

实验条件优化中培育学生科研逻辑

辛秀娟 罗远婵 王启要 周勉* 安法梁*

华东理工大学生物工程学院

DOI:10.12238/mef.v8i11.14843

[摘要] 希尔反应实验,是学生理解光合作用发生在叶绿体、需要受氢体的两个连续抽象过程的可视化及量化的内容。但在超60人的集体实验中,吸光值呈线性变化的成功率极低。为探究其稳定重现的条件,依实验条件对学生进行分组,系统性分析主要影响因素,并统一检验最优条件的稳定性。确定了低温提取,3ml的反应体系, $OD_{620nm} \approx 0.9$ 的叶绿体提取液1ml,1ml提取介质,1ml浓度为0.5mM的2,4-二氯酚靛酚染液快速混匀,旋即测定620nm吸光值在6分钟内的变化,有超85%的小组可观察到典型的线性变化。实践表明,该过程不仅验证了抽象理论,还培养了学生思维的逻辑性,增强了探索的好奇心和实验信心,提升了课程学习兴趣和效率。

[关键词] 条件分析; 稳定重现; 科研逻辑; 学习兴趣提升

中图分类号: D442.63 **文献标识码:** A

Cultivate the scientific logic ability in the exploration of experimental conditions

Xiujuan Xin Yuanchan Luo Qiyao Wang Mian Zhou* Faliang An*

East China University of Science and Technology, College of Biotechnology

[Abstract] The Hill reaction is an important experiment in plant physiology course, which can clear students understand that the photosynthesis contains two continuous processes and occurs in the organelle of chloroplast. The students can visualize and quantify the exist of hydrogen receptor during photosynthesis reaction by measuring the absorbance value linear change of it. However, the repetition rate of the fascinating results was low in the large-scale experimental courses that over sixty students, the failed results depressed most students. The students were systematically divided into different groups, and analyzed the possible factors that affect the result and verified the optimized experiment factors among all groups. It was found that under the condition of low temperature, 1ml of chloroplast solution with a $OD_{620} \approx 0.9$, 1ml of extraction medium and mixed with 0.5mM of 2, 4-Dichlorophenol 1ml in the reaction system. The measured absorbance value has a straight decline in the first 5 minutes after mixing. The practice shows that the experimental conditions identified in this paper have a high recurrence rate, which not only verifies the abstract theory of the subject, but also enhances the experimental confidence and improve the interest and efficiency of the students.

[Key words] Condition analysis; Grouping test; Scientific research logic; Studying interests Increasing

引言

大学生实验教学是教学体系的重要环节,是培养学生实践能力和创新精神的重要抓手。但目前的实验教学多偏重训练学生的操作技能及对实验结果的观察及计算。对设计理念,逻辑性及科学性缺乏了解,难以实现知识的实践化。因此,如何打破现存实验教学视域下的机械性痛点,使学生掌握设计逻辑,为科研创新及合理设计提供案例参考,这是带教者需认真思考并提供破冰思路和方法的问题。

1 实验设计理念

本论文以Hill实验设计和改进过程为抓手,突出学生需要

提升的教学素质点-即科学性和逻辑性的掌握。因此,通过参与设计并实践Hill反应相关的系列条件测试,检验原理内容,突出科学性和逻辑性。以正向的实验结果激励学生的自信心,提升学习兴趣,加深对课程的了解。

再者,注重激发学生的主观能动性,通过课前问题向导,学生完成预习、讨论分组的依据及意义,猜想结果并验证理论内容。由过程及结果分享,比较不同条件对实验的影响,锻炼学生的审辨和逻辑思维能力,由实操锻炼动手能力。实现在理论和技能的指导下,解决专业问题,培育创新及技能的提升。

通过系列性,逻辑化分组、实验结果解析,实现了科学思维

和操作培训。通过不同实验条件下差异结果的分享,完成逻辑推理的分析得出结论。达成教学目标,训练和培养了学生对待科学问题的全局性思维,探究问题的能力和创新精神。

结合本实验所涉及的植物的光合作用理论,学生了解到光合作用的物质基础和生化过程。植物由叶绿体攫取光能,分解水释放氧气,同时在酶的催化下固定二氧化碳并合成葡萄糖等基础有机物,并提供细胞生长,增殖必须的化合物^[1]。其中的“希尔反应”更是“探究光合作用原理”的关键内容。其中水被持续分解产生O₂依赖于氢(或电子)受体的存在。藉此说明O₂的产生和二氧化碳的糖化分属不同的化学反应,并进而分为光反应和暗反应2个阶段^[2],而希尔反应则是光反应的具体表现。实验选择2,6-二氯酚靛酚(DCPIP)(为电子受体),其氧化态呈蓝色,还原后为无色(图1)。因此,可通过反应体系的颜色变化直观得到表现,或通过620nm处吸光值的变化,进行定性或者定量分析^[3]。因此,本实验的成功复现对理解光合作用抽象过程及量化测定具有重要意义。

但该实验步骤繁琐、反应体系组成比例无具体量化指导,因此,在大面积本科实验教学中,失败率较高,不利于开发学生核心素养的科学探究要素。

本研究通过分组测定,对影响因素完成量化分析,包括温度,叶绿体浓度及电子受体染液比,体系均一度等。获得620nm处吸光值呈线性化变化的稳定体系,并在超过30组的学生群体中进行了验证,为本教学实验的大范围推广提供了参考。

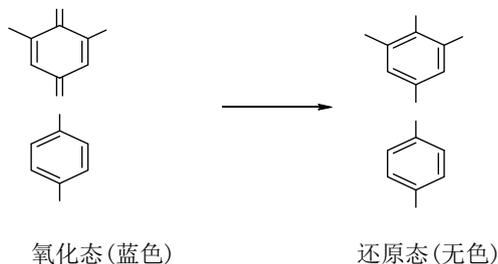


图1 氢(电子)受体氧化及还原态分子结构

2 实验材料与方法

2.1 实验材料

植物材料为高约15cm,具6叶的菠菜。三羟甲基氨基甲烷(Tris),HCl,蔗糖,氯化钠及2,6二氯酚靛酚皆购自国药集团的化学纯。分光光度计(721型,上海仪电分析仪器有限公司)。

2.2 试剂的制备过程及方法

本实验的试剂配置,如表1所示:

表1 本实验试剂制备方法

试剂	配方
提取介质	三羟甲基氨基甲烷 6.05g 溶于 250mL 水,称 A 液; 0.2M HCl 溶液 250mL,称 B 液; 450ml 去离子水中溶解 136.92g 蔗糖及 0.585g 氯化钠,称 C 液; 将 A, B, C 三种溶液混合后,0.2M 的 HCl,调节 PH=7.5,定容至 1000mL。
氢受体溶液(简称染液)	2,6-二氯酚靛酚 0.0134g,溶解至 10mL 提取介质即为 0.5mM 的染液

2.3 实验步骤

本实验操作过程,如表2所述:

表2 实验步骤

步骤	操作
叶片的选取及研磨	取干净菠菜叶片,避开叶柄,撕取 2g 叶肉,加 10mL,4℃ 预冷的提取介质与少量石英砂,置于预冷的研钵中,冰上快速研磨 1 分钟。
叶绿体的获得	1000rpm,4℃ 离心 3 分钟,上清 3000rpm,4℃ 离心 5 分钟,收集叶绿体沉淀
制备叶绿体悬液	沉淀中加入 4mL 提取介质轻轻吹散,获叶绿体悬液
配制希尔反应体系	1.0mL 提取介质,加 1.0mL 叶绿体悬液,以及 1.0mL 染液
吸光值的测定	对照组无染液,其他相同,用于标零 测定 620nm 的吸光值,90W 日光灯照射,每分钟测定一次,测 5-7 次

实验中,各个小组的差异在于叶绿体提取的量及配置希尔反应体系时,其与染液用量的差异。为获得620nm下吸光值的线性变化,设置反应体系如表3所示。

表3 叶绿体悬液及染色液用量分析

反应体系编 号	叶绿体提取液体积 (ml)	染液体积 (ml)	提取介质体积 (ml)	总体积 (ml)
1	0.5	0.5	2	3
2	1.0	0.5	1.5	3
3	1.5	0.5	1	3
4	0.5	1	1.5	3
5	1.0	1	1	3
6	1.5	1	0.5	3
7	0.5	1.5	1	3
8	1	1.5	0.5	3
9	1.5	1.5	0	3

3 结果及分析

3.1 叶绿体提取液与染液比例对反应体系吸光值线性的影响

离体叶绿体的光合强度,主要根据希尔反应光吸收值的变化确定,尤其是6分钟内的线性变化,对判断反应成功率意义重大。而离体叶绿体与2,6-二氯酚靛酚溶液的用量及比例,是关键要素,如表3所示,各组620nm吸光值变化如图2。

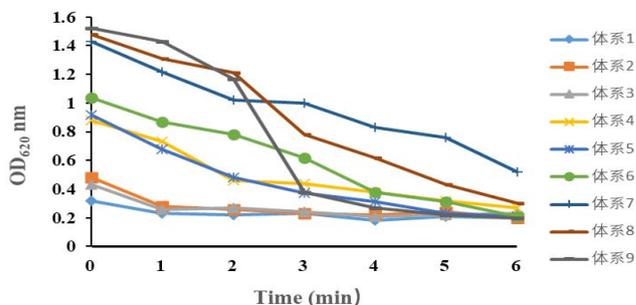


图2 不同反应体系对吸光值的影响

根据结果可知,在3ml的反应体系中,染色液用量对初始吸光值及过程变化的影响最大。染色液比例占体系50%时,初始

OD₆₂₀约1.5, 超过朗伯-比尔定律的物质浓度与吸光值间的比例关系, 存在吸光值的平台期, 如图2的体系7-9。染液比例低于20%时, 初始OD₆₂₀吸光值则低于0.5, 数据线性亦不明显。在浓度为0.5mM的2,6-二氯酚靛酚染液量为1.0ml时, 加入1.0ml初始吸光值≈0.9的叶绿体提取液, 以及1.0ml提取介质的3ml反应体系, 可测得初始OD_{620nm}为0.9。随后在90W日光灯下光照, 每分钟测定一次吸光值, 6分钟内, 可呈现明显的吸光值线性变化, 如体系5所示。其他各比例组别的线性关系则较弱, 如图2所示。

3.2 温度对吸光值的影响

按照实验确定的试剂用量, 各5组同学分别在常温及冰浴条件下完成操作, 对比在90W钨丝光(强光)及20W日光灯管(弱光)下的反应, 结果如图3所示:

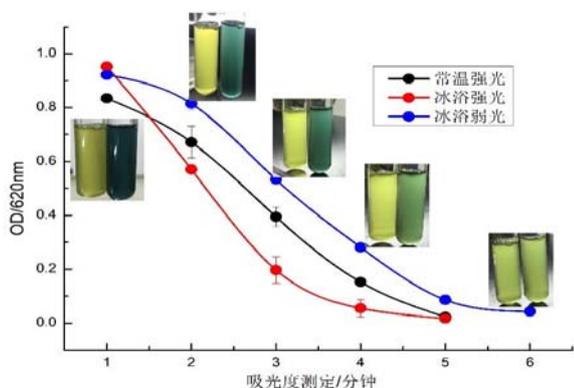


图3 温度及光强对体系吸光值变化的影响

可见温度及光照强度对OD_{620nm}的吸光值都存在影响, 但并不改变其线性范围。冰浴提取+强光照射时, 线性效果最明显。常温强光次之, 冰浴弱光的斜率最小。但在6分钟内皆具吸光值的线性变化, 说明该反应对光及温度比较敏感。提示在面向学生群体开设大面积教学时, 应预冷研钵, 低温离心获取离体叶绿体, 合适的反应体系, 采用90W钨丝灯照射可呈现明显的线性变化结果。

3.3 反应体系的均一性

反应时, 若直接将染液加入比色皿, 则因溶液比重的差异, 出现分层, 亦影响吸光值。需要充分混匀反应体系, 以免影响测定, 如图4所示。

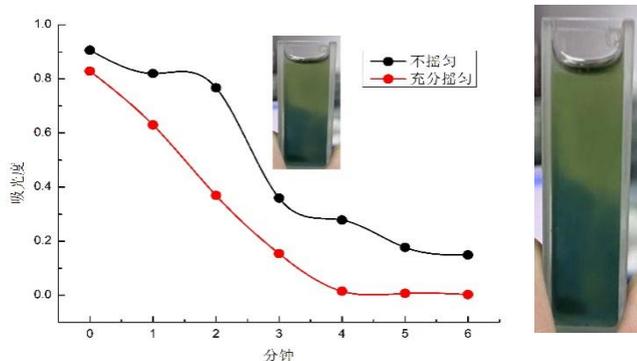


图4 体系的均一性对光反应强度的影响

3.4 染液与离体叶绿体比例对实验的影响

综合分析各组实验条件及结果发现: 在3ml的反应体系中, 染液的浓度为0.5mM, 取1ml时, 加入0.75-1g叶片提取的叶绿体悬液, OD_{620nm}在6分钟内出现线性化的几率较高, 即符合公式1的用量。

$$m * \frac{V1}{V2} = 0.75 \sim 1$$

m	研磨时所使用的叶绿体克数
V	悬浮叶绿体所用的提取介质总体积(mL)
V1	反应体系中加入的叶绿体悬液体积
V2	体系中加入的染液体积(0.5mM)

公式1. 叶绿体量与染色液比例关系

因需要保证初始吸光值小于1, 发现在希尔反应体系中, 每毫升反应液分配到约0.3g叶片的全部叶绿体时, 混合0.3ml/反应体系浓度为0.5mM的染液可满足要求。吸光值线性变化的重现率大于90%。适宜大面积实验教学的推广。

4 分析及讨论

本实验的开设可以为同学直观了解光合作用发生在叶绿体这一细胞器, 光合作用过程包含两个有序阶段。借助于蓝色氧化型2,6-二氯酚靛酚接受H⁺和电子后, 被还原成为无色的还原态^[4], 通过与无染料组实验现象的对比观察, 更能帮助学生理解植物细胞内存在天然电子和H⁺受体-NADP⁺的抽象概念。而且, 本实验的颜色变化, 可视性好, 操作逻辑性高, 且无需特殊试剂及仪器, 因此可被大面积推广。

但是, 量化测定中, 吸光值的线性变化重现几率较低, 会强烈引发学生的挫败感, 使验证性学习效果大大下降, 对本课程的教学十分不利。为改善这一现状, 提高实验成功率, 增强学生实验信心, 提高学习兴趣。我们发现了关键的影响要素如表4列示。

表4 影响反应体系吸光值线性呈现的主要因素总结

影响因素	分析
研磨时间	半分钟研磨即可充分释放叶绿体, 超过两分钟则会降低叶绿体活性
研磨温度	在0-5℃下可提取高活力的叶绿体, 如图3所示。
叶绿体及染液的比例	体系中叶绿体及染液各自的吸光值约2:1-3:1时, 试验成功率增加, 如图2所示, 弥补了目前实验指导手册中, 对两者无量化的不足 ^[5,6] 。
反应体系的均一性	不均一的反应体系, 引起较大的吸光值误差, 如图4所示。操作中, 推荐配备封口膜, 光照后, 实现快速混匀。

本研究使用最普遍的分光光度法^[7]。通过对抽象的光合作用概念的“可视”和“量”化, 加强了学生观测、理解以及分析、处理数据能力的培养。通过分析合理的希尔反应体系构建光合作用模型, 将内隐、抽象的理论知识通过外显、可视化载体得以呈现。促进了学生对概念的理解和拓展, 构建了完善的知识框架, 凸显出了对科学思维和设计的生物学学科核心素养的培养, 对

学生科研探索的逻辑设计以及创新思维的形成有重要促进作用。且该实验注重综合性、科学性和拓展性,在整体课程体系中具有承上启下的作用。既体现了学生对大一大二生物和化学基础实验技能的应用,也为其毕业论文、未来职业发展或深造奠定基础,实现知识、技能到能力、素养的培养。

[参考文献]

[1] Junge, W. Oxygenic photosynthesis: history, status and perspective[J]. Quart. Rev. Biophys., 2019, 52: e1.

[2] Kok, B.; Forbush, B.; McGloin, M. Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. I. A linear four step mechanism [J]. Photochem. Photobiol., 1970, 11: 457-475.

[3] Chen, S. G.; Yin, C. Y.; Dai, X. B.; Qiang, S.; Xu, X. M. Action of Tenuazonic Acid, a Natural Phytotoxin, on Photosystem II of Spinach [J]. Envir. Exp. Botany, 2008, 62: 279-289.

[4] 周丹阳, 朱涵钰, 胡桢靓. 利用希尔反应探究环境因素对光合作用的影响[J]. 生物学教学, 2021, 46(6): 41-42.

[5] 叶济宇, 钱月琴. 希尔反应活力的分光光度法测定[M]//薛

应龙主编. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 104-107.

[6] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 95-116.

[7] Queval, G.; Noctor, G. A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development [J]. Analy. Biochem., 2007, 363: 58-69.

作者简介:

辛秀娟(1973--), 女, 汉族, 河南省濮阳市人, 博士, 副教授。主要研究方向: 气孔结构蛋白的分析及生理学教学研究, 方法论。

*通讯作者:

周勉, 女, 华东理工大学生物工程学院教授, 博士研究生, 分子生物学教学与研究, 教学方法研究与实施。

安法梁, 男, 华东理工大学生物工程学院副教授, 博士研究生, 现代生物技术研究, 科技进展与教学融合的研究。