

1、一种通过槟榔碱与脯氨酸含量检测槟榔幼苗干旱状态的方法，其特征在于，所述通过槟榔碱与脯氨酸含量检测槟榔幼苗干旱状态的方法包括：

步骤一，槟榔幼苗干旱处理：将槟榔幼苗栽种于塑料盆中，放置在光照培养箱内，进行适应性培养，不浇水处理，持续干旱多天；

步骤二，样品的采集：分别在处理后不同天数后收集槟榔叶片和根系样品，液氮速冻后存于冰箱储存；

步骤三，槟榔碱含量的测定：使用间接 ELISA 法对槟榔碱含量进行测定；

步骤四，脯氨酸含量的测定：使用水浴浸提法对脯氨酸含量进行测定；

步骤五，槟榔幼苗干旱状态的判断：通过测定槟榔碱含量与脯氨酸含量的比值来判断槟榔幼苗的干旱状态。

2、如权利要求 1 所述的通过槟榔碱与脯氨酸含量检测槟榔幼苗干旱状态的方法，其特征在于，步骤一中，选取长势一致的 1-2 叶龄槟榔幼苗，所述槟榔幼苗每周浇一次 1/2 Hoagland 营养液，所述 Hoagland 营养液的 pH=6.0。

3、如权利要求 1 所述的通过槟榔碱与脯氨酸含量检测槟榔幼苗干旱状态的方法，其特征在于，所述光照培养箱的温度为 26℃，光照时间为：光 16 h /暗 8 h。

4、如权利要求 1 所述的通过槟榔碱与脯氨酸含量检测槟榔幼苗干旱状态的方法，其特征在于，步骤三中，所述使用间接 ELISA 法对槟榔碱含量进行测定，包括：

(1) 样品提取液的准备；

(2) 包被：将 96 孔酶标板中各孔加入 12 mL 包被缓冲液，置于 37 °C 孵育 3 h 或置于 4 °C 冰箱孵育，弃液，用洗涤液冲洗酶标板 3 次；

(3) 封闭：将酶标板中各孔加入 150μ L 封闭液，置于 37 °C 孵育 30 min；

(4) 标品、样品及抗体的准备：分别配置 6000 ng/mL、2000 ng/mL、666.7 ng/mL、222.2 ng/mL、74.1 ng/mL、24.7 ng/mL、8.23 ng/mL 的槟榔碱标品；将样品提取液分别用样品稀释液稀释 1500 倍；将抗体用样品稀释液稀释；

(5) 加样孵育：将标品及样品的稀释液分别以 50 $\mu$  L/孔加到酶标板对应孔中；置于 37 °C 孵育 30 min；弃液，用洗涤液冲洗酶标板 3 次；

(6)加二抗：将辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠抗体稀释 1000 倍；以 100 $\mu$ L/孔加到酶标板对应孔中；弃液，用洗涤液冲洗酶标板 4-6 次；

(7)显色：准备底物显色液，将底物显色液以 100 $\mu$  L/孔加到酶标板对应孔中，常温显色 20 min；

(8)终止反应：将终止液以 50  $\mu$  L/孔加到酶标板对应孔中；

(9)观察结果：用酶联免疫检测仪在 490 nm 下测定吸光值。

5、如权利要求 4 所述的通过槟榔碱与脯氨酸含量检测槟榔幼苗干旱状态的方法，其特征在于，所述样品提取液的准备，包括：

① 称取槟榔样品粉末 50 mg；

② 加入 1 mL 浓度为 50%甲醇，所述甲醇为用去离子水稀释色谱级无水甲醇；

③ 超声处理 30 min-1 h；

④ -20 °C 静置 3-5 h；

⑤ 室温涡旋混匀；

⑥ 10000 g 离心 10 min，取上清；

⑦ 使用 1 mL 一次性使用无菌注射器吸取(4)中溶液，用 0.45 $\mu$  m 有机相针式滤器过滤。

6、如权利要求 4 所述的通过槟榔碱与脯氨酸含量检测槟榔幼苗干旱状态的方法，其特征在于，步骤（2）中，所述包被缓冲液加入 3 $\mu$ L 包被抗原。

7、如权利要求 1 所述的通过槟榔碱与脯氨酸含量检测槟榔幼苗干旱状态的方法，其特征在于，步骤四中，所述使用水浴浸提法对脯氨酸含量进行测定，包括：

(1)标准曲线的制作；

(2) 样品脯氨酸的提取：分别称取槟榔幼苗叶片和根系各阶段的 0.1 g 样品，

至 2.0 mL 的离心管中, 各加 1 mL 3% 的磺基水杨酸溶液, 90 °C 水浴振荡 10-15 min; 室温 12000 g 离心 10 min; 取上清, 过滤备用;

(3) 样品中脯氨酸的测定: 每种样品的滤液都设置三个重复。

8、如权利要求 7 所述的通过槟榔碱与脯氨酸含量检测槟榔幼苗干旱状态的方法, 其特征在于, 所述标准曲线的制作, 包括:

- ① 取 7 个 25 mL 玻璃试管, 编成 1-7 号, 按顺序向各离心管中加入试剂;
- ② 混匀, 95 °C 水浴 30min, 冷却到室温;
- ③ 各管中分别加 5.0 mL 甲苯, 充分混匀以萃取脯氨酸;
- ④ 黑暗下静置 2-3 h;
- ⑤ 待溶液分层后, 吸取甲苯层溶液于 96 孔板中, 各孔 200  $\mu$  L, 各管重复 3 次;
- ⑥ 使用酶标仪, 于 520 nm 波长下测定吸光值 A,  $\Delta A = A - A_{\text{空白}}$ ;
- ⑦  $\Delta A$  所对应的各管脯氨酸含量分别为: 0.00 $\mu$  g、0.08 $\mu$  g、0.16 $\mu$  g、0.32 $\mu$  g、0.48 $\mu$  g、0.64 $\mu$  g、0.8 $\mu$  g;
- ⑧ 以脯氨酸含量为横坐标,  $\Delta A$  为纵坐标, 绘制标准曲线, 所述标准曲线方程为:  $y = 0.4209x - 0.0013$ 。

9、如权利要求 7 所述的通过槟榔碱与脯氨酸含量检测槟榔幼苗干旱状态的方法, 其特征在于, 所述样品中脯氨酸的测定, 包括:

- ① 按顺序向各离心管中加入试剂, 混匀, 95 °C 水浴加热 30 min, 冷却至室温;
- ② 各离心管中分别加入 800  $\mu$  L 甲苯;
- ③ 充分混匀以萃取脯氨酸;
- ④ 黑暗下静置 2-3 h;
- ⑤ 待溶液分层后, 吸取甲苯层溶液于 96 孔板中, 各孔 200  $\mu$  L, 各管重复 3 次;
- ⑥ 使用酶标仪, 于 520 nm 波长下测定吸光值 A,  $\Delta A = A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}$ ;

⑦ 样品中脯氨酸含量计算如下：

$$\text{脯氨酸含量} (\mu\text{ g/g}) = [(\Delta A + 0.0013) \div 0.4209] \div [(V1 \div V) \times (V3 \div V2)] \div M \\ = 316.78 \times (\Delta A + 0.0013)$$

V1---加入到反应体系中的样品提取液体积，0.3 mL；V---样品提取液总体积，1 mL；V2---甲苯萃取总体积，0.8 mL；V3---酶标仪上样的体积，0.2 mL；M---样品质量，0.1g。

10、如权利要求 1 所述的通过槟榔碱与脯氨酸含量检测槟榔幼苗干旱状态的方法，其特征在于，步骤五中，所述通过测定槟榔碱含量与脯氨酸含量的比值来判断槟榔幼苗的干旱状态，包括：

对于地上部，槟榔碱含量与脯氨酸含量的比值大于 300，对于地下部，槟榔碱含量与脯氨酸含量的比值大于 500，则判定槟榔幼苗处于早期干旱；

对于地上部，槟榔碱含量与脯氨酸含量的比值小于 300，对于地下部，槟榔碱含量与脯氨酸含量的比值小于 500，则判定槟榔幼苗处于晚期干旱。