



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106092944 B

(45)授权公告日 2018.12.07

(21)申请号 201610404255.3

(22)申请日 2016.06.12

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106092944 A

(43)申请公布日 2016.11.09

(73)专利权人 中国科学院地球化学研究所  
地址 550081 贵州省贵阳市观山湖区林城西路99号

(72)发明人 吴沿友 姚凯 饶森 张开艳  
陆叶 赵丽华 王瑞 杭红涛  
李海涛 刘丛强

(74)专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所  
52100  
代理人 吴无惧 刘艳

(51)Int.Cl.

G01N 21/33(2006.01)

(56)对比文件

CN 102792891 A,2012.11.28,  
CN 101926267 A,2010.12.29,  
WO 2011/084540 A1,2011.07.14,  
CN 105039500 A,2015.11.11,  
CN 102511362 A,2012.06.27,  
CN 102827916 A,2012.12.19,

审查员 王茜娟

权利要求书2页 说明书9页

(54)发明名称

一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法

(57)摘要

本发明公开了一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法。它包括以下步骤:选第二、第三和第四完全展开叶,无损测定其净光合速率,取上述三个叶片的平均值代表该株植物的净光合速率 $P_N$ ;随后,即刻取上述已测过净光合速率的叶片各一片,剪碎充分混合,取其中0.1g进行酶液的提取;分别测定提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的磷酸果糖激酶活力和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力,依据公式计算出糖代谢中的磷酸戊糖途径所占的份额,然后再与植物叶片的净光合速率相乘,则可获得植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力。本发明能快速定量不同环境下植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力,步骤少,计算简单,测定结果具有可比性以及可靠性。

1. 一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法,其特征在于:它包括以下步骤:第一,选第二、第三和第四完全展开叶,无损测定其净光合速率,取上述三个叶片的平均值代表该株植物的净光合速率 $P_N$ ;第二,随后,即刻取上述已测过净光合速率的叶片各一片,剪碎充分混合,进行酶液的提取;第三,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的磷酸果糖激酶活力 $EA_{pfk}$ ;第四,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ ;第五,将磷酸果糖激酶的酶活力 $EA_{pfk}$ 与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ 累加获得糖代谢关键酶的总活性 $EA_{\Sigma}$ ,计算公式为 $EA_{\Sigma} = EA_{pfk} + EA_{g6pdh}$ ;第六,依据葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ 和糖代谢关键酶的总活性 $EA_{\Sigma}$ ,计算出糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{PPP}$ ;计算公式为 $P_{PPP} = EA_{g6pdh} / EA_{\Sigma}$ ;第七,依据糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{PPP}$ 乘以植物的净光合速率 $P_N$ ,计算出植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力 $RC_{RuBP}$ ,计算公式为 $RC_{RuBP} = P_{PPP} \times P_N$ 。

2. 根据权利要求1所述的一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法,其特征在于:在第一步骤中,测定净光合速率的时间固定于下午的15:00-16:00,避开植物可能产生午休现象的时间;设置标准测定条件,测定光照强度为 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD,温度设置为 $25^{\circ}\text{C}$ , $\text{CO}_2$ 浓度设置为 $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ 。

3. 根据权利要求1所述的一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法,其特征在于:在第二步骤中,酶液的提取方法为:取叶片组织放置于冰浴研钵中,加入液氮进行冷冻研磨,待液氮挥发后,加入酶提取液;把研磨后的匀浆移入离心管中,离心,取上清液冷藏待测;其中酶提取液为HEPES Tris-HCl、 $\text{MgCl}_2$ 、EDTA、二硫苏糖醇和苯甲基磺酰氟。

4. 根据权利要求1所述的一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法,其特征在于:在第三步骤中,酶液中磷酸果糖激酶的酶活力 $EA_{pfk}$ 的测定方法为:磷酸果糖激酶的酶活力等于ATP-PFK酶活力加上PPi-PFK酶活力。

5. 根据权利要求1所述的一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法,其特征在于:在第四步骤中,酶液中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ 的测定方法为:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力等于G6PDH和6PGDH总酶活力减去6PGDH酶活力。

6. 根据权利要求1所述的一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法,其特征在于:在第六步骤中,糖代谢中的磷酸戊糖途径份额以百分比值来进行体现。

7. 根据权利要求4所述的一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法,其特征在于:ATP-PFK酶活力的测定方法如下,把酶提取液加入到ATP-PFK酶活分析液中,利用紫外分光光度计在340nm处测定反应混合液中的吸光度的变化 $D_1$ ;ATP-PFK酶活分析液pH 7.8,包括HEPES Tris-HCl、 $\text{MgCl}_2$ 、NADH、果糖-6-磷酸、醛缩酶、丙糖磷酸异构酶、3-磷酸甘油脱氢酶和ATP。

8. 根据权利要求4所述的一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法,其特征在于:PPi-PFK酶活力的测定方法如下:把酶提取液加入到PPi-PFK酶活分析液中,利用紫外分光光度计在340nm处测定反应混合液中5min的吸光度的变化 $D_2$ ;PPi-PFK酶活分析液pH 7.8,包括HEPES Tris-HCl、 $\text{MgCl}_2$ 、NADH、果糖-6-磷酸、醛缩酶、丙糖磷酸异构酶、3-磷酸甘油脱氢酶和PPi;酶液中磷酸果糖激酶的酶活力 $EA_{pfk}$ 可表示为 $D_1 + D_2$ 。

9. 根据权利要求5所述的一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法,其特征在于:测定G6PDH和6PGDH的总活力的方法为:把酶提取液加入到G6PDH和6PGDH总酶活分

析液中,利用紫外分光光度计在340nm处测定反应混合液中5min的吸光度的变化 $D_T$ ;G6PDH和6PGDH总酶活分析液pH 7.8,包括HEPES Tris-HCl、MgCl<sub>2</sub>、6-磷酸葡萄糖酸脂二钠盐、6-磷酸葡萄糖酸脂和NADPNa<sub>2</sub>;6PGDH的酶活力的测定方法:把酶提取液加入到6PGDH酶活分析液中,利用紫外分光光度计在340nm处测定反应混合液中5min的吸光度的变化 $D_P$ ;6PGDH酶活分析液pH 7.8,包括HEPES Tris-HCl、MgCl<sub>2</sub>、6-磷酸葡萄糖酸脂和NADPNa<sub>2</sub>;酶液中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ 可表示为 $D_T-D_P$ 。

## 一种定量测定植物1, 5-二磷酸核酮糖再生能力的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法,属于生物生理生化领域。

### 背景技术

[0002] 生物在受到胁迫的情况下,往往因为气孔关闭而使光合作用受到影响,其中重要的原因是因为卡尔文循环对1,5-二磷酸核酮糖(RuBP)的再生能力下降所致。这时,磷酸戊糖途径能通过生成核糖-5-磷酸进入到卡尔文循环,通过磷酸化生成RuBP,从而对卡尔文循环进行物质补充,使植物在胁迫条件下光合作用的进行得到一定程度的补充。

[0003] 在研究植物光合作用时,光合速率是用于表示光合作用强弱的一种表示法,又称“光合强度”。光合速率的大小可用单位时间、单位叶面积所吸收的二氧化碳或释放的氧气表示,亦可用单位时间、单位叶面积所积累的干物质量表示。而净光合速率( $P_N$ )是指光合作用产生的糖类减去呼吸作用消耗的糖类(即净光合作用产生的糖类)的速率,总光合速率是指光合作用产生糖类的速率,净光合作用=总光合作用-呼吸作用消耗,能够直接体现植物的光合效果。磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway),葡萄糖氧化分解的一种方式。由于此途径是由6-磷酸葡萄糖(G-6-P)开始,故亦称为己糖磷酸旁路。磷酸戊糖途径可分成氧化阶段和还原阶段两个部分,氧化阶段产生的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸或还原型辅酶II(NADPH)和还原阶段产生的核糖-5-磷酸在植物对抗胁迫环境时都具有极其重要的作用,核糖-5-磷酸能通过进入卡尔文循环对RuBP形成补充从而使植物在胁迫条件下光合作用能够得以维持。

[0004] 以往常常研究磷酸戊糖途径时,很少注意到其在胁迫条件下对植物光合作用维持的重要作用,更没有方法用于定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法,以克服现有技术难以定量反映光合作用的维持能力的弱点。

[0006] 本发明采取以下技术方案:一种定量测定植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法,它包括以下步骤:第一,选第二、第三和第四完全展开叶,无损测定其净光合速率,取上述三个叶片的平均值代表该株植物的净光合速率 $P_N$ ;第二,随后,即刻取上述已测过净光合速率的叶片各一片,剪碎充分混合,取其中0.1g进行酶液的提取;第三,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的磷酸果糖激酶活力 $EA_{pfk}$ ;第四,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ ;第五,将磷酸果糖激酶的酶活力 $EA_{pfk}$ 与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ 累加获得糖代谢关键酶的总活性 $EA_{\Sigma}$ ,计算公式为 $EA_{\Sigma}=EA_{pfk}+EA_{g6pdh}$ ;第六,依据葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ 和糖代谢关键酶的总活性 $EA_{\Sigma}$ ,计算出糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{PPP}$ ;计算公式为 $P_{PPP}=EA_{g6pdh}/EA_{\Sigma}$ ;第七,依据糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{PPP}$ 乘以植物的

净光合速率 $P_N$ ,计算出植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力 $RC_{RuBP}$ ,计算公式为 $RC_{RuBP} = P_{PPP} \times P_N$ 。

[0007] 在第一步骤中,测定净光合速率的时间固定于下午的15:00-16:00,避开植物可能产生午休现象的时间;设置标准测定条件,测定光照强度为 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD,温度设置为 $25^\circ\text{C}$ , $\text{CO}_2$ 浓度设置为 $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ 。

[0008] 在第二步骤中,酶液的提取方法为:取叶片组织放置于冰浴研钵中,加入液氮进行冷冻研磨,待液氮挥发后,加入酶提取液;把研磨后的匀浆移入离心管中,离心,取上清液冷藏待测;其中酶提取液为HEPES Tris-HCl, $\text{MgCl}_2$ ,EDTA,二硫苏糖醇和苯甲基磺酰氟。

[0009] 在第三步骤中,酶液中磷酸果糖激酶的酶活力 $EA_{\text{pfk}}$ 的测定方法为:磷酸果糖激酶的酶活力等于ATP-PFK酶活力加上PPi-PFK酶活力。

[0010] 在第四步骤中,酶液中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{\text{g6pdh}}$ 的测定方法为:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力等于G6PDH和6PGDH总酶活力减去6PGDH酶活力。

[0011] 在第六步骤中,糖代谢中的磷酸戊糖途径份额以百分比值来进行体现。

[0012] 所述的HEPES为4-羟乙基哌嗪乙磺酸,Tris-HCl为盐酸三羟甲基氨基甲烷,EDTA为乙二胺四乙酸。

[0013] ATP-PFK酶活力的测定方法如下,把酶提取液加入到ATP-PFK酶活分析液中,利用紫外分光光度计在340nm处测定反应混合液中的吸光度的变化 $D_1$ ;ATP-PFK酶活分析液pH 7.8,包括HEPES Tris-HCl, $\text{MgCl}_2$ 、NADH、果糖-6-磷酸、醛缩酶、丙糖磷酸异构酶、3-磷酸甘油脱氢酶和ATP,所述的PFK为磷酸果糖激酶,ATP为三磷酸腺苷,NADH为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸或还原型辅酶I。

[0014] PPi-PFK酶活力的测定方法如下:把酶提取液加入到PPi-PFK酶活分析液中,利用紫外分光光度计在340nm处测定反应混合液中5min的吸光度的变化 $D_2$ ;PPi-PFK酶活分析液pH 7.8,包括HEPES Tris-HCl, $\text{MgCl}_2$ 、NADH、果糖-6-磷酸、醛缩酶、丙糖磷酸异构酶、3-磷酸甘油脱氢酶和PPi;酶液中磷酸果糖激酶的酶活力 $EA_{\text{pfk}}$ 可表示为 $D_1 + D_2$ ;所述的PFK为磷酸果糖激酶,PPi为焦磷酸,NADH为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸或还原型辅酶I。

[0015] 测定G6PDH和6PGDH的总活力的方法为:把酶提取液加入到G6PDH和6PGDH总酶活分析液中,利用紫外分光光度计在340nm处测定反应混合液中5min的吸光度的变化 $D_T$ ;G6PDH和6PGDH总酶活分析液pH 7.8,包括HEPES Tris-HCl, $\text{MgCl}_2$ 、6-磷酸葡萄糖酸脂二钠盐、6-磷酸葡萄糖酸脂和 $\text{NADPNa}_2$ ;6PGDH的酶活力的测定方法:把酶提取液加入到6PGDH酶活分析液中,利用紫外分光光度计在340nm处测定反应混合液中5min的吸光度的变化 $D_P$ ;6PGDH酶活分析液pH 7.8,包括HEPES Tris-HCl, $\text{MgCl}_2$ 、6-磷酸葡萄糖酸脂和 $\text{NADPNa}_2$ ;酶液中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{\text{g6pdh}}$ 可表示为 $D_T - D_P$ ;所述的G6PDH为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,6PGDH为6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶, $\text{NADPNa}_2$ 为氧化型型辅酶II二钠盐。

[0016] 本发明的优点如下:

[0017] 1)能快速定量不同环境下植物对卡尔文循环中1,5-二磷酸核酮糖的再生能力,测定结果具有可比性。

[0018] 2)由于还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸或还原型辅酶II (NADPH) 和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸或还原型辅酶I (NADH) 在340nm的毫摩尔消光系数均为 $6.22 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ,测出的磷酸果糖激酶的酶活力和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶力量纲相同,一个单位的葡萄糖通过糖酵解途径消耗2个单位的NADH,而通过磷酸戊糖途径恰好生成2个单位的NADPH,因

此,用磷酸果糖激酶的酶活力和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力代表两个途径无需归一化,计算出的糖代谢中的糖酵解途径份额以及糖代谢中的磷酸戊糖途径份额稳定可靠。

[0019] 3) 本方法无需测定酶液中的蛋白质浓度,步骤少,计算简单。

[0020] 4) 刚已完全展开的植物叶片,为同时需要核糖-5-磷酸和NADPH时期,它的磷酸戊糖途径主要用于1,5-二磷酸核酮糖的再生,一个单位的葡萄糖通过磷酸戊糖途径可生成2个单位的NADPH和一个单位核糖-5-磷酸,一个单位核糖-5-磷酸继而可再生成一个单位的1,5-二磷酸核酮糖,因此计算出的植物1,5-二磷酸核酮糖的再生能力具有理论依据和可信性。

[0021] 5) 本方法克服了现有技术难以定量反映胁迫条件下光合作用的维持能力的弱点。

[0022] 本发明的基本原理为:

[0023] 光合速率是用于表示光合作用强弱的一种表示法,又称“光合强度”。光合速率的大小可用单位时间、单位叶面积所吸收的二氧化碳或释放的氧气表示,亦可用单位时间、单位叶面积所生成的糖类表示。总光合速率是指光合作用产生糖类的速率,而净光合速率( $P_N$ )是指光合作用产生的糖类减去呼吸作用消耗的糖类(即植物累积的糖类)的速率,净光合作用=总光合作用-呼吸作用消耗,能够直接体现植物的累积糖类效果。

[0024] 叶片中累积的糖类主要有两个去向,一个去向是通过磷酸果糖激酶催化不可逆的进入糖酵解途径,另一个是通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化不可逆的进入磷酸戊糖途径。糖酵解途径(glycolytic pathway)又称EMP途径,是将葡萄糖和糖原降解为丙酮酸并伴随着ATP生成的一系列反应,是一切生物有机体中普遍存在的葡萄糖降解的途径。在需氧生物中,酵解途径是葡萄糖氧化成二氧化碳和水的前奏。酵解生成的丙酮酸可进入线粒体,通过三羧酸循环及电子传递链彻底氧化成二氧化碳和水,并生成ATP。可以用下式表示:

[0025] 葡萄糖-6-磷酸+2NADH $\rightarrow$ 2甘油酸-3-磷酸+2NAD<sup>+</sup> (1)

[0026] 磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway)葡萄糖氧化分解的一种方式。由于此途径是由6-磷酸葡萄糖(G-6-P)开始,故亦称为己糖磷酸旁路。磷酸戊糖途径可分成氧化阶段和还原阶段两个部分,氧化阶段产生的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸或还原型辅酶II(NADPH)和还原阶段产生的核糖-5-磷酸在植物对抗胁迫环境时都具有极其重要的作用,核糖-5-磷酸能通过进入卡尔文循环对RuBP形成补充从而使植物在胁迫条件下光合作用能够得以维持。在磷酸戊糖途径中葡萄糖-6-磷酸的去向有三个:

[0027] 去向1,当机体迫切需要核糖-5-磷酸时:

[0028] 5葡萄糖-6-磷酸+ATP $\rightarrow$ 6核糖-5-磷酸+ADP+H<sup>+</sup> (2)

[0029] 去向2.当机体迫切需要NADPH时:

[0030] 葡萄糖-6-磷酸+7H<sub>2</sub>O+12NADP $\rightarrow$ 12NADPH+12H<sup>+</sup>+12CO<sub>2</sub>+P<sub>i</sub> (3)

[0031] 去向3.当机体同时需要核糖-5-磷酸和NADPH时:

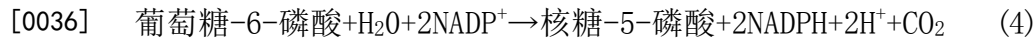
[0032] 葡萄糖-6-磷酸+H<sub>2</sub>O+2NADP<sup>+</sup> $\rightarrow$ 核糖-5-磷酸+2NADPH+2H<sup>+</sup>+CO<sub>2</sub> (4)

[0033] 在进行光合作用时的第二、第三和第四完全展开叶中,叶片同时需要核糖-5-磷酸和NADPH时,其中的磷酸戊糖途径中葡萄糖-6-磷酸的去向为去向3:

[0034] 葡萄糖-6-磷酸+H<sub>2</sub>O+2NADP<sup>+</sup> $\rightarrow$ 核糖-5-磷酸+2NADPH+2H<sup>+</sup>+CO<sub>2</sub> (4)

[0035] 此外,核糖-5-磷酸也是合成核酸的重要底物,但是由于细胞内核酸的量和可溶性糖的量相差巨大(相差两个数量级),故在光合作用有关的计算中,除细胞处于分裂旺盛期

时,可以忽略核糖-5-磷酸转化为核糖所消耗的量。所以在进行光合作用时的第二、第三和第四完全展开叶,可以用下式表示磷酸戊糖途径对1,5-二磷酸核酮糖的再生作用:



[0037] 对限速酶活力的研究是研究葡萄糖代谢途径的基本手段。限速酶的酶活力能够代表该途径进行葡萄糖代谢的活跃程度。磷酸果糖激酶 (PFK) 是此糖酵解途径的限速酶,而葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH) 是磷酸戊糖途径的限速酶,而磷酸果糖激酶 (PFK) 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH) 酶活力的比值可以代表葡萄糖代谢在糖酵解途径和磷酸戊糖途径之间的分配情况。

[0038] 当生物体内的葡萄糖通过糖酵解途径进行代谢生成甘油时,会消耗生物体内的还原性辅酶I (NADH),而还原性辅酶I (NADH) 的消耗能够通过吸光度的变化来进行测量,即可以通过测定一定波长下吸光度的变化来测量糖酵解途径关键酶PFK的酶活力。而在生物体内的葡萄糖通过磷酸戊糖途径进行代谢时,会在生物体内生成还原性辅酶II (NADPH),同样NADPH的增加也能够通过吸光度的变化来进行测量,即也可以通过测定一定波长下吸光度的变化来测量磷酸戊糖途径关键酶G6PDH的酶活力。

[0039] 生物体酶液的提取。取0.1g的生物组织放置于冰浴研钵中,加入液氮进行冷冻研磨,待液氮挥发后,加入1mL酶提取液,其中含有50mM HEPES Tris-HCl (pH 7.8),3mM MgCl<sub>2</sub>,1mM EDTA,1mM二硫苏糖醇和1mM苯甲基磺酰氟。把研磨后的匀浆移入离心管中,在4℃下,12000g离心20min,取上清液冷藏待测。

[0040] PFK的总活力等于ATP-PFK酶活力加上PPi-PFK酶活力。ATP-PFK酶活力的测定方法如下,把200μL酶提取液加入到1.8mLATP-PFK酶活分析液中以测定ATP-PFK的酶活,ATP-PFK酶活分析液包括50mM HEPES Tris-HCl (pH 7.8),2.5mM MgCl<sub>2</sub>,0.1mM NADH,5mM果糖-6-磷酸,2unit mL的醛缩酶,1unit mL丙糖磷酸异构酶,2unit mL 3-磷酸甘油脱氢酶和1mM ATP;PPi-PFK酶活力的测定方法如下,把200μL酶提取液加入到1.8mL PPi-PFK酶活分析液中以测定PPi-PFK的酶活,PPi-PFK酶活分析液包括50mM HEPES Tris-HCl (pH 7.8),2.5mM MgCl<sub>2</sub>,0.1mM NADH,5mM果糖-6-磷酸,2unit mL的醛缩酶,1unit mL丙糖磷酸异构酶,2unit mL 3-磷酸甘油脱氢酶和1mM PPi。利用紫外分光光度计在340nm处测定反应混合液的光吸收,以测量反应混合液中NADH氧化为NAD<sup>+</sup>的速率的变化情况。

[0041] G6PDH酶活的值等于G6PDH和6PGDH总酶活值减去6PGDH酶活值。首先测定G6PDH和6PGDH (6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶) 的总活力,把200μL酶提取液加入到1.8mL G6PDH和6PGDH总酶活分析液中以测定G6PDH和6PGDH的总酶活。G6PDH和6PGDH总酶活分析液包括50mM HEPES Tris-HCl (pH 7.8),3.3mM MgCl<sub>2</sub>,0.5mM 6-磷酸葡萄糖酸脂二钠盐,0.5mM 6-磷酸葡萄糖酸脂和0.5mM NADPNa<sub>2</sub>。把200μL酶提取液加入到1.8mL 6PGDH酶活分析液中以测定6PGDH的酶活。6PGDH酶活分析液中包括50mM HEPES Tris-HCl (pH 7.8),3.3mM MgCl<sub>2</sub>,0.5mM 6-磷酸葡萄糖酸脂和0.5mM NADPNa<sub>2</sub>。利用紫外分光光度计在340nm处测定反应混合液的光吸收,以测量反应混合液中NADP<sup>+</sup>还原为NADPH的速率的变化情况。

[0042] 酶活力的计算公式见式(5),其单位为nmol min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>Pr。

$$[0043] \quad \rho = \frac{\left( \frac{\Delta A}{\Delta t} \right) \times \frac{1}{\varepsilon_{\mu\text{M}}} \times 1000 \mu\text{L}}{C_{\text{Pr}} \times V_E \mu\text{L}} \quad (5)$$

[0044]  $\Delta A$ 为在测定时间  $\Delta t$  (min) 内反应系统在测定波长的吸光值的变化;

[0045]  $V_E$ 为测定的酶液加入的体积 ( $\mu\text{L}$ );

[0046]  $\epsilon_{\mu\text{M}}$ 为所用的底物的微摩尔消光系数,可由底物的标准曲线求出。

[0047]  $C_{Pr}$ 为酶液的蛋白浓度 ( $\text{g L}^{-1}$ 或 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )。

[0048] NADPH和NADH在340nm的毫摩尔消光系数均为 $6.22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,其微摩尔消光系数即 $0.00622\mu\text{M}^{-1}\text{m}^{-1}$ ,其意义即在1cm的光路中 $1.0\mu\text{mol L}^{-1}$ 浓度的NADPH或NADH其在340nm的吸光值为0.00622。

[0049] 由以上的方法和式(5),可以计算出PFK酶活力为 $EA_{\text{pfk}}$ ,G6PDH酶活力为 $EA_{\text{g6pdh}}$ ,同时假设生物体内参与葡萄糖代谢的代谢途径的关键酶的总活性为 $EA_{\Sigma}$ ,除糖酵解途径和磷酸戊糖途径之外参加葡萄糖代谢的各途径的限速酶活力为 $EA_{\text{else}}$ ,且各途径的限速酶的活力代表了该途径进行葡萄糖代谢的活跃程度。则磷酸戊糖途径在葡萄糖代谢中的占比 $P_{\text{PPP}}$ 可表示为:

$$[0050] \quad P_{\text{PPP}} = EA_{\text{g6pdh}} / (EA_{\text{pfk}} + EA_{\text{g6pdh}} + EA_{\text{else}}) \times 100\% \quad (6)$$

[0051] 在式(6)中,因为 $EA_{\text{else}}$ 的占比很小,且我们只研究PFK和G6PDH的酶活力关系,在此我们对其忽略。所以,磷酸戊糖途径在葡萄糖代谢中的占比 $P_{\text{PPP}}$ 可表示为:

$$[0052] \quad P_{\text{PPP}} = EA_{\text{g6pdh}} / (EA_{\text{pfk}} + EA_{\text{g6pdh}}) \times 100\% \quad (7)$$

[0053] 由于测定时间  $\Delta t$ 、酶液加入的体积、所用的底物的微摩尔消光系数 $\epsilon_{\mu\text{M}}$ 以及酶液的蛋白浓度相同,所以无论是磷酸果糖激酶的酶活力 $EA_{\text{pfk}}$ 还是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力都可以以单位体积单位时间吸光度变化值表示其活力,它们的比值更是如此。

[0054] 由于第二、第三和第四完全展开叶中净光合速率( $P_N$ )所积累的糖类物质有两个去向,一个为糖酵解途径如式(1),另一个为磷酸戊糖途径中的去向3如式(4),而糖酵解途径为一个单位的葡萄糖通过糖酵解途径消耗2个单位的NADH,而通过磷酸戊糖途径中的去向3恰好生成2个单位的NADPH,因此可以通过计算糖类歧化到磷酸戊糖途径,获取植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力。也就是依据糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{\text{PPP}}$ 乘以植物叶片的净光合速率 $P_N$ ,计算出植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力 $RC_{\text{RuBP}}$ ,计算公式为 $RC_{\text{RuBP}} = P_{\text{PPP}} \times P_N$ 。

## 具体实施方式

[0055] 本发明的实例:它包括以下步骤:

[0056] 第一,选取待测植株,选第二、第三和第四完全展开叶,无损测定其净光合速率,取三个叶片的平均值代表该株植物的净光合速率 $P_N$ ;

[0057] 第二,随后,即刻取上述已测过净光合速率的叶片各一片,剪碎充分混合,取其中0.1g进行酶液的提取;

[0058] 第三,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的磷酸果糖激酶活力 $EA_{\text{pfk}}$ ;

[0059] 第四,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{\text{g6pdh}}$ ;

[0060] 第五,将磷酸果糖激酶的酶活力 $EA_{\text{pfk}}$ 与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{\text{g6pdh}}$ 累加获得糖代谢关键酶的总活性 $EA_{\Sigma}$ ,计算公式为 $EA_{\Sigma} = EA_{\text{pfk}} + EA_{\text{g6pdh}}$ ;

[0061] 第六,依据葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{\text{g6pdh}}$ 和糖代谢关键酶的总活性 $EA_{\Sigma}$ ,计



算出糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{PPP}$ ;计算公式为 $P_{PPP} = EA_{g6pdh} / EA_{\Sigma}$ ;

[0062] 第七,依据糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{PPP}$ 乘以植物的净光合速率 $P_N$ ,计算出植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力 $RC_{RuBP}$ ,计算公式为 $RC_{RuBP} = P_{PPP} \times P_N$ 。

#### [0063] 实施例1

[0064] 第一,选取对照环境中的构树植株,取第二、第三和第四完全展开叶各一片;使用进口LI-6400XT便携式光合测量系统(LI-COR, Lincoln, NE, USA)测定植株叶片的净光合速率,取三个叶片的平均值代表该株植物的净光合速率 $P_N$ ;测定时间固定在下午的15:00-16:00;设置标准测定条件,测定光照强度为 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD,温度设置为 $25^\circ\text{C}$ , $\text{CO}_2$ 浓度设置为 $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ;

[0065] 第二,随后,即刻取上述已测过净光合速率的叶片各一片,剪碎充分混合,取其中0.1g进行酶液的提取;

[0066] 第三,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的磷酸果糖激酶活力 $EA_{pfk}$ ;

[0067] 第四,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ ;

[0068] 第五,将磷酸果糖激酶的酶活力 $EA_{pfk}$ 与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ 累加获得糖代谢关键酶的总活性 $EA_{\Sigma}$ ,计算公式为 $EA_{\Sigma} = EA_{pfk} + EA_{g6pdh}$ ;

[0069] 第六,依据葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ 和糖代谢关键酶的总活性 $EA_{\Sigma}$ ,计算出糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{PPP}$ ;计算公式为 $P_{PPP} = EA_{g6pdh} / EA_{\Sigma}$ ;

[0070] 第七,依据糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{PPP}$ 乘以植物的净光合速率 $P_N$ ,计算出植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力 $RC_{RuBP}$ ,计算公式为 $RC_{RuBP} = P_{PPP} \times P_N$ 。

#### [0071] 实施例2

[0072] 第一,选取胁迫环境1中的构树植株,取第二、第三和第四完全展开叶各一片;使用进口LI-6400XT便携式光合测量系统(LI-COR, Lincoln, NE, USA)测定植株叶片的净光合速率,取三个叶片的平均值代表该株植物的净光合速率 $P_N$ ;测定时间固定在下午的15:00-16:00;设置标准测定条件,测定光照强度为 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD,温度设置为 $25^\circ\text{C}$ , $\text{CO}_2$ 浓度设置为 $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ;

[0073] 第二,随后,即刻取上述已测过净光合速率的叶片各一片,剪碎充分混合,取其中0.1g进行酶液的提取;

[0074] 第三,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的磷酸果糖激酶活力 $EA_{pfk}$ ;

[0075] 第四,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ ;

[0076] 第五,将磷酸果糖激酶的酶活力 $EA_{pfk}$ 与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ 累加获得糖代谢关键酶的总活性 $EA_{\Sigma}$ ,计算公式为 $EA_{\Sigma} = EA_{pfk} + EA_{g6pdh}$ ;

[0077] 第六,依据葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{g6pdh}$ 和糖代谢关键酶的总活性 $EA_{\Sigma}$ ,计算出糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{PPP}$ ;计算公式为 $P_{PPP} = EA_{g6pdh} / EA_{\Sigma}$ ;

[0078] 第七,依据糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{PPP}$ 乘以植物的净光合速率 $P_N$ ,计算出植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力 $RC_{RuBP}$ ,计算公式为 $RC_{RuBP} = P_{PPP} \times P_N$ 。

[0079] 实施例3

[0080] 第一,选取胁迫环境2中的构树植株,取第二、第三和第四完全展开叶各一片;使用进口LI-6400XT便携式光合测量系统(LI-COR,Lincoln,NE,USA)测定植株叶片的净光合速率,取三个叶片的平均值代表该株植物的净光合速率 $P_N$ ;测定时间固定在下午的15:00-16:00;设置标准测定条件,测定光照强度为 $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD,温度设置为 $25^\circ\text{C}$ , $\text{CO}_2$ 浓度设置为 $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ;

[0081] 第二,随后,即刻取上述已测过净光合速率的叶片各一片,剪碎充分混合,取其中0.1g进行酶液的提取;

[0082] 第三,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的磷酸果糖激酶活力 $EA_{\text{pfk}}$ ;

[0083] 第四,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{\text{g6pdh}}$ ;

[0084] 第五,将磷酸果糖激酶的酶活力 $EA_{\text{pfk}}$ 与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{\text{g6pdh}}$ 累加获得糖代谢关键酶的总活性 $EA_\Sigma$ ,计算公式为 $EA_\Sigma = EA_{\text{pfk}} + EA_{\text{g6pdh}}$ ;

[0085] 第六,依据葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{\text{g6pdh}}$ 和糖代谢关键酶的总活性 $EA_\Sigma$ ,计算出糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{\text{PPP}}$ ;计算公式为 $P_{\text{PPP}} = EA_{\text{g6pdh}} / EA_\Sigma$ ;

[0086] 第七,依据糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{\text{PPP}}$ 乘以植物的净光合速率 $P_N$ ,计算出植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力 $RC_{\text{RuBP}}$ ,计算公式为 $RC_{\text{RuBP}} = P_{\text{PPP}} \times P_N$ 。

[0087] 实施例4

[0088] 第一,选取对照环境中的桑树植株,取第二、第三和第四完全展开叶各一片;使用进口LI-6400XT便携式光合测量系统(LI-COR,Lincoln,NE,USA)测定植株叶片的净光合速率,取三个叶片的平均值代表该株植物的净光合速率 $P_N$ ;测定时间固定在下午的15:00-16:00;设置标准测定条件,测定光照强度为 $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD,温度设置为 $25^\circ\text{C}$ , $\text{CO}_2$ 浓度设置为 $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ;

[0089] 第二,随后,即刻取上述已测过净光合速率的叶片各一片,剪碎充分混合,取其中0.1g进行酶液的提取;

[0090] 第三,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的磷酸果糖激酶活力 $EA_{\text{pfk}}$ ;

[0091] 第四,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{\text{g6pdh}}$ ;

[0092] 第五,将磷酸果糖激酶的酶活力 $EA_{\text{pfk}}$ 与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{\text{g6pdh}}$ 累加获得糖代谢关键酶的总活性 $EA_\Sigma$ ,计算公式为 $EA_\Sigma = EA_{\text{pfk}} + EA_{\text{g6pdh}}$ ;

[0093] 第六,依据葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $EA_{\text{g6pdh}}$ 和糖代谢关键酶的总活性 $EA_\Sigma$ ,计算出糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{\text{PPP}}$ ;计算公式为 $P_{\text{PPP}} = EA_{\text{g6pdh}} / EA_\Sigma$ ;

[0094] 第七,依据糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{\text{PPP}}$ 乘以植物的净光合速率 $P_N$ ,计算出植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力 $RC_{\text{RuBP}}$ ,计算公式为 $RC_{\text{RuBP}} = P_{\text{PPP}} \times P_N$ 。

[0095] 实施例5

[0096] 第一,选取胁迫环境1中的桑树植株,取第二、第三和第四完全展开叶各一片;使用进口LI-6400XT便携式光合测量系统(LI-COR,Lincoln,NE,USA)测定植株叶片的净光合速

率,取三个叶片的平均值代表该株植物的净光合速率 $P_N$ ;测定时间固定在下午的15:00-16:00;设置标准测定条件,测定光照强度为 $300\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD,温度设置为 $25^\circ\text{C}$ , $\text{CO}_2$ 浓度设置为 $400\mu\text{mol mol}^{-1}$ ;

[0097] 第二,随后,即刻取上述已测过净光合速率的叶片各一片,剪碎充分混合,取其中0.1g进行酶液的提取;

[0098] 第三,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的磷酸果糖激酶活力 $\text{EA}_{\text{pfk}}$ ;

[0099] 第四,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $\text{EA}_{\text{g6pdh}}$ ;

[0100] 第五,将磷酸果糖激酶的酶活力 $\text{EA}_{\text{pfk}}$ 与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $\text{EA}_{\text{g6pdh}}$ 累加获得糖代谢关键酶的总活性 $\text{EA}_\Sigma$ ,计算公式为 $\text{EA}_\Sigma = \text{EA}_{\text{pfk}} + \text{EA}_{\text{g6pdh}}$ ;

[0101] 第六,依据葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $\text{EA}_{\text{g6pdh}}$ 和糖代谢关键酶的总活性 $\text{EA}_\Sigma$ ,计算出糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{\text{PPP}}$ ;计算公式为 $P_{\text{PPP}} = \text{EA}_{\text{g6pdh}} / \text{EA}_\Sigma$ ;

[0102] 第七,依据糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{\text{PPP}}$ 乘以植物的净光合速率 $P_N$ ,计算出植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力 $\text{RC}_{\text{RuBP}}$ ,计算公式为 $\text{RC}_{\text{RuBP}} = P_{\text{PPP}} \times P_N$ 。

[0103] 实施例6

[0104] 第一,选取胁迫环境2中的桑树植株,取第二、第三和第四完全展开叶各一片;使用进口LI-6400XT便携式光合测量系统(LI-COR, Lincoln, NE, USA)测定植株叶片的净光合速率,取三个叶片的平均值代表该株植物的净光合速率 $P_N$ ;测定时间固定在下午的15:00-16:00;设置标准测定条件,测定光照强度为 $300\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD,温度设置为 $25^\circ\text{C}$ , $\text{CO}_2$ 浓度设置为 $400\mu\text{mol mol}^{-1}$ ;

[0105] 第二,随后,即刻取上述已测过净光合速率的叶片各一片,剪碎充分混合,取其中0.1g进行酶液的提取;

[0106] 第三,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的磷酸果糖激酶活力 $\text{EA}_{\text{pfk}}$ ;

[0107] 第四,测定上述提取的酶液中以单位体积单位时间吸光度变化值表示的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $\text{EA}_{\text{g6pdh}}$ ;

[0108] 第五,将磷酸果糖激酶的酶活力 $\text{EA}_{\text{pfk}}$ 与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $\text{EA}_{\text{g6pdh}}$ 累加获得糖代谢关键酶的总活性 $\text{EA}_\Sigma$ ,计算公式为 $\text{EA}_\Sigma = \text{EA}_{\text{pfk}} + \text{EA}_{\text{g6pdh}}$ ;

[0109] 第六,依据葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活力 $\text{EA}_{\text{g6pdh}}$ 和糖代谢关键酶的总活性 $\text{EA}_\Sigma$ ,计算出糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{\text{PPP}}$ ;计算公式为 $P_{\text{PPP}} = \text{EA}_{\text{g6pdh}} / \text{EA}_\Sigma$ ;

[0110] 第七,依据糖代谢中的磷酸戊糖途径份额 $P_{\text{PPP}}$ 乘以植物的净光合速率 $P_N$ ,计算出植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力 $\text{RC}_{\text{RuBP}}$ ,计算公式为 $\text{RC}_{\text{RuBP}} = P_{\text{PPP}} \times P_N$ 。

[0111] 本发明的实施效果如下:

[0112] 分别将构树和桑树分成三个处理组培养,三个处理组分别是对照组(1/2Hoagland营养液)、胁迫组1(1/2Hoagland营养液+ $80\text{g L}^{-1}$ PEG6000)和胁迫组2(1/2Hoagland营养液+ $30\text{mM NaHCO}_3$ )。培养6天后分别取叶片测定植株叶片中磷酸果糖激酶(PFK)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)的活性,并通过LI-6400XT便携式光合测量系统(LI-COR, Lincoln, NE, USA)测定植株叶片的净光合速率 $P_N$ ,然后计算出植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力 $\text{RC}_{\text{RuBP}}$ ,其

结果如下表所示(表1)。

[0113] 从表1中可看出,虽然在对照环境下桑树的1,5-二磷酸核酮糖再生能力大于构树的,但是,在两种胁迫环境下,构树的1,5-二磷酸核酮糖再生能力都大于桑树的,表明构树适应于相关逆境,与其在该逆境下1,5-二磷酸核酮糖再生能力强有关;这与构树比桑树更适应喀斯特环境的事实是相吻合的;由此可以看出,利用本发明获取的植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力的方法简单可靠,能够很好的说明在不同环境条件下植物体内磷酸戊糖途径对维持植物光合能力的贡献情况。

[0114] 表1 桑树和构树在不同处理条件下植物1,5-二磷酸核酮糖再生能力

实施例	物种	待测环境	$P_N$	$P_{PPP}$	$RC_{RuBP}$
[0115]	构树	对照	7.18	25 %	1.80
2		胁迫 1	4.72	70 %	3.30
3		胁迫 2	7.02	68 %	4.77
[0116]	桑树	对照	7.91	25 %	1.98
5		胁迫 1	3.26	77 %	2.51
6		胁迫 2	3.37	63 %	2.12