

教学园地 Teaching

教学实验中硝酸还原酶活性测定方法的改进

刘亚丽* 赵喜婷

河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007

测定硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)活性在植物生理教学实验中一般是必做的。但其中 α -萘胺的配制是用盐酸做溶剂, 加入蒸馏水后, 会沉淀出一部分, 因而溶液有效成分降低, 致使显色反应中的颜色很浅, 酶活性小的几乎看不到颜色。对此, 我们做了一些摸索, 现概述如下。

1 测定试剂的配制

α -萘胺的配制: 称0.2 g α -萘胺, 加入25 mL浓盐酸, α -萘胺在浓盐酸中溶解很慢, 再用蒸馏水定溶到100 mL, 这样大部分 α -萘胺又重新结晶呈片状沉淀。为使实验效果明显起见, α -萘胺应达到一定的浓度, 为此应提前半个月配制并放入30℃温箱中, 期间不时进行摇晃使其加速溶解, 但到做实验时仍然有大量沉淀物不能溶解。由于 α -萘胺含量低, 显色反应的效果不好, 结果不会理想, 阴雨天或光照度小时更不明显, 有时甚至看不到红色反应。对此我们把0.2 g α -萘胺由加入25 mL浓盐酸改为加入25 mL冰醋酸, 这样 α -萘胺即很快全部溶解, 并在加入蒸馏水定溶至100 mL后, 再也没有结晶析出。由于所配制试剂有效成份高, 显色生成的红色螯合物很明显, 实验效果相当理想。如果采用张志良等(2003)的方法, 即将0.2 g α -萘胺改为加入含有1 mL浓盐酸的100 mL蒸馏水中, α -萘胺也不能彻底溶解。用同一种材料, 两种试剂分别配制成的 α -萘胺溶液所测得的NR活性是, 冰醋酸为469.3 $\mu\text{g}(\text{NO}_2^-)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$, 浓盐酸为136.5 $\mu\text{g}(\text{NO}_2^-)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$ 。

磺胺试剂的配制: 将1 g磺胺用少量酒精于水浴中加热溶解后, 再加入25 mL浓盐酸时, 呈现的白色乳状液需要很长时间才能慢慢溶解, 如果再用蒸馏水定溶到100 mL, 这既费时, 加热时又易着火。因此我们将操作流程改为: 加入酒精后立即加入盐酸, 也出现白色乳状液, 但立即用蒸馏水定溶到100 mL, 此时利用酸遇水产生的大量热量, 不断搅拌很快就会彻底溶解, 但要注意安全。另外, 使用的盐酸要纯净, 不要有杂质

和颜色, 要用分析纯(AR)或化学纯(CP)级的盐酸。

2 试剂加入顺序

硝酸还原酶存在于细胞质中, 在显色反应过程中要先加入磺胺, 目的是让酸性溶液中的磺胺与 NO_2^- 生成重氮盐, 再与 α -萘胺反应生成红色螯合物。否则, 先加入的 α -萘胺会与 NO_2^- 生成另一种重氮盐, 这种重氮盐不再与磺胺生成红色螯合物, 从而影响实验效果。作者实验证明: 取5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NO_2^- 溶液2 mL, 先加入磺胺、后加入 α -萘胺各4 mL, 测得的OD值为0.384; 而先加入 α -萘胺、后加入磺胺各4 mL, 测得的OD值仅为0.063, 两者相差6倍多。

3 实验材料的选择和反应时间的确定

秋冬季用萝卜叶片比白菜叶片的效果好, 晚上比白天的酶活性高, 如萝卜叶片的酶活性(下午3时)为366.9 $\mu\text{g}(\text{NO}_2^-)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$, 白菜叶片只有229.8 $\mu\text{g}(\text{NO}_2^-)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$; 晚上萝卜叶片的酶活性(晚7时)是434.6 $\mu\text{g}(\text{NO}_2^-)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$, 比下午3时增加67.7 $\mu\text{g}(\text{NO}_2^-)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$, 而白菜叶片是239.4 $\mu\text{g}(\text{NO}_2^-)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$, 仅增加9.6 $\mu\text{g}(\text{NO}_2^-)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$ 。一般来说, 嫩叶比老叶的光合速率大, 深绿色叶片比黄绿色叶片效果好, 因而会造成NR活性的差异, 如深绿色萝卜叶中酶活性为508.2 $\mu\text{g}(\text{NO}_2^-)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$, 而黄绿色叶片仅为312.5 $\mu\text{g}(\text{NO}_2^-)\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$ 。其次, 该实验因对光照和温度要求比较高, 应尽量安排在9、10或11月份, 12月份以后实验效果就不好。另外, 晴天比阴雨或下雪天效果好, 这显然是阴雨或雪天植物光合能力较弱所致, 因而实验结果不明显。

参考文献

- 张志良, 瞿伟菁, 李小芳, 傅中滇, 王小菁, 王隆华, 赵旌旌, 张雯 (2003). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 41~43

收稿 2005-11-22 修定 2006-03-17

资助 河南省自然科学基金(0511020600)。

*E-mail: ly112@163.com, Tel: 0373-3328189