

脯氨酸测定方法的改进

职明星* 李秀菊

河南科技学院农业生物工程研究所, 河南新乡 453003

Improvement on the Method for Measuring Proline Content

ZHI Ming-Xing*, LI Xiu-Ju

Agricultural Biotechnology Institute, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China

摘要 25 mg·mL⁻¹的酸性茚三酮溶液至少可以保存35 d, 它与同体积脯氨酸充分反应的最大浓度为156 μg·mL⁻¹, 当样品提取液的浓度大于100 μg·mL⁻¹时, 需适当稀释。酸性茚三酮与脯氨酸充分显色的时间至少30 min 沸水浴。

关键词 脯氨酸; 酸性茚三酮; 测定方法

测定植物脯氨酸含量一般多采用酸性茚三酮显色法。已有文献表明, 酸性茚三酮在4℃低温避光处可以稳定保存1~3 d^[1~10], 因此需随用随配, 很不方便。另外, 不同实验指导书中测定的样品提取液和酸性茚三酮在沸水浴中加热时间也不一样。通常认为, 当脯氨酸的含量在10 μg·mL⁻¹以下, 同时显色液中茚三酮的浓度要达到10 mg·mL⁻¹时才能保证脯氨酸充分反应^[11]。为此, 我们对酸性茚三酮显色测定脯氨酸的方法作了一些改进。

实验方法

1 溶液的配制与保存

配制25 mg·mL⁻¹酸性茚三酮溶液时, 称取茚三酮5.0 g, 放入500 mL的烧杯中, 加入120 mL的冰醋酸和80 mL的6 mol·L⁻¹磷酸, 于70℃的水浴锅中加热溶解。

配制脯氨酸标定溶液时, 称取0.050 g脯氨酸, 配成100 μg·mL⁻¹溶液500 mL。取部分溶液稀释1倍, 得到50 μg·mL⁻¹的脯氨酸溶液。

2 显色时间的测定

分别取浓度为50和100 μg·mL⁻¹的脯氨酸溶液各2 mL, 放入50 mL的试管中。再加25 mg·mL⁻¹酸性茚三酮2 mL和冰醋酸2 mL, 混匀后放入水浴锅中煮沸, 每隔5 min后重复1次, 共计10组。最后一组试管煮沸5 min后, 取出全部试管, 在常温下冷却后加20 mL的甲苯, 充分振荡萃取静置后, 用756分光光度计测定520 nm(最大吸收峰)处的光密度。重复4次。

根据脯氨酸与酸性茚三酮反应产物与其含量的多少成正比的关系, 从煮沸时间最短的开始, 对两种不同浓度溶液(50和100 μg·mL⁻¹的脯氨酸)反应生成物的测定值(OD值)进行连续的相关分析, 以检验结果的可靠性。

3 脯氨酸溶液与同体积25 mg·mL⁻¹的酸性茚三酮充分反应的最大浓度的测定

取4 mL的20 000 μg·mL⁻¹脯氨酸溶液, 用2倍稀释法依次稀释至浓度为2.44 μg·mL⁻¹, 再分别加入2 mL的25 mg·mL⁻¹酸性茚三酮和2 mL冰醋酸混匀, 然后放入水浴锅中煮沸30 min充分显色。取出冷却后加入20 mL甲苯萃取。用756分光光度计测定520 nm处的光密度。重复4次。

确定脯氨酸最大浓度时, 先根据测定值做出脯氨酸和OD值关系的实测图。从理论上讲, OD值的大小和脯氨酸含量应该在一定的范围内成直线关系, 当脯氨酸含量很高时, 茚三酮反应完毕, 反应曲线会变成一条与X轴平行的直线, 即OD达到一个稳定值, 最大值就是在该稳定点对应的脯氨酸含量。用SPSS统计软件, 做出线性回归模拟直线方程, 但是并不能找到该稳定值。因为该反应属于有机反应, 当茚三酮含量低于一定值时, 并不能按固定的比例进行反应, 所以最大值应在实测值近似直线段。为了准确找到这一最大值, 我们依据试验设计时脯氨酸含量呈二倍

收稿 2004-11-11 修定 2005-03-14

资助 河南省高校创新人才培养工程项目(2001513)。

*E-mail: sxhzm@hist.edu.cn, Tel: 0373-3040483

法增加, OD 值相应也呈二倍关系, 做出 OD 值之间的倍数关系, 并计算其与 2 之间的差异显著性。另外, 计算每递增一组脯氨酸和 OD 值的相关系数, 验证浓度的最大值。

4 酸性茛三酮溶液保存时间的测定

按照上述方法每隔 5 d 配制 25 mg·mL⁻¹ 200 mL 的酸性茛三酮溶液, 并将其均分到 100 mL 的试剂瓶中, 分别放在 4 和 -20℃ 的冰箱中待用。连续配置 8 次, 最后一次配制后的第 2 天进行测定。

从每次配制的 25 mg·mL⁻¹ 酸性茛三酮溶液中各取 2 mL 加到 50 mL 的试管中, 分两组, 再分别加入 2 mL 冰醋酸+2 mL 的 50 μg·mL⁻¹ 脯氨酸溶液和 2 mL 冰醋酸+2 mL 的 100 μg·mL⁻¹ 脯氨酸溶液, 混匀后放入水浴锅中煮沸 30 min 充分显色。取出冷却后, 加 20 mL 甲苯, 充分振荡萃取。用 756 分光光度计测定 520 nm 处的光密度变化。

实验结果

1 显色时间对测定结果的影响

由图 1 可知, 在沸水浴煮沸的初期, 50 和 100 μg·mL⁻¹ 的脯氨酸溶液的 OD 值均随显色时间的增加而逐渐增大, 30 min 左右达到相对稳定的值, 说明测定脯氨酸的显色时间达到 30 min 以上即可。两个溶液的相关系数均大于 0.99, 说明两者的变化趋势相似。这与张殿忠等^[11]的结果基本相似。

2 酸性茛三酮与脯氨酸反应的关系

现有的实验指导书中, 制作标准曲线设定的脯氨酸浓度一般为 6~25 μg·mL⁻¹, 这一浓度范围内的 OD 值依然较低^[11], 而且都没有明确指出 25 mg·mL⁻¹ 的酸性茛三酮溶液与同体积的脯氨酸充分反应的最大浓度是多少。一般来说, 随着脯氨酸

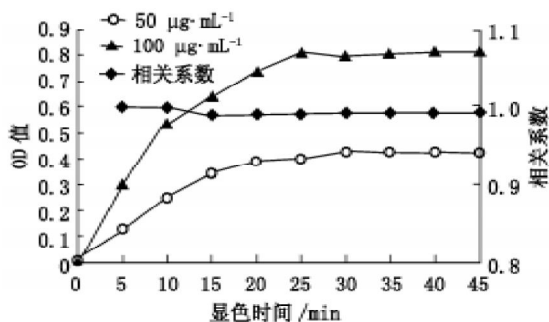


图1 显色时间与OD值的关系

浓度的增大, 反应产物也应同比例增大, 脯氨酸浓度达到最大值后, 反应产物即由于茛三酮不足而无法继续生成红色产物, 以致红色产物的 OD 值不再随脯氨酸浓度的增加而等比例增大。我们按照浓度加倍法依次从低浓度到高浓度增加脯氨酸含量, 分别与同体积的 25 mg·mL⁻¹ 的酸性茛三酮溶液反应, 测定反应产物的 OD 值时, 发现脯氨酸的浓度小于 156.25 μg·mL⁻¹ 时, 脯氨酸的浓度增大 1 倍, OD 值也增大 1 倍, 相关系数均在 0.99 以上(表 1)。可见, 脯氨酸的浓度在 156.25 μg·mL⁻¹ 以下时, 同体积的 25 mg·mL⁻¹ 酸性茛三酮可与之充分反应。

3 酸性茛三酮溶液保存时间与贮藏温度的关系

由图 2 可见, 在 4 和 -20℃ 暗条件下保存 0~35 d 的酸性茛三酮溶液, 均能与同体积浓度分别为 50 和 100 μg·mL⁻¹ 的脯氨酸溶液充分反应后的 OD 值之间保持一个稳定值, 而且浓度为 100 μg·mL⁻¹ 脯氨酸的 OD 值是浓度为 50 μg·mL⁻¹ 脯氨酸的 OD 值的 2 倍。这说明在 -20 和 4℃ 暗条件下的酸性茛三酮至少可以保存 35 d。这比现有方法中采用 4℃ 下暗条件保存 2~3 d 延长了 30 d^[1,2], 这样测定更加准确和方便。另外, -20 和 4℃ 的

表1 不同浓度脯氨酸及其与同体积25 mg·mL⁻¹的酸性茛三酮反应产物的 OD 值的关系

脯氨酸溶液浓度/μg·mL ⁻¹	OD ₅₂₀	OD值2n/n	相关系数
0	0		
2.44	0.018		1
4.88	0.036	2.042	0.999
9.77	0.073	2.008	0.999
19.53	0.149	2.045	0.998
39.06	0.311	2.093	0.999
78.13	0.642	2.066	0.999
156.25	1.260	1.963	0.999
312.50	2.250	1.786**	0.998
625.00	3.720	1.653**	0.993
1250.00	6.075	1.633**	0.989
2500.00	8.820	1.452**	0.976
5000.00	10.890	1.235**	0.941
10000.00	10.740	0.986**	0.849
20000.00	10.758	1.002**	0.758

OD₅₂₀ 值为 4 次重复的平均值; OD 值 2n/n 为两个相邻浓度脯氨酸显色产物的 OD 值的比值, 其理论值为 2。

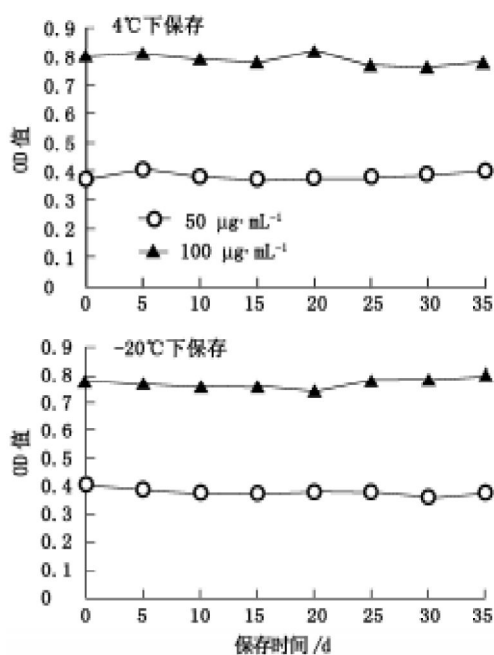


图2 酸性茚三酮保存时间与贮藏温度对OD值的影响

贮藏条件对试剂没有明显的影响。

讨 论

由于我们的实验仅做到保存35 d, 此后是否还可以继续使用尚需进一步探讨。但一般情况下, 用脯氨酸测定抗逆性的实验, 1个月时间就能满足实验要求。

为了更准确测定脯氨酸含量, 保证反应液中有充足的酸性茚三酮, 当样品提取液中脯氨酸浓度大于100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 建议样品提取液作适当稀释后测定。如果产物中出现悬浮物时, 应考虑样

品提取液的稀释或者增加甲苯的使用量。但增加甲苯使用量时需要增加萃取时间和振荡次数, 而且这也仅局限于呈现极少量悬浮物时。反之, 如果样品提取液中脯氨酸含量较低和产物较少时, 要适当减少甲苯的使用量, 使测得的OD值尽可能保持在理想的范围内。

此外, 所用试剂中的脯氨酸为白色结晶或者白色结晶性粉末, 茚三酮为白色或浅黄结晶性粉末。如果出现结块或变色时, 应注意其质量问题。

参考文献

- 徐晓峰, 朱才. 小麦叶中脯氨酸测定方法的研究. 生物技术, 1997, (1): 40~42
- 刘友良. 植物水分逆境生理. 北京: 农业出版社, 1992. 84~89
- 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 303
- 邹琦. 植物生理生化实验指导. 北京: 中国农业出版社, 1995. 96~97
- 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000. 258~260
- 张志良. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1990. 259~260
- 白宝璋. 植物生理学测试技术. 北京: 中国科学技术出版社, 1993. 156~157
- 汪沛洪. 基础生物化学实验指导. 西安: 陕西科学技术出版社, 1986. 55~56
- 王韶唐. 植物生理学实验指导. 西安: 陕西科学技术出版社, 1987. 148~149
- 龚富生, 张嘉宝. 植物生理学实验. 北京: 气象出版社, 1995. 256~259
- 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法. 植物生理学通讯, 1990, (4): 62~65