

植物生物学实验-植物生理部分

实验七 干旱和盐度对植物 体内游离脯氨酸积累的影响

【实验目的和意义】

- 生长在干旱和盐度环境中的植物，体内常积累游离的氨基酸，而游离氨基酸积累的量又往往与环境干旱的程度、盐度和植物对干旱和盐度的抵抗力（即抗逆性）有关。因而，测定植物体内游离脯氨酸的含量，在一定程度上可从生理上了解植物受环境水分和盐度胁迫的情况，了解植物对水分和盐分胁迫的耐受性和抵抗能力，在生产上和育种学上有一定的意义。

【实验原理】

- 磺基水杨酸对脯氨酸有特定反应，当用磺基水杨酸提取植物样品时，脯氨酸便游离于磺基水杨酸溶液中。然后用酸性茚三酮加热处理后，茚三酮与脯氨酸反应，生成稳定的红色化合物，再用甲苯处理，则色素全部转移至甲苯中，色素的深浅即表示脯氨酸含量的高低。在520nm波长下测定吸光度，即可从标准曲线上查出脯氨酸的含量。

【实验材料】

- 充足供水的小麦幼苗
- 干旱处理7天的小麦幼苗
- 经100mmol/L NaCl处理5天的小麦幼苗
- 经200mmol/L NaCl处理5天的小麦幼苗

【实验器材和试剂】

- 分光光度计；电子分析天平；离心机；小烧杯；普通试管；移液管；注射器；恒温水浴锅；漏斗；漏斗架；滤纸；剪刀；洗耳球。

2.5 % 酸性茚三酮溶液配制： 将1.25g茚三酮溶于30ml冰醋酸和20mL 6mol/L磷酸中，搅拌加热（70℃）溶解，贮于冰箱中。

3% 磺基水杨酸配制： 3g磺基水杨酸加蒸馏水溶解后定容至100mL。

10 μ g/mL 脯氨酸标准母液配制： 精确称取20mg脯氨酸，倒入小烧杯内，用少量蒸馏水溶解，再倒入200ml容量瓶中，加蒸馏水定容至刻度（为100 μ g/mL脯氨酸母液），再吸取该溶液10ml，加蒸馏水稀释定容至100mL，即为10 μ g/mL脯氨酸标准液。

冰醋酸。

甲苯。

【实验步骤】

■ 脯氨酸标准曲线的制作

取6支试管，编号，按下表配制每管含量为0~20 μg 的脯氨酸标准液。

试 剂	管 号						
	0	1	2	3	4	5	6
10 $\mu\text{g/mL}$ 脯氨酸标准液(mL)	0	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
蒸馏水 (mL)	2	1.8	1.6	1.2	0.8	0.4	0
冰醋酸 (mL)	2	2	2	2	2	2	2
2.5% 酸性茚三酮 (mL)	2	2	2	2	2	2	2
每管脯氨酸含量 (μg)	0	2	4	8	12	16	20

混匀后，置于沸水浴上加热30min，冷却。

各试管加入5mL甲苯，振荡30秒钟，静置片刻，使色素全部转至甲苯溶液。

以甲苯溶液为空白对照，在520nm波长处测定吸光度(A)值。以脯氨酸含量为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

■ 样品的测定

称取不同处理的植物叶片各0.5g，分别置大试管中，然后向各管分别加入5ml 3%的磺基水杨酸溶液，在沸水浴中提取10min（提取过程中要经常摇动），冷却后过滤于干净的试管中，滤液即为脯氨酸的提取液。

吸取2ml提取液于带玻塞试管中，加入2ml冰醋酸及2ml 2.5% 酸性茚三酮试剂，在沸水浴中加热30min，溶液即呈红色。冷却后加入5ml甲苯，摇荡30秒钟，静置片刻后，测定萃取液在520nm处的吸光值。

【结果计算】

从标准曲线上查出样品测定液中脯氨酸的含量，按下公式计算样品中脯氨酸含量：

$$\text{脯氨酸含量 (}\mu\text{g/g)} = \frac{X \times \text{提取液总量 (mL)}}{\text{样品鲜重 (g)} \times \text{测定时提取液用量 (mL)}}$$

公式中：X — 从标准曲线中查得的脯氨酸量 (μg)

【注意事项】

- 配置的酸性茚三酮溶液仅在24 h内稳定，因此最好现用现配。
- 试剂添加次序不能出错。