

## 教学园地 Teaching

植物生理学实验教学中  $H_2O_2$  可视化检测方法的改进

邵玲\*

肇庆学院生命科学学院, 广东肇庆 526061

活性氧(reactive oxygen species, ROS), 如超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )、羟自由基( $\cdot OH$ )和过氧化氢( $H_2O_2$ )均是植物尤其是高等植物在有氧代谢过程中产生的, 植物组织受到环境胁迫时大量富集(Fryer等 1998; Apel和Hirt 2004)。一般认为 $H_2O_2$ 是植物体内产生的最稳定的活性氧分子, 它可以直接或间接地导致细胞膜脂的过氧化伤害, 加速细胞的衰老和解体。因此, 在植物抗性生理教材中, 其含量测定是采用率较高的实验教学内容。

一般常用的测定 $H_2O_2$ 方法主要有: 用硫酸钛[Ti(IV)]与 $H_2O_2$ 反应, 以分光光度计比色测定 $H_2O_2$  (李玲 2009), 但此法由于需要用丙酮洗涤脱色, 常引起 $H_2O_2$ 降解, 即使平行测定的同一样品, 得出的结果也有较大的偏差(吕波等 2000)。如改用5%三氯乙酸(TCA)提取, 活性炭(A.C.)脱色, 经Ti(IV)-PAR- $H_2O_2$  [PAR: 4-( $\alpha$ -吡啶偶氮)间苯二酚]反应而比色后, 由于活性炭会吸附部分 $H_2O_2$ , 所测定的数值偏低(Patterson等 1984)。而根据文献报道的紫外吸收动力学法(夏金婵等2005; 张小莉等2009), 需要对材料进行预处理, 以去除有色细胞后才能检测, 这样又破坏了材料原有的生理状态。同时, 定量测定植物组织中的 $H_2O_2$ 含量, 其直观感不强, 常会导致学生对逆境下 $H_2O_2$ 在植物体内存在状况的认识比较模糊。

$H_2O_2$ 是氧化进程中的主要产物之一。为提高学生对逆境胁迫下 $H_2O_2$ 在植物组织和细胞间快速生成的感观认识, 我们改用组织化学的方法, 以二氨基联苯胺(DAB)组织化学染色法检测植株或组织内 $H_2O_2$ 的积聚。此技术的优势之处在于具有组织特异性, DAB在过氧化物酶(POD)参与下与 $H_2O_2$ 在 $H_2O_2$ 产生的部位发生反应而形成红褐色聚合物(DAB+POD+ $H_2O_2 \rightarrow$  DAB- $H_2O_2$  polymers)。因此, 用DAB染色可以检测植物受到环境胁迫时是否有 $H_2O_2$ 积累, 同时根据观察所产生斑点的多寡, 还可以初步估算 $H_2O_2$ 的积累量(Lin等 2005; 邵玲等 2008)。但也有较多的文献报道(Hu等 2005; 李艳

辉等 2008)认为此法也有问题, 即 $H_2O_2$ 与DAB反应生成的棕红色多聚产物只在叶片的叶脉中明显积累, 而叶肉细胞中几乎观察不到, 这种现象在禾本科植物叶片中更为明显, 有时会误认为胁迫并不能诱导叶肉细胞中 $H_2O_2$ 的产生。所以, 此法有时并不能反映胁迫条件下 $H_2O_2$ 积累的真实情况(李艳辉等 2008)。根据以上情况, 我们重新筛选了实验材料, 并对检测方法进行了改进, 使这一实验便于课堂操作, 得到的结果清晰。

## 1 材料与方法

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子为 Landsbergerecta (Ler)生态型。将种子清洗消毒, 于4 °C以水浸种2 d后播种于经灭菌的培养基质上。生长的光暗周期为16 h光照/8 h黑暗, 培养温度为(22±1) °C, 光照强度为80  $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ , 相对湿度70%, 生长期间不受其它逆境因素胁迫。苗龄为35 d后, 取第3位成熟叶片为实验材料, 进行外源 $H_2O_2$ 和高温胁迫处理。

外源 $H_2O_2$ 处理时, 将叶片浸泡于100  $mmol \cdot L^{-1}$   $H_2O_2$ 溶液中, 在25 °C的恒温培养箱中黑暗放置1 h。高温处理时, 将叶片浸泡于纯水并置于45 °C的恒温水浴中, 暗下热胁迫1 h, 以正常生长的叶片为对照。

DAB-HCl购自Sigma公司, 其它试剂采用国产分析纯。

叶片中 $H_2O_2$ 活体组织化学原位检测根据Thordal-Christensen等(1997)及Ruuhola和Yang(2006)的方法进行改进。取处理后的叶片迅速浸入0.5  $mg \cdot mL^{-1}$ 的DAB (pH 7.0的磷酸缓冲液, 内含100  $\mu L$  Triton-X 100)溶液中, 快速真空抽气5 min, 避光放置8 h。随后吸去染色液, 洗去叶面残留的

收稿 2009-12-09 修定 2010-03-09

资助 肇庆学院植物学扶持学科项目。

致谢 中国科学院华南植物园林植芳先生给予指导。

\* 通讯作者(E-mail: shaoling@zqu.edu.cn; Tel: 0758-2716359)。

DAB, 加入 60% 乙醇于 80 °C 水浴中加热至叶片叶绿素完全脱去为止。脱色后的叶片用 5% 的甘油溶液浸泡保存(可置于室温或 4 °C 冰箱内), 制片后观察、拍照。叶片上红棕色 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 多聚合物的合成情况分别放在 XTX-2A 体视显微镜和 Zeiss AXIO ImagerA1 系统显微镜下检测和拍照。

## 2 实验结果

图 1-a、b、c 为 DAB 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应脱色后拍照的全叶图。与正常生长的对照叶片(图 1-a)染色情况相比, 浸泡 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的叶片染色程度最深(图 1-b), 高温处理的叶片着色次之(图 1-c)。图 1-a 和图 1-b 的正反对比表明, 高温可诱发叶片组织中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的积累。同时, 叶脉上积聚的 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 红棕色复合物较多, 叶脉纹理清晰。

图 1-d、e、f 为拟南芥叶片 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 染色后在体视显微镜下放大的局部图, 从图中可清晰区别主叶脉和各级分支叶脉的染色情况。高温(图 1-f)下网状叶脉和叶肉组织间 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 明显积聚, 这些组织被 DAB 染色的深度仅次于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理(图 1-e)。不经高温处理的叶组织间同样有较浅的着色(图 1-d), 表明在有氧代谢过程中正常生长的拟南芥同样能产生微量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

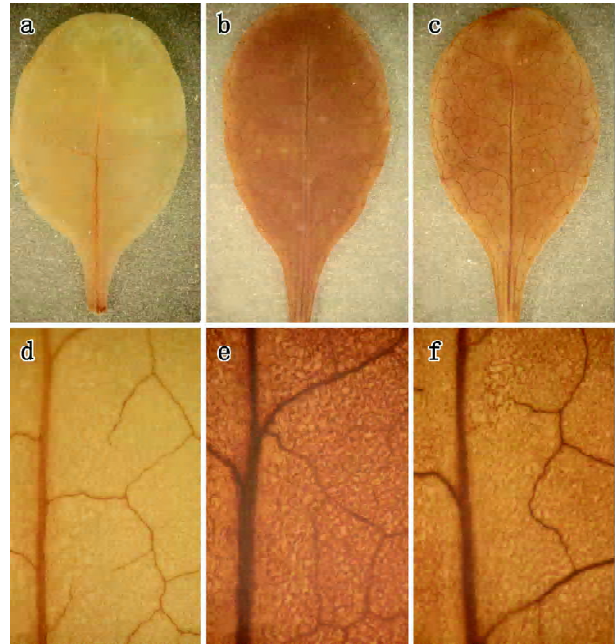


图 1 拟南芥叶片中 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的染色  
a 和 d: 对照; b 和 e: 外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理; c 和 f: 高温处理。

通过进一步提高检测手段, 我们将简易的装片放置到生物系统显微镜上, 在 10×、20× 和 100× 等

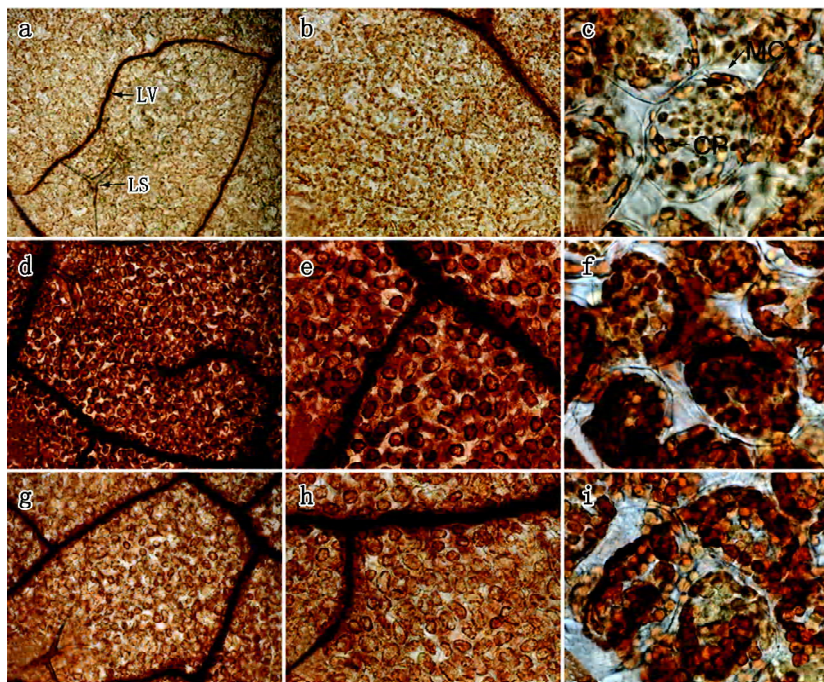


图 2 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 复合物在拟南芥叶片细胞中的定位

a~c: 对照; d~f: 外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理; g~i: 高温处理。a、d、g 放大倍数 10×10; b、e、h 放大倍数 20×10; c、f、i 放大倍数 100×10, 油镜观察。LV: 叶脉; LS: 叶刺; MC: 叶肉细胞; CP: 叶绿体。

放大倍数下, 拟南芥叶肉组织中细胞的排列轮廓及其染色情况可逐步呈现(图2)。红棕色复合物除了明显积聚于叶片的叶脉上以外, 在细胞结构上也有大量分布, 但在细胞间隙中基本上没有 $H_2O_2$ 的积累, 其底色为白色。在放大倍数为 $100\times$ 的显微视野下还可观察到, DAB- $H_2O_2$ 复合物主要沉积于叶肉细胞的细胞壁与叶绿体中。与不经高温处理的叶片细胞相比, 1 h 的高温或 $H_2O_2$ 胁迫后, 叶片细胞受到的伤害明显较大, 叶绿体肿胀, 排列紊乱, 靠近细胞壁的叶绿体染色程度明显加深, 叶绿体中的红棕色颗粒显著积累, 表明这一部位存在的 $H_2O_2$ 数量很高(图2-f、i)。而此时, 不经高温处理的叶片细胞其叶绿体染色较浅(图2-c), 叶绿体基本上呈椭圆形, 细胞内分布比较均匀。这表明高温胁迫可诱导拟南芥叶片细胞中 $H_2O_2$ 积累, 并大量分布于维管束组织和膜质细胞器(主要为叶绿体)中。

### 3 几点认识和体会

实验课除了验证课堂上的理论知识和掌握基本实验技能以外, 还应增设情景, 让学生在探究科学的过程中, 由浅入深, 乘阶而上。DAB组织化学染色法能够较快速且特异地检测植株或组织内 $H_2O_2$ 的积累部位和程度, 操作简便, 通过目测或显微镜观察产生的DAB- $H_2O_2$ 红褐色复合物便可了解 $H_2O_2$ 在组织或细胞中的聚集情况及其与胁迫因子的关系。这在学生专业研究背景尚浅的情况下, 可加深他们对逆境胁迫下植物体内活性氧发生的理解。在我们的实验中, 选用拟南芥为材料, 不仅因为它是植物界的模式植物, 易于培养, 更重要的是其叶面积较小, 叶片厚度较薄, 细胞离散性较好, 制作装片简易, 便于镜检。

虽然用DAB方法检测植物中 $H_2O_2$ 的报道较多, 但其观察的结果大多停留在组织水平上。如要观察细胞水平上 $H_2O_2$ 的积聚, 则需要做生物切片甚至是电镜切片(李艳辉等2008; 刘艳等2004)。从实验设备条件、实验技能掌握以及时间分配来说, 都不适合于课堂实验。因此, 在选准材料后, 我们对DAB的染色检测流程进行了一些探索和改良。Thordal-Christensen等(1997)及Ruuhola和Yang(2006)均用浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的DAB染色, MES缓冲液的pH为3.8或5.8, 脱色和样品保存用96%的乙醇。而在本文中, 改用pH 7.0的磷酸缓冲液, 这样, 反应可在接近生理条件下进行。而用较低浓度( $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )的DAB染色, 并用60%沸乙醇脱色, 则会降低试剂的用量, 节省成本, 同样可以获得良

好的效果。此外, 采用5%的甘油溶液保存叶片, 既可保证组织细胞结构的正常定位, 又可提高材料的柔软度和在光学显微镜检测中的通透性。本文中的实验结果表明, 改进的 $H_2O_2$ 组织化学检测的方法, 不仅能清楚显示出短期热胁迫后 $H_2O_2$ 在叶片中的积累(图1), 而且可以由表及里, 层层递进, 在操作较为简便的条件下, 就可以直观地观察到 $H_2O_2$ 在维管束和叶肉细胞, 甚至是叶绿体中实体积聚和分布的情况(图2)。为了证明高温胁迫诱导叶片 $H_2O_2$ 积累的可靠性, 在实验中我们还用外源 $H_2O_2$ 渗透的方法进行了验证。因此, 改良后的DAB组织化学方法可以适合于逆境胁迫下植物组织和细胞中 $H_2O_2$ 检测及定位的初步研究的课堂教学。

### 参考文献

- 李玲主编(2009). 植物生理学模块试验指导. 北京: 科学出版社, 84~86
- 李艳辉, 刘全军, 刘瑞侠, 陈绍宁, 胡秀丽(2008). 二甲基联苯胺检测植物叶片中 $H_2O_2$ 方法的改良. 西北植物学报, 28 (5): 1063~1068
- 刘艳, 黄卫东, 战吉成, 潘秋红(2004). 机械伤害和外源茉莉酸诱导豌豆幼苗 $H_2O_2$ 系统性产生. 中国科学(C辑), 34 (6): 501~509
- 吕波, 刘俊, 徐郎莱(2000). 小麦叶片中 $H_2O_2$ 的3种测定方法比较. 南京农业大学学报, 23 (2): 101~104
- 邵玲, 李芸瑛, 吴晓莉, 彭长连(2008). 高温胁迫下红色与绿色莴菜叶抗氧化能力的比较. 植物生理学通讯, 44 (5): 923~926
- 夏金婵, 苗雨晨, 宋纯鹏, 苗琛(2005). 紫外分光光度技术测定植物细胞中 $H_2O_2$ 的含量. 四川大学学报(自然科学版), 42 (6): 1263~1265
- 张小莉, 王鹏程, 宋纯鹏(2009). 植物细胞过氧化氢的测定方法. 植物学报, 44 (1): 103~106
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373~399
- Fryer MJ, Andrews JR, Oxborough K, Blowers DA, Baker NR (1998). Relationship between  $CO_2$  assimilation, photosynthetic electron transport, and active  $O_2$  metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiol*, 116: 571~580
- Hu X, Jiang M, Zhang A, Lu J (2005). Abscisic acid-induced apoplastic  $H_2O_2$  accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta*, 223 (1): 57~68
- Lin ZF, Peng CL, Xu XL, Lin GZ, Zhang JL (2005). Thermostability of photosynthesis in two new chlorophyll b-less rice mutants. *Sci China (Ser C)*, 48 (2): 139~147
- Patterson BD, MacRae EA, Ferguson IB (1984). Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Anal Biochem*, 139 (2): 487~492
- Ruuhola T, Yang SY (2006). Wound-induced oxidative responses in mountain birch leaves. *Ann Bot*, 97: 29~37
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997). Subcellular localization of  $H_2O_2$  in plants.  $H_2O_2$  accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J*, 11 (6): 1187~1194