

硝酸还原酶活性测定实验中的植物材料选择研究

陶懿伟, 史益敏

(上海交通大学 农业与生物学院, 上海 201101)

摘要: 研究选用木芙蓉、黑麦草等 11 种植物材料进行硝酸还原酶活性测定的可行性, 选出了 5 种适用于不同季节的实验植物材料。用不同浓度的 KNO_3 溶液诱导小麦幼苗硝酸还原酶活性的进一步试验表明: 用 25 ~ 75 mmol/L 的 KNO_3 溶液处理后 2 ~ 4 d 做实验材料效果较好。

关键词: 硝酸还原酶; 活性; 诱导

中图分类号: Q945.12; O621.254

文献标识码: A

Plant Materials Suitable for Nitrate Reductase Activity Assay in Student Experiments

TAO Yi-wei, SHI Yi-min

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong Univ., Shanghai 201101, China)

Abstract: Different plant species such as hibiscus and ryegrass et al were selected as materials for nitrate reductase activity assay in college student experiments. 5 plant materials selected from 11 species were suitable for nitrate reductase activity assay. Wheat plantlets were treated with different concentrations of KNO_3 to induce the nitrate reductase activities. The results showed that it is good for nitrate reductase activity assay that the wheat plantlets were used 2 ~ 4 d after treatment with 25 ~ 75 mmol/L KNO_3 .

Key words: nitrate reductase; activity; inducement

硝酸还原酶(Nitrate reductase, NR)是高等植物氮代谢的关键酶。植物的氮源主要是无机氮化物, 而无机氮化物中又以铵盐和硝酸盐为主, 约占土壤含氮量的 1% ~ 2%, 植物吸收铵盐后可直接用于氨基酸的合成, 如果吸收了硝酸盐, 则必须通过 NR 进行代谢还原才能被植物利用^[1], 可见, NR 对植物氮营养是非常重要的。NR 是一种诱导酶, 通常在有 NO_3^- 存在时, 会诱导 NR 的活性。经过光照, NR 活性也会大大提高, 同时, 光照还能通过加强植物对硝酸盐的吸收而提高 NR 活性^[2]。

NR 的活性测定是植物生理学实验课中一个重要的实验。近年来, 我们在做预备实验时发现, 有许多植物材料没有 NR 活性, 如果选材不当, 则很可能在学生实验时会出现问题。因此我们在不同的季节, 对学校周围及农场的一些植物, 在不同的光照时间段进行了 NR 活性的测定, 并用小麦幼苗进行了 NR 的诱导试验, 以便选出 NR 活性较强、容易采集的材料, 为学生实验的材料选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

在不同的季节从学校周围及农场采集各种植物叶片, 包括: 木芙蓉 (*Hibiscus mutabilis* L.)、腊梅

(*Chimonanthus praecox* (L.) Link)、冬青(*Ilex chinensis* Sims)、向日葵(*Helianthus annuus* L.)、紫藤(*Wisteria sinensis* Sweet)、大叶黄杨(*Euonymus japonicus* Thunb.)、夹竹桃(*Nerium indicum* Mill.)、青菜(*Brassica chinensis* L.)、萝卜(*Raphanus sativus* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)和黑麦草(*Lolium perenne* L.)。

1.2 方法

1.2.1 不同材料硝酸还原酶活性的测定 样品采集分3个不同的时间段,分别为:A.日出前;B.上午8点,光照约2h;C.下午1点,光照约7h。将采集的材料密封于塑料袋带回实验室,冲洗干净并吸干,置冰箱内备用。

采用活体法测定NR活性。具体方法是:每个样品随机取均匀的小块3份,每份0.5g,分别置于三角瓶中,各加入0.1mol/L磷酸缓冲液5mL,其中1份加入蒸馏水5mL作为对照,另2份各加入0.2mol/L硝酸钾溶液5mL,反复抽真空,直至样品沉入瓶底,再将各样品放入30℃恒温箱中,暗中保温30min后立即分别加入1.0mL的30%三氯乙酸并摇匀,终止酶反应。分别吸取各样品液2mL于试管中,加入1%对氨基苯磺酸溶液和0.2%α-萘胺溶液各2mL,摇匀后在30℃恒温箱中,暗中显色30min,在波长520nm处测其光密度值,以对照管为空白参比。取同一样本的2个光密度值的平均值,从标准曲线上查出反应形成的NO₂⁻含量,计算NR活性。NR活性以每小时每克鲜材料产生NO₂⁻的微克数来表示^[3,4]。

1.2.2 NR活性诱导 用1g/L升汞消毒小麦种子10min,浸种8h,催芽1d后播种于塑料筐中,培养5d后用7种不同浓度的KNO₃溶液处理12h,KNO₃溶液的浓度分别为:A.0mmol/L、B.25mmol/L、C.50mmol/L、D.75mmol/L、E.100mmol/L、F.125mmol/L、G.150mmol/L、H.175mmol/L、I.200mmol/L。处理2d后测定NR活性,每隔2d测定1次,共测3次。每个处理随机选取15根小麦幼苗,从茎中部至叶片用剪刀剪取长约3mm的小段,取3份,每份0.5g,1份为对照。NR活性的测定同上^[3,4]。

2 结果与分析

2.1 不同植物材料NR活性的差异

对木芙蓉等11种植物材料进行了NR活性的测定。结果表明各材料间NR活性,其活性有明显差异。其中向日葵的NR活性最高,达35.5μg/g/h,木芙蓉、小麦和黑麦草次之,分别为31.0μg/g/h、21.5μg/g/h和23.0μg/g/h,冬青较低,青菜、萝卜、紫藤、腊梅、大叶黄杨和夹竹桃的NR活性很低或基本没有活性(表1)。

2.2 不同光照时间对NR活性的影响

试验结果表明:凡是有NR活性的材料,在经过一段时间的光照后,NR活性增加显著,其中向日葵和木芙蓉增加尤为明显,在经过了约7h的光照后,分别从光照前的2.0μg/g/h和3.5μg/g/h增加到35.5μg/g/h和31.0μg/g/h,在经过约2h的光照后其NR活性也达到了26.0μg/g/h和25.5μg/g/h,由此可见光照对NR活性具有明显的促进作用,小麦和黑麦草经过约7h光照后,NR活性也有较大的提高,分别从光照前的3.0μg/g/h和4.5μg/g/h增加到21.5μg/g/h和23.0μg/g/h,经过约2h光照后的数值是17.5μg/g/h和16.0μg/g/h。冬青较低,而紫藤等6种植物材料NR活性很低或没有活性,因此光照对其基本没有影响(表1)。

表1 不同植物材料硝酸还原酶活性的差异
Table 1 The NR activities in different plant materials

实验材料 Plant materials	NR活性 NR Activities		
	A	B	C
木芙蓉 Hibiscus	3.5	25.5	31.0
青菜 Greengrocery	0.0	0.0	2.0
萝卜 Radish	0.0	1.0	3.0
紫藤 Wistaria	0.0	0.0	0.0
向日葵 Sunflower	2.0	26.0	35.5
冬青 Holly	1.0	5.0	9.0
腊梅 Calyx canthus	0.0	0.0	0.0
大叶黄杨 Euonymus japonicus	0.0	0.0	0.0
夹竹桃 Rosebay	0.0	0.0	0.0
小麦 Wheat	3.0	17.5	21.5
黑麦草 Ryegrass	4.5	16.0	23.0

2.3 不同浓度的 NO_3^- 对 NR 活性的影响

2.3.1 不同浓度 NO_3^- 处理小麦幼苗对 NR 活性的影响 由表 2 可知,除了用于对照的 A 浓度外,其余 8 种对 NR 活性都有影响,但有明显差异,其中以处理 C 为最高达 $37.5 \mu\text{g/g/h}$,其次是处理 D 和 B,分别为 $31.0 \mu\text{g/g/h}$ 和 $27.5 \mu\text{g/g/h}$,由此可见用适当浓度的 NO_3^- 处理小麦幼苗,可诱导 NR 活性。从处理 E 到处理 I,可能是由于 NO_3^- 浓度过高,影响了小麦对 NO_3^- 的吸收,从而抑制了诱导作用,表现为 NR 活性很低,有的基本没有。

2.3.2 处理后不同测定时间 NR 活性差异 NO_3^- 诱导处理后不同测定时间的 NR 活性差异较大。从表 2 可以看出,在处理 2 d 进行测定, NR 活性表现为最强,最高的处理 C 可达 $37.5 \mu\text{g/g/h}$,最低的也有 $1.0 \mu\text{g/g/h}$ 。但处理后 4 d 测定,最高的处理 C 已从 $37.5 \mu\text{g/g/h}$ 降到 $12.5 \mu\text{g/g/h}$,处理 B 和 D 也分别从 $27.5 \mu\text{g/g/h}$ 和 $31.0 \mu\text{g/g/h}$ 降到了 $17.0 \mu\text{g/g/h}$ 和 $7.0 \mu\text{g/g/h}$,2 个原来较低的处理 H 和处理 I 已降为 0,处理后 6 d 测定除了 B、C、D 3 个处理还有一点活性外,其余的均已降到 0。由此可见,随着时间的推移和小麦体内 NO_3^- 的消耗, NR 活性也在逐渐地降低。

表 2 不同浓度的 NO_3^- 对 NR 活性的影响
Table 2 The effects of different concentrations of NO_3^- on NR activities $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

KNO ₃ 浓度 KNO ₃ Con/mm $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	NR 活性 NR Activities		
	处理后 2 d 2 days after treatment	处理后 4 d 4 days after treatment	处理后 6 d 6 days after treatment
A	0.0	0.0	0.0
B	27.5	17.0	4.5
C	37.5	12.5	3.0
D	31.0	7.0	2.5
E	9.5	2.0	0.0
F	6.0	3.5	0.0
G	10.0	2.5	0.0
H	2.5	0.0	0.0
I	1.0	0.0	0.0

3 讨论

在对上海交大农业与生物学院周围及农场的 11 种植物材料进行了 NR 活性的测定后发现,木芙蓉、向日葵、小麦和黑麦草的 NR 活性较强,可用作学生做 NR 活性实验的材料,这 4 种植物材料覆盖 1 年 4 季,可满足学生实验对材料的需求。如果采集不到这 4 种,也可选用冬青,虽然它 NR 活性较低,但能显色,也能获得一个较好的效果。并且它的种植面广,到处都能采到。

光照能提高 NR 活性,从试验结果发现,在光照约 2 h 以上,也就是在上午 8~9 点以后采集的植物材料,用来做 NR 活性的测定,其效果是较好的。遵循这一点,在每次学生实验前,应该在植物材料经过一段时间的光照后,再采回做实验,会得到一个理想的实验效果。

用不同浓度的 NO_3^- 处理小麦来诱导 NR 活性,使我们找到了合理的诱导浓度。在实验时如果找不到现成的植物材料,可以用小麦种子发芽,再用 $25 \sim 75 \text{ mmol/L}$ 的 KNO_3 溶液处理小麦幼苗,诱导 NR 活性,在处理 2~4 d 内,用此材料做 NR 活性测定的实验,可获得较好的实验效果。

参考文献:

- [1] 王 忠. 植物生理学[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [2] 余让才,范燕萍,李明启. 光/暗转换对小麦幼苗硝酸还原酶活性的影响[J]. 华南农业大学学报,2001,22(3):37-39.
- [3] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版,2000.
- [4] 张慧茹,郑 蕊,杨晓琴. 宁夏区内抗旱牧草硝酸还原酶活力的比较研究[J]. 宁夏大学学报(自然科学版),2002,23(6):278-280.