

教学园地 Teaching

磺胺比色法测定植物组织硝酸还原酶活性的改进

李忠光*, 龚明

云南师范大学生命科学学院, 昆明 650092

“植物组织硝酸还原酶(NR)活性的测定”是植物生理学矿质营养一章中必做的实验,其目的是让学生掌握植物硝酸还原酶(nitrate reductase, NR, EC. 1.6.6.1)活性测定的原理和技术方法,进一步了解NR在植物氮素同化过程中的作用(白宝璋和汤学军 1993; 李合生等 2001; 郝建军等 2007)。但是,在实验教学中,我们感到,按照几种植物生理学实验指导书中介绍的方法(白宝璋和汤学军 1993; 李合生等 2001; 郝建军等 2007)测定NR活性,测得的NR活性很低,有时甚至检测不出来。因此我们对此方法的显色液配方、显色时间、三氯乙酸对显色反应的影响和实验材料的取舍进行了探索,取得了较好的实验效果。

1 显色液配方和显色时间的确定

磺胺比色法测定植物组织NR活性的原理,是根据NR还原 NO_3^- 后所产生的 NO_2^- 在酸性条件下首先与磺胺发生重氮化反应形成重氮盐,后者再进一步与 α -萘胺发生偶联反应形成粉红色的偶氮化合物,通过测定偶氮化合物形成的量来表示硝酸还原酶活性的大小,因此常用到磺胺和 α -萘胺2种显色剂。但是,我们在实验中发现,按照实验指导书中的方法用25% HCl (V/V, 即 $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)分别配制磺胺和 α -萘胺2种显色剂,表现出溶解度小,反应速度慢,灵敏度低,显色时间长(实验指导书中为30 min)等缺点。在用磺胺比色法测定植物组织NR活性实验中,酸度是影响重氮化反应和偶联反应的主要影响因素之一(张志良和瞿伟菁 2003),为了找出合适的显色液配方,也就是合适的显色液酸度,我们除了用实验指导书中指定的配方,即用 $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的HCl分别配制磺胺和 α -萘胺2种显色剂外,还用相同浓度的 H_2SO_4 、 H_3PO_4 和HAc分别配制显色液,并在25℃下测试它们分别与 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NaNO_2 显色反应15 min和30 min的光密度 A_{520} ,得到表1的结果。从表1可以看出,随着酸强度的增加,2个显色时间的 A_{520} 都呈现逐渐下降的趋势,具体表现

为 $\text{HAc} > \text{H}_3\text{PO}_4 > \text{HCl} > \text{H}_2\text{SO}_4$ 。此外,以 $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc为溶剂配制的显色液与 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NaNO_2 显色反应15 min,其 A_{520} 即可达到最大值,而其余3种需显色30 min, A_{520} 才能达到最大值,并且它们的 A_{520} 始终小于HAc的,说明用HAc配制的显色液其显色反应速度和灵敏度都明显高于分别以 H_2SO_4 、HCl和 H_3PO_4 为溶剂配制的。因此,在植物组织NR活性测定中,以 $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc为溶剂配制磺胺和 α -萘胺2种显色剂,不仅可提高显色反应的灵敏度,而且还可以加快显色反应的速度并缩短显色反应的时间。

表1 几种配方的显色液对 NO_2^- 显色速度和灵敏度的影响

配方	A_{520}	
	显色 15 min	显色 30 min
实验指导书中的配方	$3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl	0.228 ± 0.011 0.467 ± 0.022
改进和新增加的配方	$3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2SO_4	0.182 ± 0.008 0.448 ± 0.017
	$3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_3PO_4	0.329 ± 0.013 0.561 ± 0.025
	$3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc	0.648 ± 0.031 0.654 ± 0.030

表中数据为重复3次的平均值 \pm 标准误。

间,显色反应时间仅为15 min,光密度 A_{520} 就可达到最大值,达到事半功倍的效果。

2 三氯乙酸对显色反应的影响

在用活体法测定植物组织NR活性时,植物生理学实验指导书中常用终浓度为3% ($184 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的三氯乙酸(TCA)终止酶促反应(李合生等 2001)。我们在实验中用上述2种显色液(即以 $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl或HAc为溶剂分别配制磺胺和 α -萘胺)在25℃下分别测试了用蒸馏水或 $184 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCA配制的 $5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NaNO_2 ,以及用TCA终止酶促反应法(TCA终止法)测定蜀葵叶片中的NR活性(酶促反应

收稿 2008-10-19 修定 2008-11-17

资助 云南师范大学综合性和设计性实验研究项目。

* E-mail: zhongguang_li@163.com; Tel: 0871-5517394

时间到后,立即把被测液从含有实验材料的反应体系中取出的方法称为隔离法),显色30 min后分别测定其光密度 A_{520} ,得到表2的结果。从表中可以看出,与以蒸馏水为溶剂配制 NaNO_2 相比,用TCA配制(相当于用TCA终止酶促反应)明显降低了 A_{520} ;类似地,用TCA终止法所测出的 A_{520} 也明显低于隔离法。这些结果说明TCA降低了磺胺比色法测定 NO_2^- 的灵敏度,其原因可能是外加TCA后导致反应体系的酸度变大,从而影响重氮化反应和偶联反应的速度(张志良和瞿伟菁2003;表1)。这些结果表明在植物组织NR活性测定中,用TCA终止反应是不适合的,否则测定结果将明显偏低,实验指导书中用TCA终止反应值得商榷。为了更准确地测定NR活性,酶促反应结束后,立即将所测液从含有实验材料的反应体系中取出(隔离法),从而使底物和NR分离,仍可达到终止酶促反应的目的。

表2 TCA对磺胺比色法测定NR活性显色反应的影响

测定内容和方法	A_{520}	
	3 mol·L ⁻¹ HCl	3 mol·L ⁻¹ HAc
5 μg·mL ⁻¹ NaNO ₂ 水溶液	0.467±0.022	0.654±0.030
5 μg·mL ⁻¹ NaNO ₂ TCA 溶液	0.354±0.016	0.512±0.024
隔离法	0.538±0.020	0.752±0.026
TCA 终止法	0.406±0.018	0.588±0.021

表中数据为重复3次的平均值±标准误。

3 实验材料的取舍

由于不同实验材料中NR活性差别较大,有的实验材料甚至检测不出NR活性,因此在植物组织NR活性测定中,选择合适的实验材料成为实验成功与否的关键。为了筛选出适合于NR活性测定的实验材料,我们结合实验教学实际,除了用上述3 mol·L⁻¹ HAc分别配制磺胺和 α -萘胺2种显色剂,测定实验指导书中介绍的水培2周的水稻(*Oryza sativa* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、豌豆(*Pisum sativum* L.)和烟草(*Nicotiana tabacum* L.)等几种植物叶片中的NR活性以外,还以校园植物如法国梧桐(*Platanus orientalis* L.)、天

竺葵(*Pelargonium hortorum* Bailey)、向日葵(*Helianthus annuus* L.)、蓖麻(*Ricinus communis* L.)和蜀葵(*Althaea rosea* Linn.)等植物叶片为实验材料进行了NR活性的测定,得到表3的结果。从表3可以看出,实验指导书中介绍的几种实验材料的NR活性在4.5~32.6 μg·g⁻¹ (FW)·h⁻¹之间,平均值为14.78 μg·g⁻¹ (FW)·h⁻¹,而新测定的几种植物实验材料的NR活性在44~206.6 μg·g⁻¹ (FW)·h⁻¹之间,平均值为125 μg·g⁻¹ (FW)·h⁻¹,NR活性大约是前者的8.5倍,表现出很高的NR活性。

表3 几种实验材料中的NR活性比较

实验材料	酶活性/μg·g ⁻¹ (FW)·h ⁻¹
实验指导书中的实验材料	
水稻	14.5±0.3
小麦	26.1±1.0
玉米	52.5±1.5
豌豆	39.2±1.2
烟草	105.6±4.3
改进和新增加的实验材料	
法国梧桐	145.2±5.5
天竺葵	264.3±7.5
向日葵	390.6±11.5
蓖麻	570.4±12.1
蜀葵	688.5±15.2

表中植物叶片的取材时间为下午2点,数据为重复3次的平均值±标准误。

综上所述,在植物组织NR活性测定中,我们建议广大同行在选用合适的实验材料,如向日葵、蓖麻和蜀葵等植物叶片,尤其以蜀葵叶片为最佳的基础上,以3 mol·L⁻¹ HAc为溶剂分别配制磺胺和 α -萘胺两种显色剂,不仅可以提高显色反应的灵敏度,而且还可以加快显色反应的速度并缩短显色反应的时间,达到事半功倍的效果,对于实验指导书中用TCA终止NR酶促反应的方法值得商榷。

参考文献

- 白宝璋, 汤学军(1993). 植物生理学测试技术. 北京: 科学技术出版社, 24~25
- 郝建军, 康宗利, 于洋(2007). 植物生理学实验技术. 北京: 化学工业出版社, 62~64
- 李合生, 赵世杰, 张文华(2001). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 125~128
- 张志良, 瞿伟菁(2003). 植物生理学实验指导(第3版). 北京: 高等教育出版社, 42