

水稻组织 ACC 含量检测

刘红波, 都浩, 袁猛*

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: myuan@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 刘红波, 都浩, 袁猛. (2018). 水稻组织 ACC 含量检测. *Bio-101* e1010154. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010154.

实验原理: ACC(1-氨基环丙烷-1-羧酸)是乙烯合成的前体, 植株完整生长发育期难以检测气态乙烯的含量, 通常以 ACC 含量指示植物体内乙烯的相对含量。本实验用气相色谱方法检测反应后生成乙烯的量。

实验目的: 通过检测水稻组织中 ACC 的含量, 间接反应水稻组织中乙烯的含量。

关键词: ACC, 乙烯, 气相色谱

材料与试剂

1. 1.5 ml 离心管
2. 各种型号的枪头
3. 冰
4. 液氮
5. 氮气
6. 甲醇
7. D²ACC
8. NaOCl
9. NaOH
10. 10 mM HgCl₂
11. 5% NaOCl:饱和 NaOH = 2:1 (v/v) (见溶液配方)
12. 抽提液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 离心机
2. 天平
3. 玻璃瓶
4. 气相色谱 (岛津)
5. 脱色摇床
6. 氮吹仪 (Dry N-EVAP™111, Organomation Associates Inc. USA)
7. -70 °C 冰箱

实验步骤

1. 取样

液氮取水稻叶片，每份样品三个生物学重复，每份样品大约 0.1 g 鲜重，-70 °C 保存直到抽提，避免反复冻融。

2. 抽提

2.1 液氮研磨，磨碎；取约 0.1 g 于 1.5 ml 管中，加 750 μ l 抽提液，颠倒混匀，置冰上，避光。

2.2 4 °C、脱色摇床 300 rpm 避光抽提 4 小时；4 °C、13,000 rpm 离心 10 分钟，吸上清于一新离心管中。

2.3 在沉淀中加入 450 μ l 抽提液，4 °C、脱色摇床 300 rpm 避光抽提 4 小时，4 °C、13,000 rpm 离心 10 分钟，吸上清，合并两次上清于玻璃瓶中。

2.4 氮气吹干，加入 390 μ l 纯水定容(检测 ACC 一般不用纯化)。

2.5 在冰上加入 10 μ l 10 mM HgCl₂。

2.6 在冰上加入 100 μ l 5% NaOCl:饱和 NaOH = 2:1(v/v)，放冰上 3 分钟

2.7 气相色谱火焰检测器检测。

注意事项

1. 抽提液配成 mixture，-20 °C 保存长期使用。
2. 所用试剂 5% NaOCl:饱和 NaOH = 2:1 (v/v) 及 10 mM HgCl 应 4 °C 保存，使用前应置于冰上。

3. 所用试剂除 D²ACC 购置于 OIChemIm, 其余均为国药试剂。
4. 抽提过程注意避光和低温。

溶液配方

1. 抽提液

80%甲醇

加 5 ng/μl D²ACC (H² 标记的 ACC 做内标)

2. 5% NaOCl:饱和 NaOH = 2:1 (v/v)

注: 氢氧化钠饱和溶液: 称取 120 g 氢氧化钠, 加 100 ml 水, 振摇使之溶解成饱和溶液, 冷却后置于聚乙烯塑料瓶中, 密塞, 放置数日, 澄清后备用。