

愈创木酚法测定植物过氧化物酶活性的改进

李忠光*, 龚明

云南师范大学生命科学学院, 昆明 650092

“过氧化物酶活性的测定”是植物生理学呼吸作用一章中必做的实验内容,其目的是让学生掌握愈创木酚法测定植物过氧化物酶活性的原理和方法,了解过氧化物酶在植物生长发育和抵抗不良环境中的作用。但是,在教学中,我们发现按照几种植物生理学实验指导书中的方法(白宝璋和汤学军 1993;高俊风 2006;王学奎 2006)测定的植物过氧化物酶活性明显偏低。因此我们进行了如下的探讨和改进,与广大同行共切磋。

1 酸对过氧化物酶酶促反应的终止效应

一般的植物生理学实验指导书中的过氧化物酶活性测定常用三氯乙酸(TCA)或偏磷酸(HPO_3)_n终止酶促反应(白宝璋和汤学军 1993;高俊风 2006;王学奎 2006),我们发现这两种酸终止的光密度 A_{470} 都显著降低(表 1)。为了寻找合适的可用于终止反应的酸,在反应启动后 3.5 min (即向反应体系加入酶液 3.5 min 后),除立即用 TCA 或 (HPO_3)_n 以外,我们还用 H_2SO_4 、HCl 和 H_3PO_4 终止反应,与加酸前的对照(即反应 3.5 min 时的 A_{470} 值)相比,其 A_{470} 值有不同程度的降低(表 1),加酸后由于稀释的原因 A_{470} 的影响已经作了折算。说明在植物过氧化物酶活性的测定中,用酸终止反应是不适合的,否则测得的值即明显偏低,其原因可能是反应产物 4-邻甲氧基苯酚在酸性环境中不稳定造成。这些结果表明一些实验指导书中用 TCA 或(HPO_3)_n, 以及 H_2SO_4 、HCl 和 H_3PO_4 终止反应值得商榷。

表 1 不同酸终止酶促反应对光密度的影响

加入的酸	A_{470}
对照	0.625±0.016
TCA	0.369±0.010
(HPO_3) _n	0.387±0.012
H_2SO_4	0.344±0.011
HCl	0.350±0.014
H_3PO_4	0.381±0.013

表中数据为至少 3 次重复的平均值±标准误。

2 过氧化物酶酶促动力学

由于以酸终止酶促反应实验结果明显偏低,为了更准确地测定植物过氧化物酶活性,我们以愈创木酚为底物,反应体系中加入酶液后,每 30 s 测定 A_{470} 的增加值(即产物 4-邻甲氧基苯酚形成的量)代表植物过氧化物酶活性的大小,以时间对 ΔA_{470} 作图,得到过氧化物酶酶促动力学曲线(图 1)。显示,在 0~3.5 min 内,随着酶促反应时间的增加, A_{470} 也随之增加,表现出较好的线性关系,符合比耳定律($A=KLC$)的条件。但是,当反应时间超过 3.5 min 后,反应速度明显降低,不符合比耳定律。所以在过氧化物酶活性的测定中,如果反应超过 3.5 min,必然导致实验结果不同程度的偏低,说服力不强。因此,我们认为应该以反应 3 min 计算酶活性。

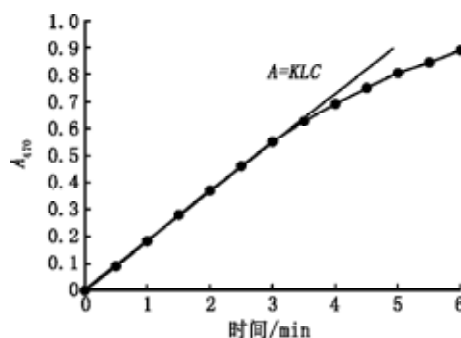


图 1 过氧化物酶反应动力学曲线

3 两种测定植物过氧化物酶活性方法的比较

为了检验“反应动力学法”测定植物过氧化物酶活性的有效性和可行性,我们以实验指导书中所用的实验材料马铃薯块茎和小麦根系为材料,与实验指导书中的“酸终止法”比较两种方法的结果(表 2)表明,按照实验指导书中“酸终止法”

收稿 2007-12-26 修定 2008-02-13

资助 云南师范大学综合性、设计性实验研究项目。

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

表2 两种测定植物过氧化物酶活性方法的比较

实验材料	过氧化物酶活性 /U·g ⁻¹ (FW)		
	酸终止法		反应动力学法
	TCA	(HPO ₃) _n	
马铃薯块茎	491.28±12.23	514.56±15.43	831.67±18.30
小麦根系	531.45±16.45	553.60± 9.50	894.23±21.62

表中数据为至少3次重复的平均值±标准误。

测出的过氧化物酶活性明显低于“反应动力学法”。

综上所述,我们认为,在植物过氧化物酶活性的测定中,不能用TCA或(HPO₃)_n,以及H₂SO₄、HCl和H₃PO₄终止反应,否则其结果即会偏低;用“反应动力学法”,其反应时间0.5~3.5 min的A₄₇₀值计算酶活性,这样的结果会更加准确。

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, 148~149
- 高俊风(2006). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 217~218
- 王学奎(2006). 植物生理生化实验原理和技术. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 167~168