

教学园地 Teaching

适当增添实验内容的活体法测定植物体内硝酸还原酶活性的实验教学

刘海英*, 崔长海, 刘萍, 丁义峰, 赵倩, 刘彩迎
河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007

“活体法硝酸还原酶活性的测定”是植物生理实验课中的经典性实验之一(龚富生和张嘉宝1995; 张志良和瞿伟菁 2003)。在多年的实验教学过程中, 针对这一实验内容, 我们感觉到完全按照实验指导书中介绍的实验方法进行教学显得比较简单。学生做过实验后, 不了解标准曲线浓度梯度如何设置, 对光照、取样量、酶促反应时间等影响硝酸还原酶活性测定结果的因素印象不深, 也缺乏对标准曲线制作原理的认识, 大多数学生不会用统计学的手段处理实验数据。为此, 近年来我们在教学中将这一实验按照综合性实验进行了一些改进, 主要是增加学生对实验条件的摸索和对数据的科学处理, 强化学生对生命科学研究理念的培养。实验时由学生独立制定实验方案和进行实际操作, 教师只为学生准备必需的实验药品、仪器和必要的实验条件, 实验过程中给予必要的帮助和指导, 具体做法如下。

1 NaNO_2 浓度梯度系列设计的多样化

在这一实验中, 不同组的同学分别设置不同的浓度梯度, 其中有低浓度系列(0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中浓度系列(0.5、1、2、3、4、5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和高浓度系列(6、7、8、9、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)等。

2 实验条件设定的多元化

一般实验指导书中对此实验都是直接给出最佳的酶活性测定实验条件和操作步骤。实验材料用经过一定光照时间后的植物叶片(多在晴天的下午 15:00 取材); 样品重量为 0.3 或 0.4 g; 酶促反应温度为 30 $^{\circ}\text{C}$; 保温时间为 30 min。我们认为如果完全按这样的条件进行, 这不利于培养学生对新实验尤其是酶促反应相关实验的研究能力, 因而在教学中由学生自己对实验条件做了以下多种改进, 让学生了解酶活测定条件的重要性。

2.1 样品光照时间(取样时间) 光照时间设定为 3

种, 分不同时段取样以调节样品光照时间的长短, 分别是不充分光照(取材时间为 7:00)、中等程度光照(取材时间为 10:00)和充分光照(取材时间为 15:00)。取材应在晴天进行。

2.2 取样量 除了设定不同样品光照时间以外, 还建议学生探讨如何确定合适的取样量, 以原有实验指导书中的参考取样量为中等取样量(0.3或0.4 g), 另外增设低取样量(0.1 或 0.2 g)和高取样量(0.5 或 0.6 g)。

2.3 酶促反应中的温度 实验指导书中的温度设定比较单一, 并不能反映酶促反应的温度变化特点, 为此, 将温度分为 5 个水平, 即 10、20、30、40 和 50 $^{\circ}\text{C}$ 。不同温度均用生化培养箱调节而成。

2.4 酶促反应时间 将原有实验指导书中的一种酶促反应时间(30 min)改为 5 个水平, 即 10、20、30、40 和 50 min, 比较不同酶促反应时间对实验结果的影响。

3 实验结果的整理

一般实验指导书中的实验方法相对简单, 以致学生对实验结果的分析讨论也显得相对简单。经过我们改进后, 由于实验条件的多元化, 实验结果也比较复杂多样, 同时出于提高学生对实验数据分析能力的考虑, 我们布置学生按以下要求撰写实验报告。

3.1 标准曲线的制作和实验数据的处理 在训练学生用原实验指导书中的直接绘图法绘制标准曲线和查图法以求得 $[\text{NO}_2^-]$ 的同时, 还要求学生分别用逐步笔算(按照生物统计学方法)和 Excel 软件计算进行以下数据处理, 即①计算不同浓度 NaNO_2 梯度所得到的标准曲线的回归方程, 并进行显著性检验, 筛

收稿 2009-10-20 修定 2009-12-31

* 通讯作者(E-mail: hbhaiying@yahoo.com.cn; Tel: 0373-3326340)。

选出线性关系最好的浓度系列与标准曲线;②根据实验所测得的各组处理的吸光度值,运用标准曲线的回归方程进行实验结果的运算;③对不同实验条件下所得各组的实验数据进行方差分析,对实验结果进行差异显著性检验。通过了解这些不同方法在运算效率和精度中的区别,学生可以掌握标准曲线的制作原理,同时还会自觉运用统计学知识和计算机软件的统计分析功能对标准曲线进行建立数学模型。这样能培养学生准确、高效、方便和快捷处理数据。

3.2 实验结果的总结 要求学生按以下几个问题总结。即①相同取样量、酶促反应时间和温度条件下,样品不同光照时间对硝酸还原酶活性的影响;②相同光照时间、酶促反应时间和温度条件下,不同取样量对硝酸还原酶性的影响;③相同光照时间、取样量、酶促反应时间下,不同酶促反应温度对硝酸还原酶活性的影响;④相同光照时间、取样量、酶促反应温度条件下,不同酶促反应时间对硝酸还原酶活性的影响。要求学生根据这些不同实验结果进行总结,以测定结果落在最佳标准曲线的线性区间中段的实验条件为最适合,最终明确硝酸还原酶活性测定中的最佳实验条件。学生主动专研实验技术尤其是酶促反应实验的能力又得到了锻炼和提高。

4 实验报告的写作

要求学生在实验报告中详细列出实验设计、原始数据记录、运算过程和计算机相关操作流程和运算结果,数据以图或表列出,图表格式、实验结果与分析以及讨论均严格按照科学论文格式和要求撰写。

5 几点体会

(1)实验可采用盆栽材料,样品光照时间可采用光照培养箱控制;(2)同时探讨多因素和多水平的影响因素对硝酸还原酶活性的影响时,可以采用正交设计减少处理组合数,这样多种实验内容可在一次实验课中完成。

总之,本文中的实验做法有以下优点:(1)标准曲线的设计多样化,筛选出的标准曲线更具科学性;(2)实验条件多样化,实验中最佳条件的确定比较可靠、可信和客观;(3)引入并重视统计学知识和计算机相关软件的应用,可以锻炼学生处理数据的能力;(4)通过实验结果总结和实验报告写作的改进,增强学生分析总结、归纳实验现象和结果的能力,学生对实验内容的印象也深。

参考文献

- 龚富生,张嘉宝(1995).植物生理学实验.北京:气象出版社,55~58
张志良,瞿伟菁(2003).植物生理学实验指导.北京:高等教育出版社,41~43