3、50 m mol/L K₂HPO₄ —KH₂PO₄

	A	B	
PH7.0	12.3	7.7	蒸馏水至 400ml
PH7.8	36.32	3.68	蒸馏水至 800ml

4、研磨液 I：称取 0.0394gEDTA ， 1g PVP，用 50 m mol/L K₂HPO₄ —KH₂PO₄ (PH7.8) 溶解定容至 100ml。

1、SOD 测定：

① 130mmol/L 甲硫氨酸溶液：称取 0.4849g 甲硫氨酸，用 50 m mol/L K₂HPO₄ —KH₂PO₄ 磷酸缓冲液 (PH7.8) 溶解定容至 25ml (现配现用)。

② 750 μ mol/L 氮蓝四唑溶液：称取 0.0153gNBT，用 50 m mol/L K₂HPO₄ —KH₂PO₄ 磷酸缓冲液 (PH7.8) 溶解定容至 25ml (现配现用、避光保存)。

③ 1mmol/L EDTA-Na₂ 溶液：称取 0.0186g EDTA-Na₂，用 50 m mol/L K₂HPO₄ —KH₂PO₄ 磷酸缓冲液 (PH7.8) 溶解定容至 50ml。

④ 20 μ mol/L 核黄素溶液：称取 0.0038g 核黄素，用 50 m mol/L K₂HPO₄ —KH₂PO₄ 磷酸缓冲液 (PH7.8) 溶解定容至 50ml (避光保存)。

⑤ 50 m mol/L K₂HPO₄ —KH₂PO₄ (PH 7.8)

前四种溶液均为用前配制，避光保存。

酶液提取：样品 0.25g，加 5ml 研磨液研磨至匀浆，转移到离心管中，12000rpm 离心 20min，上清液即为酶液。(SOD POD CAT 可溶性蛋白)

试剂名称	每支试管所加入的量 (ml)	备注
磷酸缓冲液 pH7.8	1.7	以不照光的调零
甲硫 aa (避光)	0.3	
四唑 NBT(避光)	0.3	
EDTA-Na	0.3	
核黄素 (避光)	0.3	
提取液	0.1	

同时做 2 支对照管，取 3ml 反应混合液加入 0.1PBS，其中一支管照光后测定作为光最大还原管，另一支置于暗中测定用于调零。

SOD 活性测定与计算：反应结束后，分别测定各管在 **560nm** 的吸光度；

结果计算：

$$\text{SOD 总活性} = (\text{Ack} - \text{Ae}) * \text{Vt} / (0.5 * \text{Ack} * \text{W} * \text{Vc})$$

(Ack: 对照管的吸光值； Ae: 样品管的吸光值； Vt: 样品液总体积； W: 样品的鲜重； Vc: 测量时酶液的体积)

参考文献：李合生-植物生理生化实验原理和技术

2、POD 测定:

反应混合液配制 (以 60 个样为准):

取 200ml PBS (pH 7.0), 加入 0.076ml 液体愈创木酚搅拌溶解, 再加入 0.112ml 30% 的过氧化氢。

取 3ml 反应液并加入 50ul 酶液, 以 PBS 为对照调零, 而后测定 OD₄₇₀ 值 (3min)

以 1min 内 A₄₇₀ 减少 0.01 的酶量为 1 个酶活单位 (U)

$$POD = (\Delta A_{470} * V_t) / (W * V_s * 0.01 * t)$$

参考文献: 师姐资料

3、CAT 测定 (?): (石英比色皿)

在 3ml 地反应体系中, 含有:

试剂	用量 (μl)
50mmol/L K ₂ HPO ₄ - KH ₂ PO ₄ 缓冲液 (pH 7.0)	2500
100mmol/L H ₂ O ₂	300
酶液 (最后加入, 启动反应) *	200

启动反应后, 测定 240nm 处 OD 在 3min 内降低速度

以 1min 内 A₂₄₀ 减少 0.1 的酶量为 1 个酶活单位 (U)

$$CAT = (\Delta A_{240} * V_t) / (W * V_s * 0.1 * t)$$

参考文献: 郝再彬-植物生理实验

4、APX 活性测定 [79、80]

在 3ml 反应体系中, 加入 50mmol/L pH 7.0 的 PBS 1.8ml, 15mmol/l AsA 0.1ml、提取酶液 0.1ml, 0.3mmol/L H₂O₂ 1ml, 以不加提取酶液为对照, 记录 OD₂₉₀ 变化 0.01 定义为一个酶活力单位, 试验结果以 U/g 表示。

APX 活性测定参照 Nkanao 和 Asdaa (1981) 的方法并稍做改动, 取 1.0g 中层花瓣, 用液氮研磨, 按 1:3 加入预冷的 50mmol/L K₂HPO₄ - KH₂PO₄ 缓冲液 (pH 7, 含 0.1mmol/l 的 EDAT - Na₂) 提取 30min 后, 用 2 层纱布过滤, 滤液以 12,000r、4℃ 下离心 15min, 上清液为酶的粗提液。

测定时 3ml 反应体系中含 50mmol/L K₂HPO₄ - KH₂PO₄ 缓冲液 (pH 7), 0.1mmol/l 的 EDAT - Na₂, 0.3mmol/l AsA, 1mmol/l H₂O₂ 和 40ul 酶液。加入 H₂O₂ 后立即在 20℃ 下测定 10 - 30s 的 OD₂₉₀ 值变化, 计算单位时间内 AsA 减少量。抗坏血酸含量的氧化量按消光系数 2.8mmol/l 计算, 酶活性用 μmol ASA.g⁻¹FW.min 表示。

参考文献: GSH 改善月季切花失水胁迫耐性及其对抗氧化酶活性的影响

5、可溶性蛋白含量的测定---考马斯亮蓝 G-250 染色法(?)

标准蛋白质溶液: 100ug/mL 牛血清白蛋白: 称取牛血清蛋白 10mg, 用质量分数为 0.9% 的氯化钠溶解, 并定容至 100mL 即可。

G250 溶液: 称取 100mg G250, 溶于 50ml 90% 乙醇中, 加入 100ml 85% (W/V) 的磷酸, 再用蒸馏水定容到 1L, 贮于棕色瓶中, 常温下可保存一个月。

操作方法:

(1) 标准曲线的绘制：取 6 支具赛试管，按下表加入试剂

管号	1	2	3	4	5	6
标准蛋白 (ml)	0	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00
蒸馏水量 (ml)	1.00	0.80	0.60	0.40	0.20	0
蛋白质含量 (μg)	0	20	40	60	80	100

混合混匀后，向各管加入 3ml 考马斯亮蓝 G-250 溶液，摇匀，放置 5min，用 1 cm 光径比色皿在 595nm 下比色测定吸光度。以蛋白质浓度为横坐标，一吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

(2) 样品测定：称取鲜样 0.5g，用 5ml 蒸馏水或缓冲液研磨成匀浆后，10000rpm 离心 10 min，取 100ul 于试管中（每个样品重复两次）。加入 3ml 考马斯亮蓝 G-250 溶液，充分混匀，放置 2min 后在 595nm 下比色，测定吸光度，并通过标准曲线查得蛋白含量。

(3) 计算结果：样品中蛋白质含量= $C \times V_T / V_S \times W_F \times 1000$ (mg/g)

C: 从标准曲线上查得的蛋白含量 (μg)

V_T : 提取液总体积 ml

V_S : 测定时加样量 ml

W_F : 样品鲜重 (g)

参考文献：李合生

样品提取：称取样品 2g 放入研钵中，加入 2ml 蒸馏水研磨成匀浆，移到离心管中，然后用 6ml 蒸馏水分次洗涤研钵，完全转移至离心管后，放置 0.5-1h 以充分提取，然后 4000r 离心 20min，弃去沉淀，上清液转入容量瓶，以蒸馏水定容至 10mL，待测。

参考文献：郝再彬。植物生理实验

6、MDA 测定：

取 0.5g 样品，加 5%TCA(三氯乙酸)5ml，研磨后所得匀浆在 3000r/min 下离心 20min 。

取上清液 2ml，加 0.67%TBA2ml，混合后沸水浴 30min，冷却后再离心一次。

分别测定上清液在 450nm, 532nm, 600nm 处的吸光度值，并按公式算出 MDA 浓度，再算出单位鲜量组织中的 MDA 含量(umol/g)

$$C/\mu\text{mol/L} = 6.45(A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450}$$

参考文献：李合生-植物生理生化实验原理和技术 260-261

MDA 的测定采用硫代巴比妥酸(TBAD)比色法(林植芳等，1984)，略作改进，

如下:1g 花瓣用液氮研细后加入 5ml10%TCA 溶液提取，匀浆在 4℃、12,000r 下离心 20min，上清液用于测定。取 1.5ml 上清液稀释 1 倍后，加入 2.5ml0.5%TBAD 的溶液，混匀后沸水浴 15min，然后用自来水迅速冷至室温，混合液再在 4,000r 离心 10min，上清液分别在 532nm、600nm 波长测定吸光值。MDA 含量用 155mmol/L⁻¹·cm⁻¹ 的消光系数计算。

参考文献：GSH 改善月季切花失水胁迫耐性及其对抗氧化酶活性的影响

7、ASA 含量测定[79、80]

称取 1g 猕猴桃叶片，加入 5 ml 5%三氯乙酸(TCA)研磨，9000r/min 离心 20min,上清液定容

5ml。

吸取上清液 0.2 ml，分别加入 150mmol/L NaH₂PO₄ (pH7.4)0.2ml、H₂O 0.2ml 混合均匀，至少 30s 后，再依次分别往各管中加入 10%TCA 0.2ml、44%H₃PO₄0.4ml、4%2, 2-二联吡啶 0.4ml、FeCl₃0.2ml,混合后在 37℃水浴中保温 60min，然后测定 525nm 的吸光值。结果用 μg/g 表示。

8、GSH 含量测定[79、80]

上清液提取同MDA。取上清液0.5 ml，加入150mmol/L NaH₂PO₄ (pH7.7)2.6ml、DTNB试剂0.18 ml（称75.3 mgDTNB 溶于30 mL 100 mmol/L 磷酸缓冲液,pH 6.8），以磷酸缓冲液（pH6.8）代替DTNB试剂作空白。摇匀后，于30℃水浴中保温5min，然后测定412nm的吸光值。根据GSH 标准溶液绘制标准曲线，计算样品中的GSH 含量。结果用 μmol/g表示。

[79]陈建勋,王晓峰.植物生理学实验指导.广州:华南理工大学出版社, 2002

[80]高俊凤.植物生理学实验技术.西安:世界图书出版公司,2000

9、可溶性糖测定——蒽酮比色法

(三) 试剂

(1) 蒽酮乙酸乙酯试剂:取分析纯蒽酮 1 g,溶于 50 mL 乙酸乙酯中,贮于棕色瓶中,在黑暗中可保存数星期,如有结晶析出,可微热溶解。

(2) 浓硫酸(比重 1.84)。

三、实验步骤

(一) 标准曲线的制作

1.1% 蔗糖标准液

将分析纯蔗糖在 80℃下烘至恒重,精确称取 1.000 g。加少量水溶解,转入 100 mL 容量瓶中,加入 0.5 mL 浓硫酸,用蒸馏水定容至刻度。

2.100 μg/L 蔗糖标准液

精确吸取 1% 蔗糖标准液 1 mL 加入 100 mL 容量瓶中,加水至刻度。

取 20 mL 刻度试管 11 支,从 0 ~ 10 分别编号,按表 2-32-1 加入溶液和水。

表 2-32-1 蒽酮法测可溶性糖标准曲线试剂量

试 剂	管 号					
	0	1,2	3,4	5,6	7,8	9,10
100 μg·L ⁻¹ 蔗糖液/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
水/mL	2.0	1.8	12.6	1.4	1.2	1.0
蔗糖量/μg	0	20	40	60	80	100

$$\text{可溶性糖含量} = \frac{\text{从回归方程求得糖的量}}{\text{吸取样品液的体积}} \times \frac{\text{提取液量} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品干重} \times 10^6} \times 100\%$$

然后按顺序向试管中加入 0.5mL 蒽酮乙酸乙酯试剂和 5 mL 浓硫酸,充分震荡,立即将试管放入沸水浴中,逐管均准确保温 1 min,取出后自然冷却至室温,以空白作参比,在 630

nm 波长下测其吸光度，以吸光度为纵坐标，以糖含量为横坐标，绘制标准曲线，并求出标准线性方程。

提取：0.25g，放入刻度试管中，加入 5—10 mL 蒸馏水，塑料薄膜封口，于沸水中提取 30min（提取 2 次），提取液过滤入 25 mL 容量瓶中，反复漂洗试管及残渣，定容至刻度。

测定：吸取样品提取液 0.5mL 于试管中（重复 3 次），加蒸馏水 1.5mL，以下步骤与标准曲线测定相同，测定样品的吸光度，计算可溶性糖的含量。

四、结果计算

由标准线性方程求出糖的量(μg)，按下式计算测试样品的糖含量。

$$\text{可溶性糖含量} = \frac{\frac{\text{从回归方程求得糖的量}}{\text{吸取样品液的体积}} \times \text{提取液量} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品干重} \times 10^6} \times 100\%$$

参考文献：李合生

10、脯氨酸含量测定

试剂：

(1)质量分数为 3%的磺基水杨酸溶液。

(2)甲苯

(3)质量分数为 2.5%的酸性茚三酮显色液。冰乙酸和 6mol/l 磷酸以 3: 2 混合，作为溶剂进行配制，此液在 4℃下 2—3 天有效。

(4)脯氨酸标准溶液。准确称取 25mg 脯氨酸，用蒸馏水溶解后定容至 250ml，其质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

标准曲线制作：

(1) 取 7 支具塞刻度试管加入各试剂。混匀后在沸水中加热 40min

试剂	管号						
	0	1	2	3	4	5	6
脯氨酸标准溶液/ml	0	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
水/ml	2	1.8	1.6	1.2	0.8	0.4	0
冰乙酸/ml	2	2	2	2	2	2	2
茚三酮显色液/ml	3	3	3	3	3	3	3
脯氨酸质量/ μg	0	2	4	8	12	16	20

(2)取出冷却后向各管加入 5ml 甲苯，充分震荡，以萃取红色物质。静置待分层后吸取甲苯层，以 0 号管为对照在波长 520nm 下比色。

(3)以消光值为纵坐标，脯氨酸质量为横坐标，绘制标准曲线，求线性回归方程。

样品测定：

(1) 取剪碎混匀的样品 0.2—0.5g(干样根据水分含量酌减)，加 5ml 质量分数为 3%的磺基水杨酸溶液研磨提取，匀浆转入离心管中，沸水浴浸提 10min（提取过程要经常摇动），冷却后 3000r/min 离心 10min，取上清液待测。

(2) 吸取上清液 2ml，加 2ml 冰乙酸和 3ml 显色液，于沸水中加热 40min，下步操作按标准曲线制作方法进行甲苯萃取和比色。

(3)结果计算。从标准曲线中查出测定液中脯氨酸的质量,按下式计算样品中脯氨酸干重或鲜重的质量分数。

$$\text{样品中脯氨酸的质量分数}/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = (C\cdot V)\cdot(a\cdot W)^{-1} \quad (9.4)$$

式中 C ——提取液中脯氨酸的质量(μg),由标准曲线求得;

V ——提取液总体积(mL);

a ——测定时所吸取的体积(mL);

W ——样品重(g)。

四、注意事项

配制的茚三酮溶液仅在 24 h 内稳定,因此最好现用现配。茚三酮的用量与脯氨酸的含量相关。一般当脯氨酸的质量浓度在 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,显色液中茚三酮的质量浓度要达到 $10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,才能保证脯氨酸充分显色。

参考文献: 郝再彬-植物生理实验 105—106

11、电导率测定

O^{-2} 含量测定:

O^{-2} in leaves was determined according to Zhao and Zou (2002): A 0.5 g (fresh mass) leaf sample was homogenized in 2 cm³ of 50 mM phosphate buffer, pH 7.8, at 4 °C. The homogenate was filtered through 4 layers of cheesecloth, and centrifuged at 5 000×g for 10 min. 1 cm³ of supernatant, 0.9 cm³ of phosphate buffer (pH 7.8), and 0.1 cm³ hydroxylamine (羟胺) (10 mM) were mixed and incubated at 25 °C for 20 min. Into 0.5 cm³ of incubated solution, 0.5 cm³ of *p*-aminobenzene sulfonic acid (17 mM) and 0.5 cm³ of α -naphthylamine (α 羟胺) (7 mM) were added. The mixture was incubated at 25 °C for 20 min. After incubation, the liquid became coloured and the same volume of ether was added. Then mixture was stirred and centrifuged at 1 500×g for 5 min. The A₅₃₀ absorbance of the pink layer was read. The O^{-2} content was calculated according to a standard curve.

Zhao, H.J., Zou, Q.: Protective effects of exogenous antioxidants and phenolic compounds on photosynthesis of wheat leaves under high irradiance and oxidative stress. – *Photosynthetica* 40: 523-527, 2002.

11、表皮蜡质:

扫描电镜样品制备: 将蒸馏水冲洗后的样品切成2mm见方的小块, 迅速固定于2.5%戊二醛 (pH7.2, 0.1M磷酸缓冲液) 中

蜡质提取:

Epicuticular wax from nodes three to five of 13 green and 15 grey trees, was extracted by immersing leaves in 40 ml chloroform for 30 s. The extracts were filtered, evaporated to dryness at room temperature and the wax yield calculated per unit surface area of leaf ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Total surface area of leaves was calculated by photocopying the leaves, carefully cutting them out and weighing them and calculating the area from a standard curve constructed from paper cut to known surface areas.

40ml氯仿浸提30s

参考文献: Variability in waxiness of *Eucalyptus gunnii* foliage for floriculture

蜡质含量的测定[3]: 每品种叶片称重后, 剪成5cm长的小段, 在氯仿中浸泡30s, 把溶液过滤到已知重量的蒸发皿中, 在通风柜中使氯仿挥发完后, 再次称重, 减去蒸发皿重量, 即为蜡质含量。以单位鲜叶重计算蜡质含量, 每品种重复5次, 取平均。Premachandra等[4]研究表明用叶圆片法测量时, 切割面溶入的内脂类、叶绿素和其他可溶物质对测量叶片的表皮蜡质无明显影响, 用本方法定量测定蜡质含量是可行的。

[3] 颜世文,倪宏涛,冷艳华. 不同抗感灰斑病品种叶片蜡质含量、叶比重的比较研究[J]. 种子世界,2001,2:24—25.

[4] Premachandra G S, Hahn D T, Joly R J. A simple method for determination of abaxial and adaxial epicuticular wax loads in intact leaves of *Sorghum bicolor*[J]. Can. J. Plant Sci. 1993,73(2): 521—524.

表皮蜡质含量的测定 表皮蜡质含量(wax content)的测定参照黄玲等[2]方法。称取每个品种的新鲜叶片0.2g, 剪成5cm小段, 置于已知重量的培养皿中, 加入30mL三氯甲烷浸泡1min, 准确计时, 夹出叶片, 在通风厨内使三氯甲烷完全挥发, 再次称量培养皿重, 2次差值为蜡质重(mg)。测量干物质含量, 以单位叶片干物质重计算蜡质含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。每个品种重复5次。

参考文献: 高羊茅叶片表皮蜡质含量与其抗旱性的关系

12、电导率测定

12、内源激素

13、花色素苷含量的测定

花色素苷含量的测定参照文献[6], 略作改进。取不同发育时期3朵花的花瓣, 冰浴中研磨, 用1%盐酸的甲醇室温下浸提3次, 合并提取液, 定容至25mL。在530nm处测定光吸收值(A)。A=1为一个花色素苷单位。每个样品重复3次。

参考文献: 孟祥春-矮牵牛花瓣发育过程中花色素苷、还原糖及蛋白质含量的变化

花色素苷含量的测定 花瓣采于盛花期, 每小区随机采3株, 每株采同位花1朵, 存于 -70°C 超低温冰箱。每朵花称取中间层花瓣1.000g, 液氮下研磨, 体积分数为1%盐酸甲醇溶液浸提24h, 过滤、定容至50mL容量瓶中, 每个样品重复3次。将提取液用体积分数为1%盐酸甲醇溶液稀释5倍, 用尤尼柯2000型分光光度计在524nm处测定吸光值(A), A=1为一个花色素苷单位, 重复测定3次, 取平均值。

参考文献: 遮荫及蔗糖喷施对牡丹花色及光合特性的影响

PH	1mol/l K_2HPO_4 (ml)	1mol/l KH_2PO_4 (ml)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.2