

技术与方法 Techniques and Methods

检测双孢蘑菇培养料中微量 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)的离子色谱法

周巍巍, 黄涛, 高玉千, 戚元成, 申进文, 邱立友*

河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002

Ion Chromatography for Determination of Trace Amount 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) in Mushroom

ZHOU Wei-Wei, HUANG Tao, GAO Yu-Qian, QI Yuan-Cheng, SHEN Jin-Wen, QIU Li-You*

College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

摘要: 建立了一种快速简便直接检测双孢蘑菇培养料中微量 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)含量的离子色谱法。此法使用 Dionex ICS-3000 离子色谱仪与 AminoPac PA-10 离子交换柱, 以 $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH、 $1.00 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc 和水作为洗脱液进行梯度洗脱, 流速 $0.25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量 $25 \mu\text{L}$ 。在此条件下, 信噪比为 3 时, ACC 的保留时间为 9.284 min , 最低检测限是 $0.0330 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 标准曲线线性符合系数为 0.9990, 线性范围在 $0.10\sim 2.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。三个加标水平下的回收率分别为 106.00%、91.71% 和 96.08%。该方法可用于检测双孢蘑菇培养料中的 ACC 含量, 检测结果为 $3.6620 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。此法也适用于其他食用菌和土壤微生物的研究。

关键词: 离子色谱法; 1-氨基环丙烷-1-羧酸; 双孢蘑菇培养料

1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)是高等植物合成乙烯的直接前体。已发现有很多微生物(包括细菌、放线菌、霉菌和酵母菌)能产生乙烯, 但一般认为其乙烯合成途径与高等植物不同, 不是由甲硫氨酸经 ACC 途径, 而是由甲硫氨酸经 2-酮-4-甲基硫代丁酸(2-keto-4-methylthiobutyric acid, KMBA)途径或由谷氨酸经 2-酮戊二酸途径(Fukuda 等 1993)进行的。但越来越多的证据表明, 微生物中也具有和高等植物相同的乙烯合成途径(Coleman 和 Hodges 1986)。土壤微生物能够利用 ACC 为碳源或氮源并产生乙烯(Frankenberger 和 Phelan 1985)。与添加 L-甲硫氨酸、KMBA 和碳化钙(CaC_2)相比, ACC 是土壤微生物合成乙烯的最有效底物(Khalid 等 2006)。草地早熟禾(*Poa pratensis*)的病原菌小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)具有由甲硫氨酸合成乙烯的 2 条途径(Coleman 和 Hodges 1986)。双孢蘑菇和香菇(*Lentinula edodes*)均能在灭菌的培养料中生长并产生乙烯(Wood 和 Hammond 1977; Ohga 1998), 但这 2 种担子菌是通过哪种途径合成乙烯还不清楚。因此, 定量测定培养基和菌体中的 ACC 含量可有助于确定微生物是否具有由甲硫氨酸经 ACC 合成乙烯的途径。

植物根际促生菌 ACC 脱氨酶产生菌应用于植

物生产可以有效地增强植物的抗逆性和提高产量, 这已经过 ACC 脱氨酶缺失突变株、转基因植株和大田试验证实(Glick 等 1994; Li 等 2000; Arshad 等 2007)。但迄今在植物根际土壤和植物组织中还没有直接的 ACC 含量变化的证据。植物和微生物合成的 ACC 并非全部用于生成乙烯(Yang 和 Hoffman 1984; Jia 等 2000)。此外, 由于离体的组织会大量合成乙烯以响应损伤和干燥, 所以植物组织中乙烯含量的测定是相当困难的(Smets 等 2003)。因此在研究乙烯的生物合成途径、影响 ACC 生成乙烯的因素、ACC 脱氨酶产生菌对植物乙烯合成的影响以及乙烯对微生物和植物生长发育的影响时, 定量测定 ACC 含量十分必要。

测定 ACC 含量的方法有多种, 可分为间接法和直接法二类。间接法将 ACC 转化为乙烯或是将 ACC 衍生化后, 再用气相色谱仪(Boller 等 1979)、毛细管电泳(Smets 等 2003)、液相色谱与气相色谱联用(Hall 等 1989)等进行测定。直接检测 ACC 的方法有毛细管电泳(Kazmierczak 和 Kazmierczak 2007)和高效液相色谱-电喷雾/串联质谱(Petritis 等 2000; 马莹莹等 2008)等。间接法测定 ACC 的结果

收稿 2009-05-12 修定 2009-06-12

资助 河南省重点科技攻关项目(0223013100)。

* 通讯作者(E-mail: qliyou@henau.edu.cn; Tel: 0371-63555175)。

往往偏低,而直接法所用的提取方法繁琐、样品需用量大,不便于大量样品的同时测定或设备复杂。为此本文建立了可以直接测定双孢蘑菇培养料中微量 ACC 含量的方法。

材料与方 法

1 仪器与试剂

Dionex ICS-3000 离子色谱仪(美国 Dionex 公司), AminoPac PA-10离子交换柱,在线脱气装置四元梯度泵,自动进样器 25 μL 定量环, ED50 电化学检测器。

分析纯 NaOH (美国 Sigma 公司)、色谱纯甲醇(德国 Merck 公司)和 ACC 标准品(美国 Sigma 公司), MCX 固相萃取小柱(60 mg \cdot 3 mL $^{-1}$, 美国 Waters 公司)。

2 ACC 标准溶液的配制

准确称取 0.5000 g ACC 标样溶解在超纯水中,定容至 50 mL,再逐级稀释,分别配成 2.00、1.00、0.75、0.50、0.25、0.10 和 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 共 7 个浓

度标品。

3 双孢蘑菇培养料中 ACC 的提取和预纯化

参考 Jia 等(2000)和马莹莹等(2008)文中的方法并作修改。双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)2796 菌株培养料过 20 目筛后准确称取 1 g,用液氮反复冻融并研磨,以 10 mL 超纯水超声提取 30 min, 8 000 \times g 离心 20 min,取上清液并调 pH 至 4.0,用 20 mL 氯仿洗涤一次,取水相,过 MCX 固相萃取小柱。分别用 2 mL 甲醇和 1 mL 超纯水洗柱,最后用 1 mL 1 mol \cdot L $^{-1}$ 氨水(溶剂为甲醇)洗脱,收集并用氮气吹干,超纯水定容于 1 mL 离心管中,上机前用 0.22 μm 的滤头过滤,以流动相复溶后用离子色谱仪检测。

4 色谱条件

0.25 mol \cdot L $^{-1}$ NaOH、1.00 mol \cdot L $^{-1}$ NaAc 和水作为洗脱液进行梯度洗脱,梯度淋洗条件见表 1。柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 25 μL ,信噪比 3。检测方式为积分脉冲安培检测。实验数据的采集和处理均由 Chromeleon 6.80 色谱工作站控制。

表 1 分离 1-氨基环丙烷-1-羧酸的梯度淋洗程序

时间 /min	水 /%	0.25 mol \cdot L $^{-1}$ NaOH /%	1.00 mol \cdot L $^{-1}$ NaAc /%	梯度曲线类型
0.0	76	24	0	
2.0	76	24	0	1
8.0	64	36	0	8
11.0	64	36	0	8
18.0	40	20	40	8
21.0	44	16	40	5
23.0	14	16	70	8
42.0	14	16	70	8
42.1	20	80	0	5
44.1	20	80	0	5
44.2	76	24	0	5
60.0	76	24	0	5

实验结果

1 流动相流速的选择

流动相流速对检测灵敏度和分离效果均有影响。流速低时,检测灵敏度高,分离效果好,但分离时间较长;流速高时,分离时间缩短,检测灵敏度和分离效果有所降低。改变流速条件发现,选择流速为 0.25 mL \cdot min $^{-1}$ 时,ACC 标准样的保留时间为 9.284 min (图 1)。

2 标准曲线的绘制和最低检测限

用 Surveyor 自动进样器将 7 个浓度的 ACC 标样分别进样 25 μL ,每个浓度重复 3 次,在信噪比为 3 时 ACC 保留时间为 9.284 min,仪器对 ACC 的最低检测限是 0.0330 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。用仪器所带的专业软件计算得到色谱峰的峰面积,绘制进样浓度与峰面积标准曲线(图 2)。标准曲线的线性回归方程为 $y=18.051x+0.1352$,线性符合系数为 0.9990,达到极显著水平($P<0.01$),线性范围在 0.10~2.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,

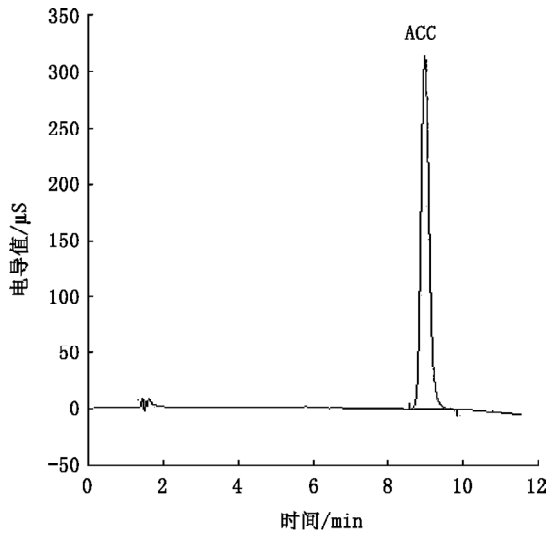
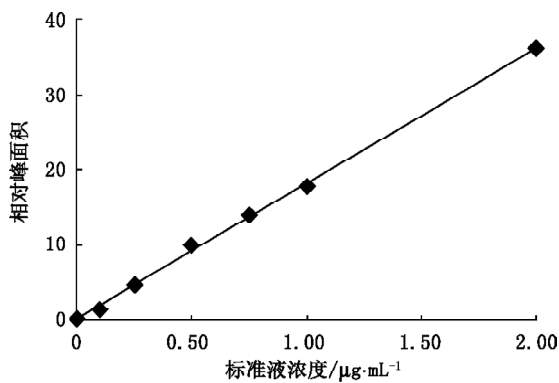


图1 ACC标准溶液的离子色谱图

图2 ACC标准曲线
进样量为 25 μL。

在此范围内可以根据该曲线对样品中的ACC进行定量分析。

3 标准样品的回收率

样品处理前分别加入相当于样品中ACC含量的50%、25%和10%的标准样品,重复3次,分别进行ACC提取和预纯化后的ACC含量测定,计算标准样品的回收率,三个水平标准样品的回收率分别是106.00%、91.71%和96.08%(表2)。

表2 双孢蘑菇培养料中添加3个水平ACC
标准样品的回收率($n=3$)

加标量/μg	回收量/μg	回收率/%
0.1250	0.1325	106.00
0.0625	0.0573	91.71
0.0250	0.0240	96.08

4 双孢蘑菇培养料中ACC含量的测定

从图3可见,ACC峰与其它杂质能够很好地分开,测得峰面积值后,从标准曲线中查出ACC浓度,计算后得到培养料中的ACC含量为 $3.6620 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。

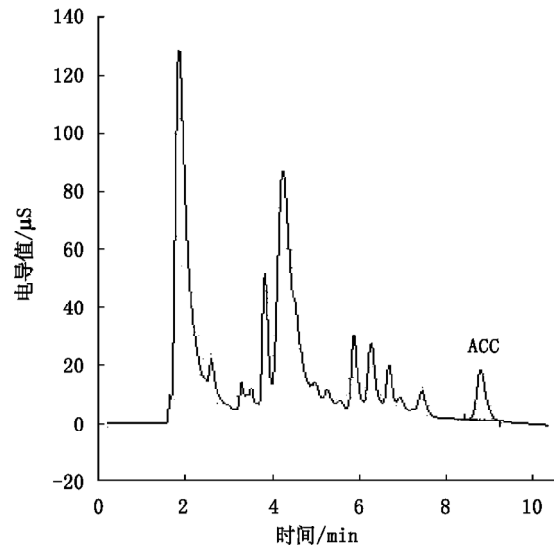


图3 测定双孢蘑菇培养料中ACC的色谱图

讨 论

采用离子色谱法直接测定双孢蘑菇培养料中的ACC含量与其它间接法和直接法测定的ACC相比,样品用量少,前处理简便,杂质干扰小,适用于食用菌和土壤微生物的研究。

自1975年离子色谱问世以来,在生物科学研究中这一技术已广泛用于生物可电解物质、糖类、维生素、抗生素、蛋白质、多肽和氨基酸等的分析检测(李云燕2005),但用于ACC的检测尚未见报道。ACC是非蛋白质组分氨基酸,易溶于水,在碱性介质中以羟基阴离子状态存在,因此可采用离子色谱法进行检测。此外,从双孢蘑菇培养料中提取纯化ACC时,选用氯仿萃取、MCX阳离子交换柱提取纯化和室温下加压氮气吹干的方法,可有效提高ACC的提取效率,减少离子色谱时的杂峰数(马莹莹等2008)。将样品用液氮冻融2~3次,有利于破坏菌体细胞壁结构,提高ACC的提取率和检出率。

双孢蘑菇在菌丝生长和出菇阶段均合成较高浓度的乙烯,尤其是出菇阶段的乙烯合成量常是爆

发性的增加, 乙烯的合成与覆土无关(Turner 等 1975; Wood 和 Hammond 1977)。本文应用离子色谱法从双孢蘑菇培养料中检测出较高含量的 ACC [$3.6620 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)], 显著高于覆土(未发表资料), 因此认为, 双孢蘑菇可能存在高等植物中的由甲硫氨酸经 ACC 合成乙烯的途径。

参考文献

- 李云燕(2005). 离子色谱分析中的几个问题探讨. 中国环境监测, 21 (2): 44~48
- 马莹莹, 盖颖, 陈伟奇, 蒋湘宁(2008). 一种用高效液相色谱-电喷雾/串联质谱(HPLC-ESI/MSn)定量检测植物组织中微量 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)含量的方法. 植物生理学通讯, 44 (4): 754~758
- Arshad M, Saleem M, Hussain S (2007). Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. Trends Biotechnol, 25 (8): 356~362
- Boller T, Hener RC, Kende H (1979). Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Planta, 145 (3): 293~303
- Coleman LW, Hodges CF (1986). The effect of methionine on ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid production by *Bipolaris sorokiniana*. Phytopathology, 76 (9): 851~855
- Frankenberger WT, Phelan PJ (1985). Ethylene biosynthesis in soil: I. Method of assay in conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. Soil Sci Soc Am J, 49 (11): 1416~1422
- Fukuda H, Ogawa T, Tanase S (1993). Ethylene production by microorganisms. Adv Microb Physiol, 35 (2): 275~306
- Glick BR, Jacobson CB, Schwarze MMK, Pasternak JJ (1994). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GRI2-2 do not stimulate canola root elongation. Can J Microbiol, 40 (11): 911~915
- Hall KC, Pearce DME, Jackson MB (1989). A simplified method for determining 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plant tissues using a mass selective detector. Plant Growth Regul, 8 (2): 297~307
- Jia YJ, Ito H, Matsui H, Honma M (2000). 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase induced by ACC synthesized and accumulated in *Penicillium citrinum* intracellular spaces. Biosci Biotechnol Biochem, 64 (2): 299~305
- Kazmierczak A, Kazmierczak JM (2007). The level of endogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in gametophytes of *Anemia phyllitidis* is increased during GA₃-induced antheridia formation. Acta Physiol Plant, 29 (2): 211~216
- Khalid A, Akhtar MH, Makhmood MH, Arshad M (2006). Effect of substrate-dependent microbial produced ethylene on plant growth. Mikrobiologija, 75 (2): 277~283
- Li J, Ovaskim DH, Charles TC, Glick BR (2000). An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. Curr Microbiol, 41 (2): 101~105
- Ohga S (1998). Carbon dioxide and ethylene levels during incubation and fruiting stages on sawdust-based culture of *Lentinula edodes*. Bull Kyushu Univ For, 79 (1): 13~20
- Petritis K, Dourtoglou V, Elfakir C, Dreux M (2000). Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and its structural analogue by liquid chromatography and ion spray tandem mass spectrometry. J Chromatogr A, 896 (1-2): 335~341
- Smets R, Claes V, Van Onckelen HA, Prinsen E (2003). Extraction and quantitative analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant tissue by gas chromatography coupled to mass spectrometry. J Chromatogr A, 993 (1-2): 79~87
- Turner EM, Wright M, Ward T, Osborne DJ, Self R (1975). Production of ethylene and other volatiles and changes in cellulase and laccase during the life-cycle of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. J Gen Microbiol, 91 (1): 167~176
- Wood DA, Hammond JB (1977). Ethylene production by axenic fruiting cultures of *Agaricus bisporus*. Appl Environ Microbiol, 34 (2): 228~229
- Yang FY, Hoffman NE (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu Rev Plant Physiol, 35 (1): 155~189