

# 水稻组织脯氨酸含量的测定

都浩, 游均, 熊立仲\*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

\*通讯作者邮箱: [lizhongx@mail.hzau.edu.cn](mailto:lizhongx@mail.hzau.edu.cn)

引用格式: 都浩, 游均, 熊立仲. (2018). 水稻组织脯氨酸含量的测定. *Bio-101* e1010146. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010146.

**实验原理:** 水稻在非生物逆境条件下, 体内脯氨酸 (proline) 含量显著增加。可用磺基水杨酸提取水稻组织中脯氨酸, 然后用酸性茚三酮加热处理后, 溶液即成红色, 再用甲苯萃取使色素全部转移至萃取液中。色素的深浅即表示脯氨酸含量的高低。在 520 nm 波长下比色测定吸光度, 再根据标准曲线计算水稻组织中脯氨酸的含量。

**实验目的:** 通过测定水稻体内脯氨酸含量, 反映水稻对非生物逆境的抗性。

**关键词:** 水稻, 逆境, 生理指标, 脯氨酸

## 材料与试剂

1. 10 ml 离心管
2. 1.5 ml 离心管
3. 冰醋酸及磷酸
4. 甲苯
5. 茚三酮
6. 磺基水杨酸
7. 脯氨酸 (Sigma, USA, catalog number: P0380)
8. 酸性茚三酮溶液 (见溶液配方)
9. 3%磺基水杨酸 (见溶液配方)

## 仪器设备

1. 100 ml 容量瓶及 50 ml 容量瓶
2. 分析天平

3. 烧杯
4. 剪刀
5. 电磁炉
6. 分光光度计 DU640 (Backman, USA)

## 实验步骤

### 1. 标准曲线的绘制

- 1.1 在分析天平上精确称取 10 mg 脯氨酸，倒入小烧杯内，用少量蒸馏水溶解，然后倒入 100 ml 容量瓶中，加蒸馏水定容至刻度，此标准液中每毫升含脯氨酸 100  $\mu\text{g}$ 。
- 1.2 系列脯氨酸浓度的配置。取 6 个 50 ml 容量瓶，分别盛入脯氨酸原液 0.5 ml、1.0 ml、1.5 ml、2.0 ml、2.5 ml 及 3.0 ml，用蒸馏水定容至刻度，摇匀，各瓶的脯氨酸浓度分别为 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  及 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
- 1.3 取 6 个 10 ml 离心管，分别吸取 2 ml 系列标准浓度的脯氨酸溶液及 2 ml 冰醋酸和 2 ml 酸性茚三酮溶液，每管在沸水浴中加热 30 min。
- 1.4 冷却后各试管准确加入 4 ml 甲苯作为萃取液，振荡 1 min，静置片刻，使色素全部转至萃取液中。
- 1.5 用移液器轻轻吸取各管上层脯氨酸甲苯溶液至比色杯中，以甲苯溶液为空白对照，于 520 nm 波长处进行比色。
- 1.6 标准曲线的绘制：先求出吸光度值(Y)依脯氨酸浓度(X)而变的回归方程式，再按回归方程式绘制标准曲线，计算 2 ml 测定液中脯氨酸的含量( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。

### 2. 样品的测定

- 2.1 取水稻叶片或其他组织于塑料袋或离心管中，置于冰上带回室内。
- 2.2 将样品剪碎并用分析天平精确称取重量 (样品量保持在 0.2-0.5 g 之间)，置于 10 ml 离心管中，然后向各管分别加入 5 ml 3%的磺基水杨酸溶液，在沸水浴中提取 10-30 min (提取过程中要经常摇动)，自然冷却后即为脯氨酸的提取液。
- 2.3 吸取 2 ml 提取液于另一干净的 10 ml 离心管中，加入 2 ml 冰醋酸及 2 ml 酸性茚三酮试剂，在沸水浴中加热 30 min，溶液即呈红色。

- 2.4 自然冷却后加入 4 ml 甲苯，摇荡 1 min，静置 10 min，也可以室温放置 1-3 天待测定，取上层有颜色溶液至 1.5 ml 离心管中，室温 12,000 r/min 离心 15 min。
- 2.5 用移液器轻轻吸取上层脯氨酸红色甲苯溶液于比色杯中，以甲苯为空白对照，在分光光度计上 520 nm 波长处比色，求得吸光度值。

## 结果与分析

根据回归方程计算出 (或从标准曲线上查出) 测定液中脯氨酸的浓度 X ( $\mu\text{g/ml}$ )，然后计算每克鲜重样品中脯氨酸含量 ( $\mu\text{g/g FW}$ )。计算公式如下：

单位鲜重样品的脯氨酸含量 ( $\mu\text{g/g FW}$ ) =  $(X*5)/\text{样重}$

## 注意事项

1. 萃取液是易燃、易挥发有毒液体，测定时要在通风橱中进行。

## 溶液配方

1. 酸性茚三酮溶液

将 1.25 g 茚三酮溶于 30 ml 冰醋酸和 20 ml 6 mol/L 磷酸中，搅拌加热 (70 °C) 溶解，贮于冰箱中 (4 °C)

2. 3%磺基水杨酸

3 g 磺基水杨酸加蒸馏水溶解后定容至 100 ml