

植物生理分析技術

LABORATORY MANUAL FOR PHYSIOLOGICAL STUDIES OF PLANTS

高景輝◎著



本書特色：

本書所列的方法特別適用於水稻材料，並且適用於其他植物材料。

針對化學成分、酵素、電泳詳細剖析。

每個實驗步驟皆含詳細的數據以及詳細文字註解。

實驗流程圖簡單明瞭，讓讀者一目了然。

配合實驗儀器圖以及數據分析表，能收事半功倍之效。

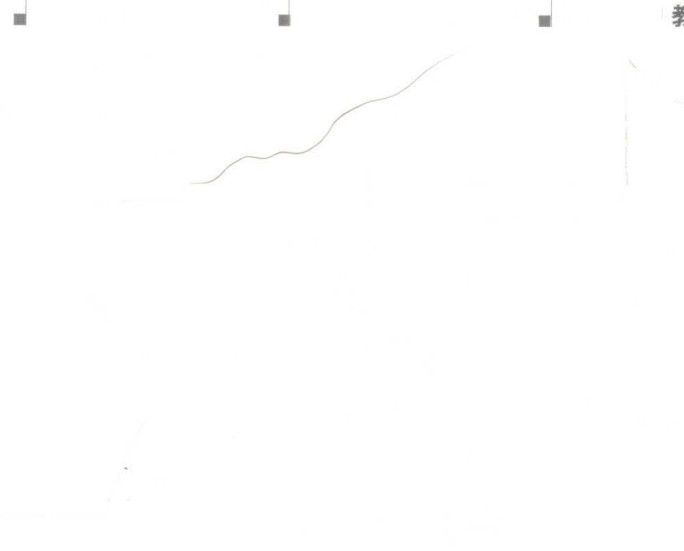
植物生理分析技術

LABORATORY MANUAL FOR PHYSIOLOGICAL STUDIES OF PLANTS



高景輝 著

台灣大學農藝系教授
植物保護科技基金會董事
教育部顧問室諮議委員



五南圖書出版公司 印行

國家圖書館出版品預行編目資料

植物生理分析技術 / 高景輝作. -- 初版. --
臺北市：五南，2005[民 94]

面：公分

ISBN 957-11-3937-8(平裝)

1. 生理學(植物) - 分析

373

94004444

5V01

植物生理分析技術

作 者 高景輝
編 輯 葉育秀 劉俊輝

出版者 五南圖書出版股份有限公司
發行人 楊榮川

地 址：台北市大安區 106
和平東路二段 339 號 4 樓

電 話：(02)27055066 (代表號)

傳 真：(02)27066100

劃 撥：0106895 3

網 址：<http://www.wunan.com.tw>

電子郵件：wunan@wunan.com.tw

顧 問 財團法人資訊工業策進會科技法律中心

版 刷 2005 年 6 月 初版一刷

定 價 250 元

版權所有・請予尊重

序

我第一次讀到菲律賓國際稻米研究所出版的「Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice」時，心裡立即的想法是我們也應該有一本類似的書，推薦給國內從事水稻生理研究的學生或研究人員，這是三十多年前的事。

三十多年來，我們一直從事水稻生理的基礎研究。研究過程中，我們使用了許多種分析方法與技術。這本書裡的分析技術，涵蓋「化學成分分析」、「酵素分析」與「電泳分析」三個部分。每一種分析技術都經過一試再試。這本書最大的目的，是希望能夠幫忙一些對「植物生理」有興趣的學生或研究人員，在他們的研究過程中得到一些支援，進而使他們能夠體會到「植物生理」其實是一個很有趣的領域。

一個輾轉的牽引，遇見龐涵怡主編，瞭解「五南」，同時促成這本書的出版。我不相信，這本書會像時下一些非科學性書籍，能激起很大的波瀾與漣漪。但我們相信，這本書會留下一個記錄。「五南」所抱持的信念應該是「深耕教育」，我想。

三十多年的研究生涯中，許多研究生跟過我，我們師生共同跋涉，共同成長。在逼近退休的時候，我謝謝他們。在決定出版這本書後，奕婷、國棟與振武的付出，是我特別要感謝的。

高景輝

2005年1月17日寫於

台灣大學水稻生理研究室

目錄

前言	1
第一部分：化學成分分析	3
Absciscic acid (ABA)	4
Al	11
Amino acids	14
Amino nitrogen	15
Anthocynins & flavonoids and/or sinapate esters	17
Ascorbate and dehydroascorbate	18
Cd	20
Chlorophyll	23
Cu	25
Fe	28
Glutathione (GSH & GSSG)	31
Glycinebetaine	34
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	36
Lignin	38
Malondialdehyde (MDA)	41
Na	43
Ni	46
NH_4^+	49
NO_3^-	52
Pi (無機磷)	54
Polyamines	56

Proline	60
Protein	62
Reducing sugar	64
Relative water content (RWC)	67
Starch	68
Total peroxide	71
Total sugars	72
Transpiration rate	74

第二部分：酵素分析 75

Acid phosphatase (APase)	76
Adenosine triphosphatase (ATPase)	79
α -Amylase	81
Ascorbate oxidase	83
Ascorbate peroxidase	85
Catalase	87
Diamine oxidase	89
Glutamate dehydrogenase (GDH)	91
Glutamine sythetase (GS)	93
Glutathione reductase (GR)	96
Glycolate oxidase	98
Inorganic pyrophosphatase (IPPase)	100
Ornithine aminotransferase (OAT)	105
Peroxidase	107
Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)	110
Proline dehydrogenase	112

Protease (I)	114
Protease (II)	116
Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR)	122
Superoxide dismutase (SOD)	124
Syringaldazine peroxidase	126
Wall-bound ferulate-peroxidase	128
Wall-bound NADH-peroxidase	130
Wall-bound peroxidase	133

第三部分：電泳分析 137

Acid phosphatase (APase) isozyme: Native PAGE	138
Peroxidase isozyme: Isoelectric focusing (IEF) electrophoresis	141
SDS-PAGE: Coomassie brilliant blue stain (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)	144
Superoxide dismutase (SOD) isozymes	148

附錄： 153

水稻幼苗之水耕栽培法	154
常用試劑原液之配製	156
各種緩衝溶液及其最適 pH 值範圍	159
PEG6000 溶液與滲透勢換算表	160

前言

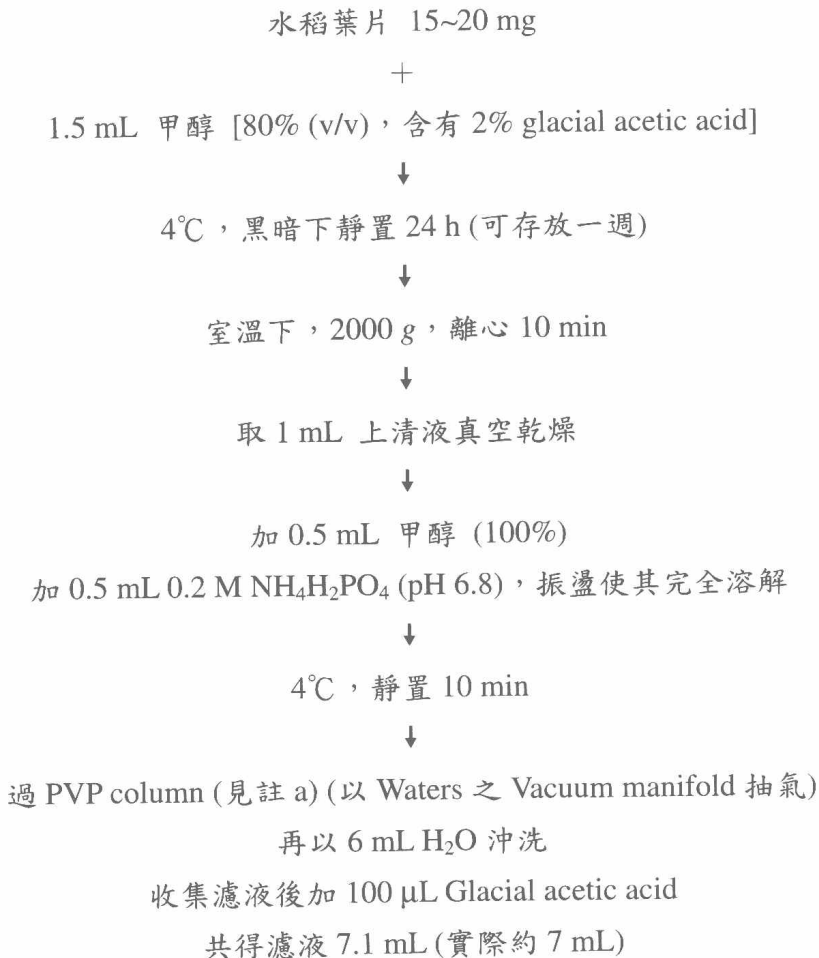
這本書的分析方法原本是提供於台灣大學農藝系水稻生理研究室研究生使用。水稻生理研究室所研究的材料為，人工氣候室下生長的水稻幼苗葉片、水稻懸浮培養細胞以及黑暗下生長的水稻幼苗根。因此，本書所列的方法特別適用於水稻材料。根據我們的經驗，這些方法也適用於其他植物材料。不過，在利用其他植物做材料時，我們建議應先考慮，使用的材料水分含量是否很高、蛋白質含量是否很低以及酚類化合物是否太高等等，然後再做適當的調整。

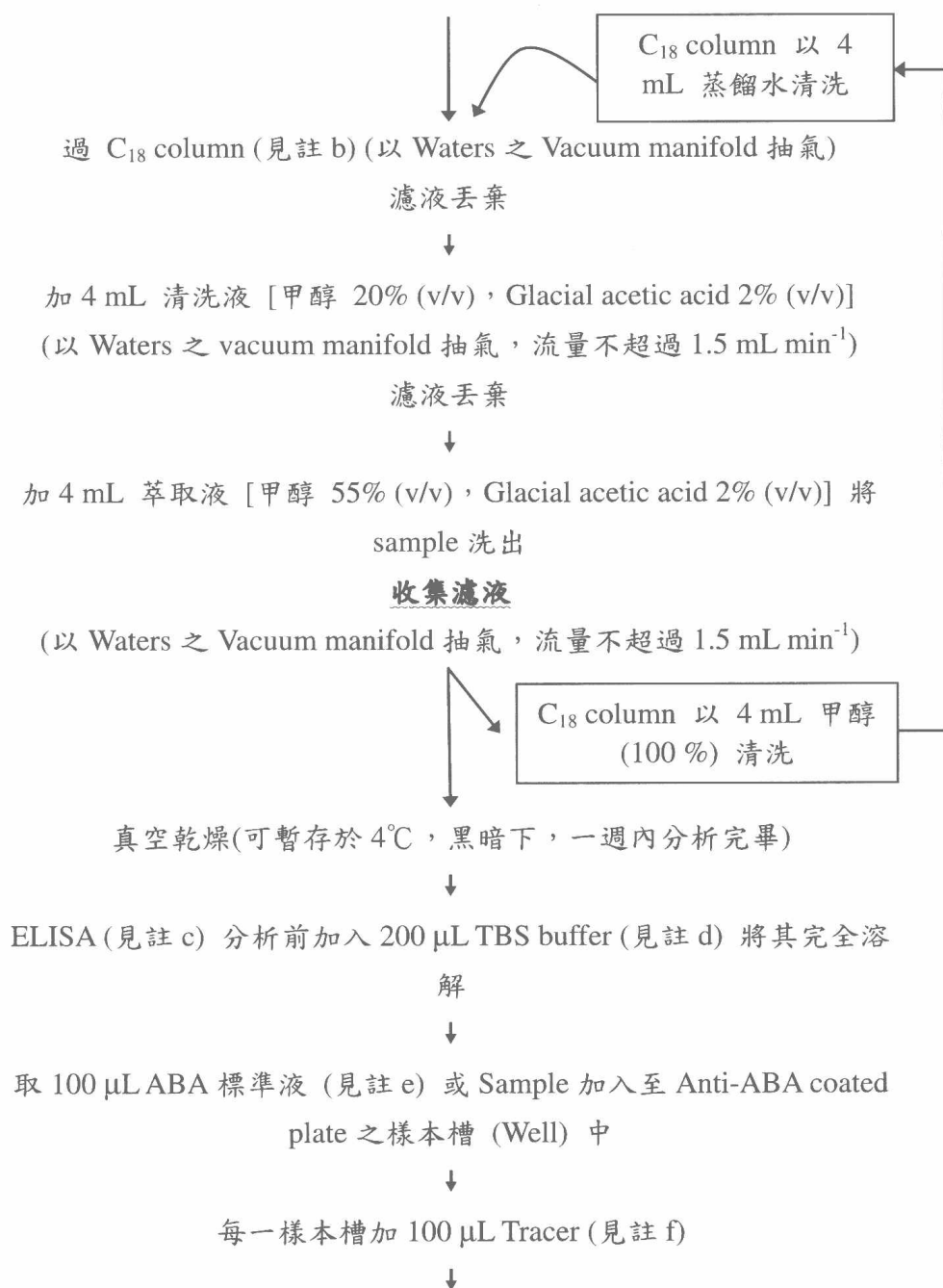
第一部份：化學成分分析

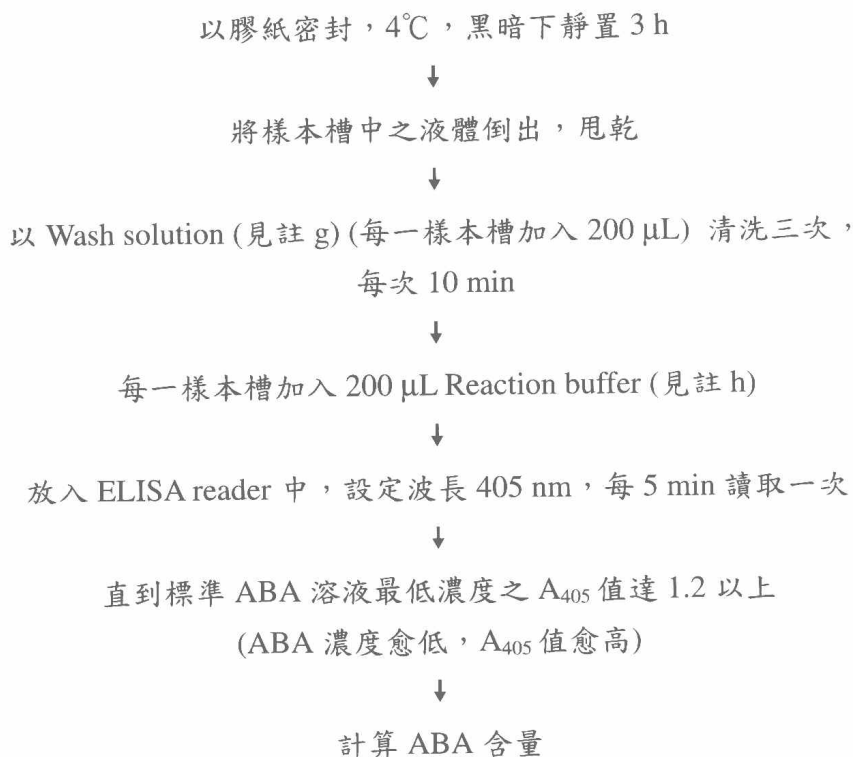
Abscisic acid (ABA)

Hurng et al. (1994) J Plant Physiol 143: 102-105

分析步驟







計算：

ABA content：

$$\text{Binding \%} = \frac{\text{Sample 之 } A_{405} - 1000 \text{ pmol mL}^{-1} \text{ ABA 之 } A_{405}}{\text{B}_0 \text{ 之 } A_{405} - 1000 \text{ pmol mL}^{-1} \text{ ABA 之 } A_{405}} \times 100\% \text{ binding}$$

$$B_0 = 100 \mu\text{L tracer} + 100 \mu\text{L TBS buffer} = 100\% \text{ binding}$$

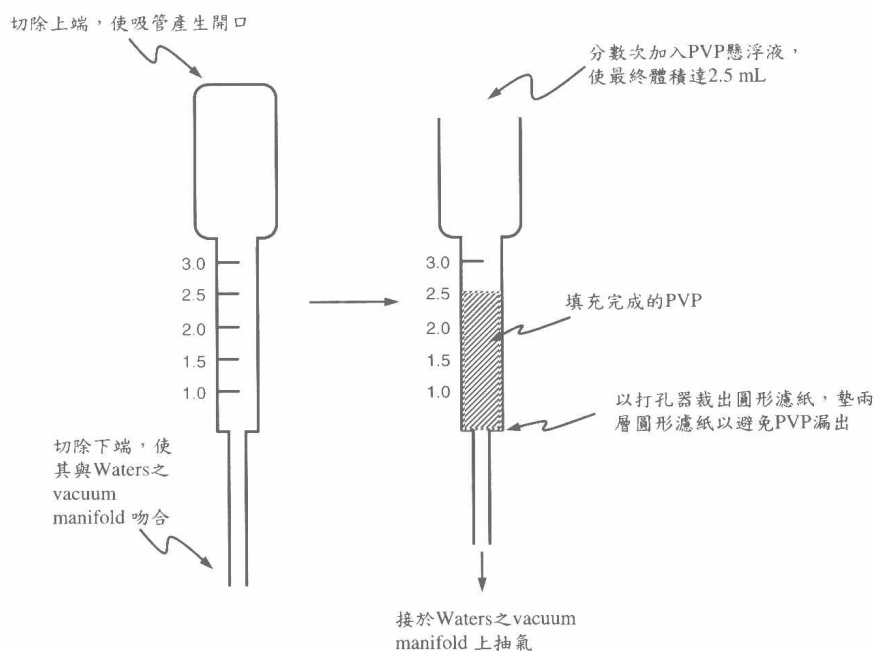
$$\text{NSB} = 100 \mu\text{L tracer} + 1000 \text{ pmol mL}^{-1} \text{ ABA} = 0\% \text{ binding}$$

以 ABA 標準濃度測定 A_{405} ，再由 A_{405} 換算成 Binding %。由 ABA 濃度與 Binding % 建立標準曲線。Sample 亦可由 A_{405} 換算成

Binding %，再由標準曲線求得 ABA 含量。ABA 含量以 pmol g^{-1} FW 表示 (得注意稀釋倍數，依各人萃取過程推算)。

註：

a： 自行以 3 mL 刻度吸管製備，約 2.5 mL 之體積，以 Waters 之 Vacuum manifold 抽氣使 Column 密實，如下圖：



(洪國棟繪製)

b： C_{18} column 為重複使用，先以 4 mL 甲醇 (100%) 清洗一遍，再以 4 mL 二次蒸餾水清洗一遍。

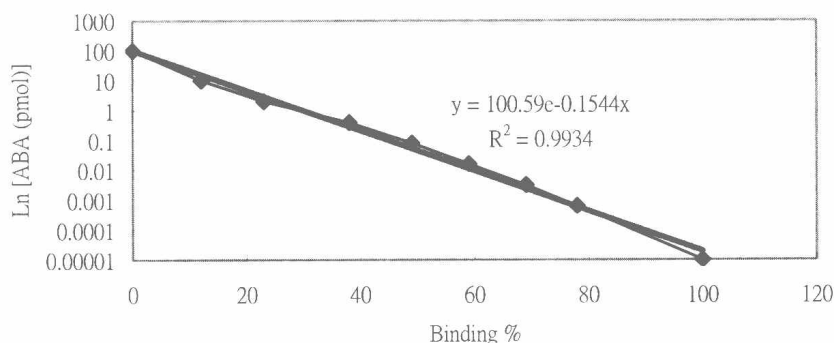
c： ELISA 分析使用購自 Agdia 公司之 Phytodetek ABA kit

d：TBS buffer 配方 (in 1000 mL，pH 7.5)

Trizma base	3.03 g
NaCl	5.84 g
MgCl ₂ •6H ₂ O	0.20 g
NaN ₃ (sodium azide)	0.20 g

e：ABA 標準曲線之建立：

編號	ABA (pmol mL ⁻¹) 溶於 TBS buffer	吸取體積 (μL)	每一樣本槽中 的 ABA 含量 (pmol)	Binding %
1=NSB	1000	100	100	0
2	100	100	10	依實測值
3	20	100	2	依實測值
4	4	100	0.4	依實測值
5	0.8	100	0.08	依實測值
6	0.16	100	0.016	依實測值
7	0.032	100	0.0032	依實測值
8	0.0064	100	0.00064	依實測值
9=B ₀	0	100	0	100



ABA 定量用之標準曲線 (洪國棟提供)

計算：若樣本槽之 binding % 為 **40**，每樣本槽 (100 μ L 的樣本) 中 ABA 含量 = $100.59 \times e^{(-0.1544 \times 40)}$ (pmol)
= 0.32 pmol。

注意：因為呈色反應每次有些不同，標準曲線製作應於每次試驗同時進行。

f : Tracer solution :

1 瓶 Tracer 先加 1 mL 蒸餾水，5 分鐘後每瓶 Tracer 再加 4 mL Tracer diluent (kit 所附)備用，此 Solution 應新鮮配製

g : Wash solution :

可用 kit 所附

Wash solution 配方 (in 1000 mL , pH 7.4) :

NaCl	8.00 g
Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	1.15 g
Potassium phosphate, monobasic (anhydrous)	0.20 g
KCl	0.20 g
Tween-20	0.50 g

NaN_3 (sodium azide)	0.20 g
-------------------------------	--------

h : Reaction buffer :

一顆 PNP (p-nitrophenyl phosphate disodium salt) substrate tablet (5 mg PNP/tablet) 溶於 5 mL substrate diluent (可用 kit 所附)

Substrate diluent 配方 (in 1000 mL , pH 9.8 , stored at 4°C) :

MgCl_2	0.10 g
NaN_3 (sodium azide)	0.20 g
Diethanolamine	97.0 g