

用氨基酸分析仪测定棉花幼苗叶片中的还原型谷胱甘肽含量

曹让^{1,2}, 张林生¹, 张旺锋², 梁宗锁^{1,*}

¹西北农林科技大学生命科学学院, 陕西杨凌 712100; ²石河子大学新疆兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆石河子 832003

Determination of Reduced Glutathione in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Seedling Leaves by Amino Acid Autoanalyzer

CAO Rang^{1,2}, ZHANG Lin-Sheng¹, ZHANG Wang-Feng², LIANG Zong-Suo^{1,*}

¹College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ²Key Laboratory of Oasis Ecology Agriculture of Xinjiang Bingtuan, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China

摘要:以3%三氯乙酸提取棉花幼苗叶片中还原型谷胱甘肽(GSH),在2.8 mm×80 mm色谱柱、柱温54℃、缓冲液流速10 mL·h⁻¹、茚三酮溶液流速5 mL·h⁻¹、波长570 nm的条件下,用Beckman 121 MB型氨基酸自动分析仪测定含量为40~500 μmol·L⁻¹的GSH,与色谱峰面积呈良好的线性关系,GSH回收率为99.5%~100.4%,检出限为4 μmol·L⁻¹,测定结果的相对标准偏差为0.51%~1.05%。

关键词:还原型谷胱甘肽;棉花;氨基酸自动分析仪

在植物细胞中,还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)是一种重要的抗氧化物质,对维持活性氧的平衡有作用。在水分胁迫下,GSH含量下降,而氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)含量增加,二者呈负相关;由于GSSG水平与膜脂过氧化及溶质泄漏水平呈正相关,因此可用作表示氧化胁迫的指标(孙群和胡景江 2005; Aina等 2007);此外,GSH也与植物忍耐重金属毒害有关系(Kuzniak和Sklodowska 2001);外源GSH还有促进小麦细胞分化的作用(廖祥儒等 2002),并可调节植物木质化过程中的酶活性和组织的木质化进程(刘尊英和姜微波 2005)。

常用的测定生物样品中GSH方法有分光光度法、荧光光度法、高效毛细管电泳法和高效液相色谱法。分光光度法简单易行,所用仪器较简单而常为人们采用,但在检测中如果某些组织样品量太少,其应用即受到限制(任春兰等 2003);高效毛细管电泳法和高效液相色谱法的检测范围在紫外区,受溶剂的影响较大(刘约权 1998)。本文根据阳离子交换树脂分离GSH效果好、定量准确、速度快的特点,可以避免上述缺点。按照被分离GSH中氨基在弱酸性溶液中与茚三酮反应生成的蓝紫色化合物在波长570 nm处有最大吸收峰的原理(宋治军和纪重光 1994),可以用于GSH的定性

定量分析。本文以棉花幼苗为试材,用氨基酸分析仪测定了GSH,效果较好。

材料与方法

1 材料

棉花(*Gossypium hirsutum* L.)品种为‘新陆早24’(cv. ‘Xinluzao 24’),幼苗完全展开的2片真叶用于测定GSH。

2 试剂

GSH购自Sigma公司,配制成1 mmol·L⁻¹。氨基酸自动分析仪的流动相用柠檬酸钠(AR)、氯化钠(AR)、盐酸(GR)、苯酚(AR)和重蒸水配制成pH 3.20的缓冲液(其中柠檬酸三钠为0.07 mol·L⁻¹,氯化钠为0.20 mol·L⁻¹,盐酸为0.14 mol·L⁻¹,苯酚为0.1%)。显色剂为酸性茚三酮溶液(其中醋酸锂为1.00 mol·L⁻¹,醋酸为0.22 mol·L⁻¹,二甲基亚砷为10.56 mol·L⁻¹,水合茚三酮为0.11 mol·L⁻¹)。再生液为0.2 mol·L⁻¹ NaOH。

3 仪器

仪器为美国贝克曼公司制造的Beckman 121

收稿 2007-06-08 修定 2007-07-05

资助 教育部西部高等农林院校博士生访学基金(01082005)、国家自然科学基金(90302005)、教育部新世纪优秀人才支持计划(200527)。

* 通讯作者(E-mail: liangzs@ms.iswc.cn)。

MB型氨基酸自动分析仪。色谱条件: 色谱柱为2.8 mm×80 mm, 树脂为Beckman 121 MB型氨基酸自动分析仪AA10型专用树脂, 柱温为54℃, 缓冲液流速为10 mL·h⁻¹, 茚三酮溶液流速为5 mL·h⁻¹, 检测波长为570 nm, 进样量为50 μL。

4 样品的提取

从培养的棉花苗床中取棉花幼苗的顶部2片展开叶40 g左右, 带上乳胶手套用剪刀剪成约0.5 cm×0.5 cm的小方片, 每个重复精确量取2.0000 g剪碎的叶片于预冷的研钵中, 加入含有3% 三氯乙酸的柠檬酸缓冲液(pH 2.20, 其中柠檬酸三钠为0.07 mol·L⁻¹, 盐酸为0.20 mol·L⁻¹, 苯酚为0.1%), 在冰浴中研磨提取(孙群和胡景江2005), 用中速定量滤纸过滤并定容至25 mL。取此滤液12.5 mL置于25 mL容量瓶中, 用10% 柠檬酸钠溶液(约3 mL)调pH至2.20, 并定容。取5 mL于4℃条件下以12000×g离心15 min, 上清液用于氨基酸自动分析仪的测定(宋治军和纪重光1994)。

结果与讨论

1 GSH的定性分析

用Beckman 121 MB型氨基酸自动分析仪分析除天门冬酰氨和谷酰氨以外的18种氨基酸, 以不连续的pH值梯度缓冲液为流动相, 以pH 3.28、3.90和5.26的柠檬酸缓冲液分别洗脱出酸性氨基酸(天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸)、中性氨基酸(蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)和碱性氨基酸(色氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸), 与茚三酮溶液混合显色后, 用比色法进行定性和定量分析。在此条件下分析混合有GSH的18种氨基酸, 由于GSH和天门冬氨酸合为一个峰, 所以分离GSH和天门冬氨酸应改变流动相的pH值, 或者改变流动相的流速并提高色谱柱温度。两者之中以改变流动相的pH值较为简便, 且对仪器伤害最小。故本文在反复实验的基础上, 以pH 3.20的柠檬酸缓冲液为流动相洗脱含有GSH的样品。由于洗脱液的pH值下降, 以致苏氨酸和丝氨酸、甘氨酸和丙氨酸分离度减小, 胱氨酸和缬氨酸合为一个色谱峰, 但对中性

氨基酸和碱性氨基酸的分离无影响。所以本文所设计的分析程序只分析了GSH、天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸和脯氨酸, 而其他氨基酸均为再生液洗脱除去; 另一种分析程序为只分析GSH, 其分析时间还可进一步缩短。分析时注入50 μL 100 μmol·L⁻¹ GSH标准溶液, 结果(图1-a)表明能很好分离GSH, 其保留时间为18.4 min, 峰型完整, 与其他氨基酸的峰型相同。

一种方法则是将GSH加入到含有18种标准氨基酸的混合溶液中, 在同样分离条件下分析的结果(图1-b)表明, GSH与其他氨基酸可以完全分离。与此同时, 另将GSH加入到棉花叶片提取溶液中, 结果(图1-c)是GSH的出峰时间仍为18.4 min。这些说明氨基酸自动分析仪能很好地分离棉花幼苗叶片中的GSH。

2 GSH的保留时间和峰面积的重复性

用GSH的标准溶液和棉花幼苗提取液分别以50 μL进样分析5次, 测定保留时间、峰面积值的重复性, 并计算其相对标准偏差的结果(表1)表明, GSH的保留时间、峰面积值的相对标准偏差分别为0.46%、0.38%和1.05%、0.51%, 明显小于仪器规定的1%和3%指标要求, 说明GSH的出峰位置和峰面积都有很好的重复性。

3 GSH的回收率

将标准GSH液(1 mmol·L⁻¹)精确稀释至160 μmol·L⁻¹, 置于250 mL容量瓶中, 摇匀; 再精确吸取棉花幼苗叶片提取液(其GSH含量见表2)12.5 mL共5份, 置于25 mL容量瓶中, 加入160 μmol·L⁻¹ GSH标准液12.5 mL组成混合样, 于上述色谱条件下测定GSH含量, 根据理论值和测定值计算回收率(%). 用本法测得的GSH回收率为99.5%~100.4% (表2), 表明回收效果非常好。

4 标准曲线和最小检测值

将GSH标准溶液(浓度为1 mmol·L⁻¹)稀释成系列溶液, 即40、80、160、240、320、400和500 μmol·L⁻¹溶液后分置于10 mL容量瓶中, 取各溶液分别进样3次, 每次50 μL, 以GSH的浓度(μmol·L⁻¹)为横坐标(x), 峰面积为纵坐标(y), 进行回归分析, 得到线性方程: $y=4.7957x+65.326$, $R^2=0.9983$ 。从工作曲线的形状和线性相关系数的数值可以看出, GSH浓度在40~500 μmol·L⁻¹内符

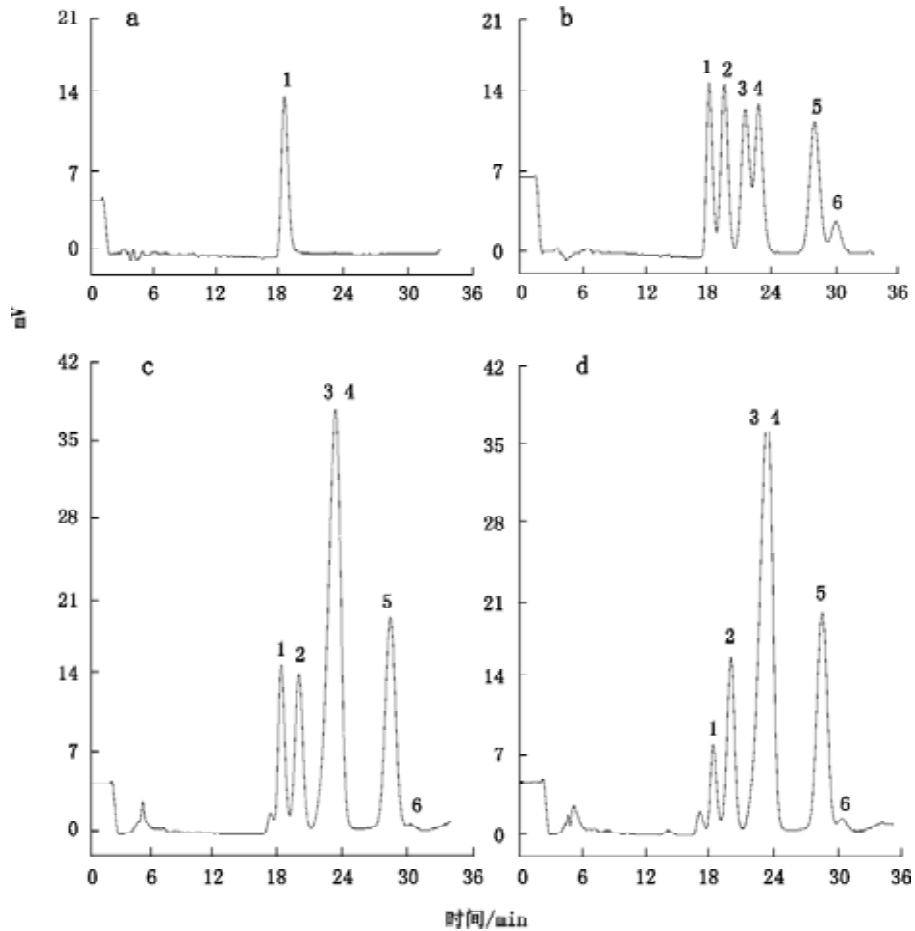


图1 氨基酸分析仪分离 GSH 的图谱

a: 单个标准 GSH。1: GSH 保留时间为 18.40 min。b: 标准 GSH 加入其他氨基酸。1: GSH 保留时间为 18.40 min; 2: 天门冬氨酸保留时间为 20.31 min; 3: 苏氨酸保留时间为 22.23 min; 4: 丝氨酸保留时间为 23.42 min; 5: 谷氨酸保留时间为 28.37 min; 6: 脯氨酸保留时间为 30.12 min。c: 加有标准 GSH 的棉花叶片提取液。1: GSH 保留时间为 18.40 min; 2: 天门冬氨酸保留时间为 20.32 min; 3、4: 苏氨酸和丝氨酸浓度太高而合为一个峰, 保留时间为 23.31 min; 5: 谷氨酸保留时间为 28.36 min; 6: 脯氨酸保留时间为 30.13 min。d: 棉花叶片提取液中的 GSH。1: GSH 保留时间为 18.40 min; 2: 天门冬氨酸保留时间为 20.32 min; 3、4: 苏氨酸和丝氨酸浓度太高而合为一个峰, 保留时间为 23.32 min; 5: 谷氨酸保留时间为 28.37 min; 6: 脯氨酸保留时间为 30.13 min。

表1 标准和样品的 GSH 保留时间与峰面积的变化

样品重复号	标准保留时间/min	样品保留时间/min	样品峰面积/mV·s	标准峰面积/mV·s
1	18.3	18.4	736.771	1195.342
2	18.4	18.5	741.873	1187.151
3	18.4	18.4	714.318	1199.777
4	18.5	18.4	750.507	1185.327
5	18.3	18.3	756.187	1188.091
RSD %	0.46	0.38	1.05	0.51

色谱峰面积单位为色谱峰高对电压的响应值(mV)与峰积分时间(s)的乘积(mV·s)。

合线性方程(图2)。

将 GSH 标准液逐级稀释成浓度为: 20、10、

4、2 和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 用上述色谱条件进行测定, 按峰高为噪音 2 倍计算 GSH 的检出限, GSH

表2 GSH的回收率

样品号	样品浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	混合样的GSH浓 度理论值/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	实测的混合样中GSH 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	加入GSH的浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/%
1	85.8	165.8	164.9	80	99.5
2	84.9	164.9	165.2	80	100.2
3	84.7	164.7	165.4	80	100.4
4	85.2	165.2	165.7	80	100.3
5	84.8	164.8	164.3	80	99.7

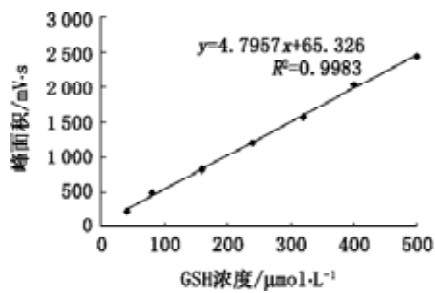


图2 GSH的标准曲线

色谱峰面积单位为色谱峰高对电压的响应值(mV)与峰积分时间(s)的乘积(mV·s)。

的最小检出值为 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

参考文献

廖祥儒, 刘小丽, 陈彤, 袁京云, 李业英, 王俊丽, 杜建芳(2002). 谷

胱甘肽对小麦幼穗胚性愈伤组织形成以及几种相关酶活性的影响. 植物生理学通讯, 38 (4): 327~329

刘约权主编(1998). 现代分析仪器. 北京: 中国农业出版社, 303

刘尊英, 姜微波(2005). 谷胱甘肽对采后石刁柏木质化和食用品质的影响. 植物生理学通讯, 41 (3): 305~308

任春兰, 陆建峰, 白洁(2003). 还原型谷胱甘肽微量测定法的研究. 卫生毒理学杂志, 17 (4): 245~246

宋治军, 纪重光主编(1994). 现代分析仪器与测试方法. 西安: 西北大学出版社, 22

孙群, 胡景江主编(2005). 植物生理学研究技术. 陕西杨凌: 西北农林科技大学出版社, 170

Aina R, Labra M, Fumagalli P, Vannini C, Marsoni M, Cucchi U, Bracale M, Sgorbati S, Cittero S (2007). Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. Environ Exp Bot, 59: 381~392

Kuzniak E, Sklodowska M (2001). Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. Plant Sci, 160: 723~731