

技术与方法 Techniques and Methods

白桦悬浮细胞S-亚硝基硫醇比色和荧光测定方法的初步优化

黄雅婷, 菅端, 詹亚光, 范桂枝*

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

摘要: 本文建立了白桦(*Betula platyphylla*)悬浮细胞中S-亚硝基硫醇含量分析的比色法及荧光检测法。其中, 比色法采用偶氮化反应; 荧光检测法以2,3-二氨基萘(DAN)为探针。比色法结果表明, 供试样品在10~35 min内显色稳定性良好, 重复性高[S-亚硝基硫醇浓度=(7.54±0.11) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $n=6$], 加样回收率为(101.91±2.75)% ($n=4$); 荧光法结果表明, DAN染色时间和染色浓度均影响白桦悬浮细胞的荧光强度, 其中染色时间为2~4 h和染色浓度在400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细胞荧光强度值最大。由上述结果可知, 比色法测定白桦悬浮细胞中S-亚硝基硫醇含量重复性好, 准确性高, 而荧光检测法直观性强, 建议将两方法结合使用分析白桦等植物细胞中S-亚硝基硫醇含量。

关键词: S-亚硝基硫醇; 比色法; 荧光法; 白桦悬浮细胞

S-亚硝基硫醇(S-nitrosothiols, RSNO)是Stamler (1994)首先提出的一种一氧化氮(NO)与蛋白质半胱氨酸残基中的巯基共价结合的蛋白质亚硝基化修饰产物, 通过调控蛋白质结构、稳定性、细胞定位、蛋白质-蛋白质相互作用等在生物体内发挥重要作用(He等2012), 如调控次生代谢产物的合成(Zheng等2011)、参与应激反应(Ziogas等2013; Begara-Morales等2013; Tanou等2014; Yang等2015)、改变植物的代谢途径(Gong等2015)等, 从而得以广泛发挥NO的生物活性, 是NO的贮存池和运输器。研究发现, RSNO参与NO生物活性作用时存在浓度效应, 如高浓度RSNO激发了依赖NO的细胞死亡信号通路(de Pinto等2013)并介导了NO调节植物抗氧化胁迫应激(Yang等2015); 低浓度RSNO可促进桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)中多酚的累积(Zheng等2011)。因此, RSNO的准确定量在RSNO与NO的代谢关系、RSNO对各种生理生化作用的量化及其在其他生物学效应等研究中具有重要意义。为此, 优化测定RSNO含量的方法是一个亟需解决的关键问题。

许多研究者总结了RSNO的测定方法, 对比色法、荧光法、免疫组织化法和高效液相色谱法等进行了对比分析, 发现比色法和荧光法是其中较为简单、快速且廉价的测定方法, 适用于生物材料的测定(王成彬等2000; 陈晨等2010; Devarie-Baez等2013; Diers等2014)。目前建立的测定RSNO含量的比色法及荧光法都是使用化学合成的RSNO而非从动植物中提取获得(Saville 1958; Cook等1996), 但近年来研究者多采用Saville (1958)建立的比色法

直接用于草本植物中RSNO含量的测定(de Pinto等2013; Frungillo等2013; Gong等2015), 而以木本植物为实验材料测定RSNO含量的报道较少(Tanou等2014), 采用荧光法测定RSNO含量报道也较少。为此, 本实验以木本植物白桦悬浮细胞为实验材料, 期望优化白桦悬浮细胞中RSNO含量分析的比色法及荧光法, 为白桦中NO信号转导研究提供参考。

材料与方法

1 实验材料

1.1 白桦悬浮细胞的培养

白桦(*Betula platyphylla* Suk.)母树取自东北林业大学白桦强化种子园5~7年生嫁接优树(接穗30年生), 白桦优树由笔者之一的东北林业大学生命科学学院詹亚光教授鉴定, 取白桦母树诱导的组培苗的茎诱导获取白桦悬浮细胞, 将其接种于B₅液体培养基中, 附加0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)+0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯基噻二唑脲(thidiazuron, TDZ), 蔗糖浓度为20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH为5.5~6.0。100 mL摇瓶中盛有50 mL培养液, 每瓶接种6 g (FW, 下同)悬浮细胞, 每隔7 d继代1次, 培养温度为25~27°C, 光照强度为150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照16 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$, 摇床转速为130 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 获得白桦悬浮细胞系。

1.2 硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)处理

将NO供体SNP溶液添加到白桦悬浮培养体系

收稿 2016-04-01 修定 2016-06-24

资助 国家自然科学基金(31100445)和中央高校基本科研业务专项资金(2572015DY02)。

* 通讯作者(E-mail: gzf325@126.com)。

(100 mL培养基含20 g悬浮细胞)中,使SNP终浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,1 h后测定RSNO含量,每个处理样品3次重复。

2 比色法测定RSNO含量的优化

2.1 标准曲线的绘制

精密称取亚硝酸钠用去离子水溶解,分别吸取2 mL稀释为0、4.69、9.38、18.75、37.5、75、150和 $300\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准液,加入1 mL试剂I [1% (m/V)溶于 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸的对氨基苯磺酸溶液] 40°C 水浴避光反应5 min,再加入1 mL试剂II [0.02% (m/V)溶于去离子水的N-(1-萘基)乙二胺二盐酸盐溶液] 40°C 水浴避光反应5 min,于540 nm波长处测吸光值。以吸光值(y)为纵坐标,亚硝酸根浓度(x)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程: $y=0.0090x-0.0298$ ($R^2=0.9986$),线性范围4.69~ $300\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 RSNO的提取和测定

称取4 g SNP处理后的白桦悬浮细胞于研钵中,加入6 mL $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.2的Tris-HCl缓冲液,在冰上充分研磨, 4°C $10\ 000\times g$ 离心15 min,分别取2 mL上清液于两个离心管中,实验组加1 mL试剂III [1% (m/V)及0.2% (m/V)溶于 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸的对氨基苯磺酸及 HgCl_2 溶液] 40°C 水浴避光反应5 min;对照组加入1 mL试剂I 40°C 水浴避光反应5 min,实验组和对照组再同时加入1 mL试剂II 40°C 水浴避光反应5 min,于540 nm波长处测定产物吸光值。

结果计算: $\text{RSNO浓度}(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})=(\text{实验组吸光值}-\text{对照组吸光值})\times\text{标准曲线系数}$ 。

2.3 显色稳定性实验

分别取 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硝酸钠标准液及RSNO提取液,按第2.2节所述每隔5 min测定一次吸光值,连续测定60 min,重复3次,考察标准品及供试样品显色稳定性。

2.4 重复性实验

将SNP处理后的白桦悬浮细胞均分成6份,每份4 g,按第2.2节所述提取和测定,计算RSNO浓度、标准差(standard deviation, SD)及相对标准差(relative standard deviation, RSD)。

2.5 加样回收率实验

将SNP处理后的白桦悬浮细胞均分成6份,每份精密称取4 g,分别精密加入稀释5倍后的 $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硝酸钠溶液,按第2.2节所述提取和测定,计算RSNO回收率及SD值。

2.6 SNP处理后白桦悬浮细胞RSNO浓度测定

按照第2.2节所述进行提取,显色反应后静置10~35 min,测定并计算RSNO浓度。

3 荧光法测定RSNO含量的优化

3.1 荧光密度的测定

RSNO在金属离子(Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 等)作用下释放NO所形成的 NO_x 在中性溶剂中与2,3-二氨基萘(2,3-diaminonaphthalene, DAN)可发生硝基化反应生成荧光化合物2,3-二萘基三唑(2,3-naphthotriazole, DAT), DAT荧光强弱反映了RSNO含量。

3.2 DAN染色时间的优化

精密称取DAN溶解于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液中(4°C 冰箱放置),每次用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.0磷酸缓冲液稀释到所需浓度。取1 mL处理后的白桦悬浮细胞于离心管中,加入稀释的DAN探针染液使其终浓度为 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,再加入 $3\text{ }\mu\text{L}$ $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuCl_2 ,使其终浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,轻轻混匀,分别避光室温放置0、1、2、4、8、16和24 h,用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.0的磷酸缓冲液清洗细胞表面的荧光探针,利用荧光显微镜激发波长375 nm、发射波长450 nm进行观察拍摄,重复10次,最后用Image-Pro Plus 6.0软件计算荧光强度。

3.3 DAN染色浓度的优化

取1 mL处理后的白桦悬浮细胞于离心管中,加入稀释的DAN探针染液使其终浓度分别为0、200、400和 $600\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,轻轻混匀,避光室温放置2 h,按上述方法清洗观察拍摄,重复10次,最后用Image-Pro Plus 6.0软件计算荧光强度。

3.4 SNP处理后白桦悬浮细胞荧光强度测定

取1 mL处理后的白桦悬浮细胞于试管中,加入DAN探针染液使其终浓度为 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,加入 $3\text{ }\mu\text{L}$ $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuCl_2 ,使其终浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,轻轻混匀,避光室温放置2~4 h,用上述方法清洗观察拍摄,每个处理样品重复10次,最后用Image-Pro Plus 6.0软件计算荧光强度。

实验结果

1 比色法测定RSNO含量的优化

1.1 显色稳定性考察

如图1所示,在0~60 min内,标准品吸光值总体呈逐渐下降趋势,在10~40 min之间较稳定;供试样品显色液吸光值变化呈先上升后下降趋势。其中

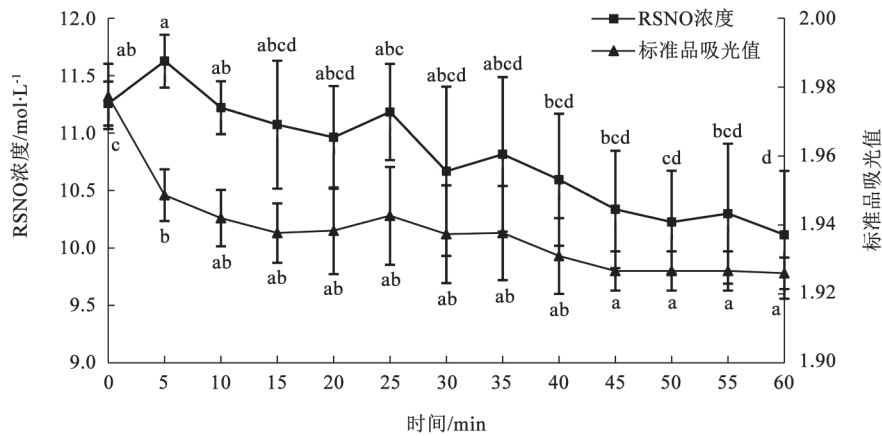


图1 标准品及供试样品显色稳定性实验

Fig.1 Color stability test of standard product and test sample

在10~35 min之间较稳定, 35 min以后总体上继续下降。因此, 供试样品在显色反应后10~35 min内测定吸光值较好。

1.2 重复性实验

将SNP处理后的白桦悬浮细胞平均分成6份, 每份4 g, 每个处理样品重复3次, 分析其偶氮化反应比色的重复性, 结果显示供试样品的RSNO浓度为 $(7.54 \pm 0.11) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{RSD}=1.50\%$, $n=6$) (图2), 上述结果表明供试样品显色液的重复性良好。

1.3 加样回收率实验

如表1所示, 样品回收率为 $(101.91 \pm 2.75)\%$ ($n=4$), 表明供试样品显色液的加样回收率良好。

2 荧光法测定RSNO含量的优化

2.1 DAN染色时间的优化

如图3所示, 用 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DAN探针染液处理不同时间后发现白桦悬浮细胞荧光强度随时间发生变化, 呈先上升后下降趋势。当处理2~4 h时, 荧光强度值最大, 分别为 235.23 ± 1.67 和 235.49 ± 3.14 。200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DAN染色的1 h内, 可能探针与

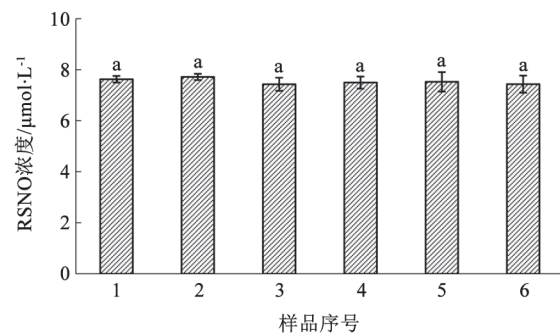


图2 供试样品重复性实验

Fig.2 Repeatability of the test sample

DAT没有充分结合, 2~4 h时结合完全, 荧光强度最大, 随后荧光产物可能不稳定而分解, 使得荧光强度值降低。因此, 2~4 h为最佳染色时间。

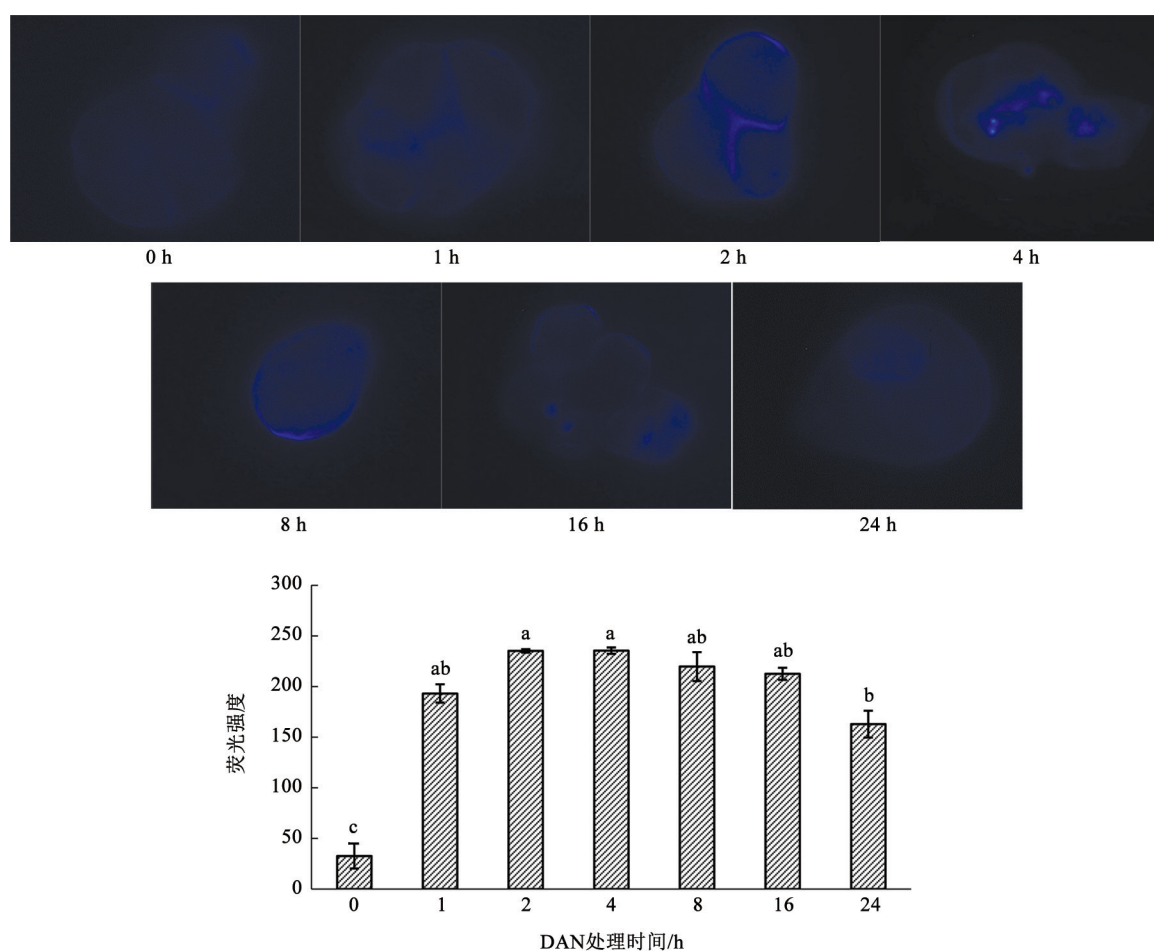
2.2 DAN染色浓度的优化

如图4所示, 不同浓度DAN处理2~4 h后, 荧光强度值随DAN浓度增加而增大, 当浓度为 $600 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 荧光密度值变化不显著。当DAN为400和 $600 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 荧光强度值最高, 分别为

表1 供试样品加样回收率实验

Table 1 Recovery test of the samples

序号	测得样品RSNO含量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	加入亚硝酸根量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	测得加入标品RSNO含量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率/%
1	0.045	0.296	0.340	99.34
2	0.030	0.270	0.313	105.02
3	0.039	0.283	0.322	99.88
4	0.036	0.277	0.323	103.38
平均值	—	—	—	101.91 ± 2.75

图3 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DAN处理不同时间的荧光图及荧光强度Fig.3 Fluorescence images and fluorescence intensity values of birch suspension cells colored with 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DAN for different times

241.71±1.70和242.42±1.78, 可能是因为当DAN浓度为200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时DAN与DAT结合未达到饱和状态, 而当DAN浓度为400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时与DAT结合达到一种饱和的状态, 所以当DAN浓度大于等于400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 荧光强度值没有随着DAN浓度增大而增加, 这表明, 当DAN染色2 h时, DAN最佳染色浓度为400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 SNP处理后白桦悬浮细胞RSNO浓度及荧光强度

如表2所示, 比色法及荧光法测定白桦悬浮细胞中RSNO浓度及荧光强度分别为(7.58±0.25) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和241.54±2.70。

讨 论

Saville (1958)首次利用化学合成的RSNO建立了偶氮法测定RSNO含量的方法, 并提出此法可

表2 SNP处理后白桦悬浮细胞中RSNO浓度及荧光强度

Table 2 Concentration of RSNO and fluorescence intensity value in suspension cells of birch after SNP treatment

测定项目	测定数值
RSNO浓度($n=4$)/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	7.58±0.25
荧光强度($n=10$)	241.54±2.70

用于生物材料中RSNO含量的测定, Cook等(1996)在此基础上考察出利用 Hg^{2+} 在加入显色液15 min后测定吸光值更适合于化学合成RSNO含量的测定, 并提出荧光法中采用300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DAN为探针染色1~2 h后达到最大的荧光强度, 但并没有对探针浓度进行优化, 其实验进一步证实利用比色法和荧光法测定RSNO含量的可行性。由于不同植物种类、不同组织部分和细胞种类在使用比色法

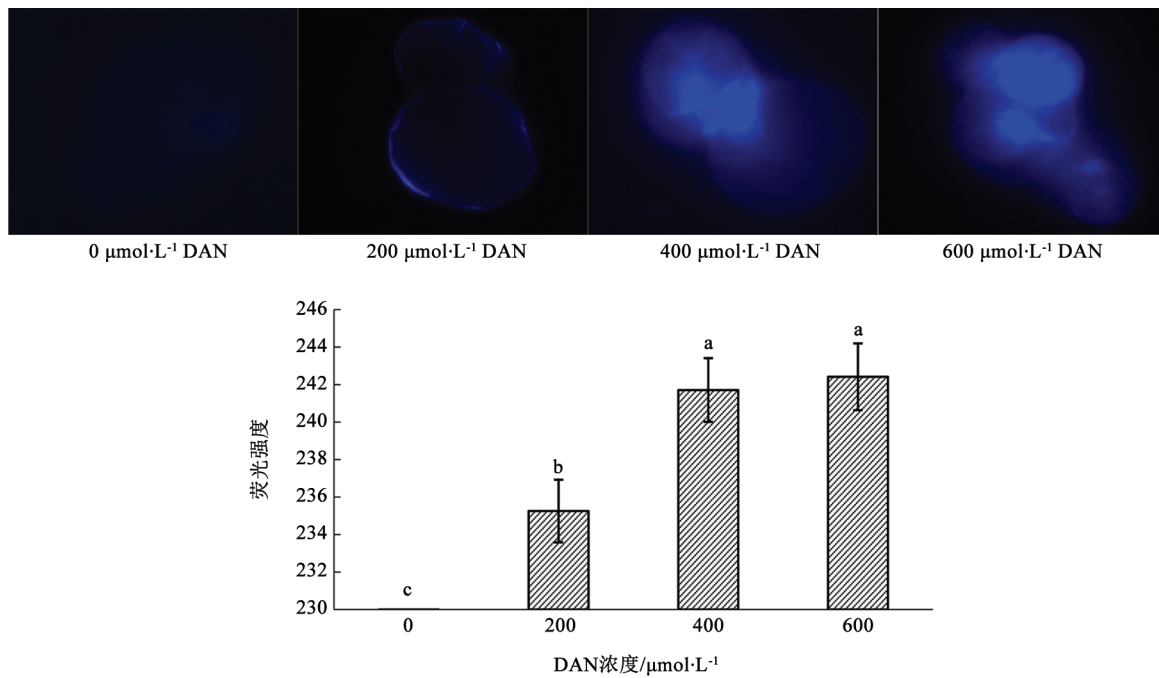


图4 不同浓度DAN处理2 h的荧光图及荧光密度

Fig.4 Fluorescence images and fluorescence intensity values of birch suspension cells colored with different concentrations of DAN for 2 h

和荧光法测定RSNO含量的显色稳定性范围、荧光探针染色浓度和时间上存在差异性,为此本实验以木本植物白桦悬浮细胞为实验材料,分别从比色法的显色稳定性、重复性和加样回收率几个方面进行考察,并对荧光法中探针染色浓度及时间进行优化。比色法结果表明,供试样品在10~35 min内显色稳定性良好,与Cook等(1996)的研究结果中静置15 min后测定相符;与已发表优化方法体系的文章相比,本实验的RSD值(1.50%)在已报道RSD值范围内(<3.68%) (班晓敏2012; 张鹏2012; 刘莉等2014),加样回收率[(101.91±2.75)%]也在已报道加样回收率范围内(82%~107.19%) (李欣和王步军2010; 班晓敏2012),由此可见,比色法可用于白桦悬浮细胞中RSNO含量的测定。荧光法结果表明400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DAN染色2 h时荧光强度值最高,可有效评估RSNO含量,染色浓度及时间均高于Cook等(1996)的研究结果,可能是因为DAN需进入细胞与细胞内RSNO结合,而非直接与样品中RSNO结合。

由于生物体内RSNO含量很低,且受 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 等外界因素的影响,利用药理学等手段提高生物体内RSNO含量可使结果更加准确(Devarie-Baez

等2013),因此本实验用NO供体SNP处理白桦悬浮细胞,发现SNP处理后白桦悬浮细胞中RSNO含量达到(7.58±0.25) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,且重现性仍较好,该结果进一步验证了上述建立的RSNO测定体系。

RSNO是多种蛋白质与NO结合的产物,实现RSNO的定性分析对研究蛋白质亚硝基化功能十分重要,因此利用高效液相色谱法测定RSNO各组分含量是一个亟需解决的问题,目前高效液相色谱法已经实现了对部分RSNO组分的有效测定,如亚硝基谷胱甘肽(*S*-nitrosoglutathione, GSNO) (Nikitovic和Holmgren 1996; van der Vliet等1998; Hogg 1999)、*S*-nitroso-L-cysteine (CysNO) (van der Vliet等1998)、*S*-nitrosohomocysteine (HCysNO) (Hogg 1999)等,笔者也尝试建立利用高效液相色谱法测定RSNO各组分含量,可能由于液相柱子种类不同没有实现,我们还将进一步探究。目前,建议将比色法和荧光法综合分析白桦悬浮细胞中RSNO的含量,二者结合在一起才能使结果更具说服力。

此外,实验中除按说明正确使用荧光显微镜外(朱昊等2011),笔者提出如下建议:(1)选择长势松散的白桦悬浮细胞为实验材料,照相时选取单

个或无重叠的细胞或细胞团进行拍照, 减少实验误差; (2)加入探针后避光放置, 以防荧光淬灭; (3)拍照前, 用磷酸缓冲液充分清洗细胞表面探针, 以防背景太高而影响拍摄及实验结果。

参考文献

- Ban X (2012). Optimization and application of high performance liquid chromatography detection methods for AFB₁, OTA, DON (Master's thesis). Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract) [班晓敏(2012). AFB₁、OTA、DON高效液相色谱检测方法的优化和应用(硕士论文). 南京: 南京农业大学]
- Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M, Valderrama R, Mata-Pérez C, López-Jaramillo J, Padilla MN, Carreras A, Corpas FJ, Barroso JB (2013). Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *J Exp Bot*, 65 (2): 527–538
- Chen C, Shen X, Chu CC, Wang YQ (2010). Progress in research techniques of protein S-nitrosylation and its role in plant disease resistance. *China Biotechnol*, 30 (2): 127–133 (in Chinese with English abstract) [陈晨, 沈昕, 储成才, 王义琴(2010). 蛋白亚硝基化研究进展及其在植物抗病中的作用. *中国生物工程杂志*, 30 (2): 127–133]
- Cook JA, Kim SY, Teague D, Krishna MC, Pacelli R, Mitchell JB, Vodovotz Y, Nims RW, Christodoulou D, Miles AM, et al (1996). Convenient colorimetric and fluorometric assays for S-nitrosothiols. *Anal Biochem*, 238 (2): 150–158
- de Pinto MC, Locato V, Sgobba A, del Carmen Romero-Puertas M, Gadaleta C, Delledonne M, De Gara L (2013). S-nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signaling in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol*, 163 (4): 1766–1775
- Devarie-Baez NO, Zhang D, Li S, Whorton AR, Xian M (2013). Direct methods for detection of protein S-nitrosylation. *Methods*, 62 (2): 171–176
- Diers AR, Keszler A, Hogg N (2014). Detection of S-nitrosothiols. *BBA-Gen Subjects*, 1840 (2): 892–900
- Frunzillo L, de Oliveira JFP, Saviani EE, Oliveira HC, Martínez MC, Salgado I (2013). Modulation of mitochondrial activity by S-nitrosoglutathione reductase in *Arabidopsis thaliana* transgenic cell lines. *BBA-Bioenergetics*, 1827 (3): 239–247
- Gong B, Wen D, Wang X, Wei M, Yang F, Li Y, Shi Q (2015). S-nitrosoglutathione reductase-modulated redox signaling controls sodic alkaline stress responses in *Solanum lycopersicum* L. *Plant Cell Physiol*, 56 (4): 790–802
- He H, Zhan J, He L, Gu M (2012). Nitric oxide signaling in aluminum stress in plants. *Protoplasma*, 249 (3): 483–492
- Hogg N (1999). The kinetics of S-transnitrosation—a reversible second-order reaction. *Anal Biochem*, 272 (2): 257–262
- Li X, Wang BJ (2010). Optimization of two extraction techniques of total flavonoids from tartary buckwheat and HPLC determination based on the two extraction techniques of total flavonoids in tartary buckwheat. *J Food Sci*, 31 (6): 80–85 (in Chinese with English abstract) [李欣, 王步军 (2010). 两种苦荞黄酮提取方法的优化及含量测定. *食品科学*, 31 (6): 80–85]
- Liu L, Qian JX, Xiao FH, Zha YH, Duan CL, Yang SC, Xiao D, Wu LH, Li ZM, Zhang T, et al (2014). Improvement of rapid method to determine polysaccharides contents of *Dendrobium officinale*. *Southwest China J Agric Sci*, 27 (2): 595–600 (in Chinese with English abstract) [刘莉, 钱均祥, 萧凤回, 查应洪, 段承俐, 杨生超, 肖丹, 吴丽华, 李智敏, 张庭, 等(2014). 快速测定石斛多糖含量方法的优化. *西南农业学报*, 27 (2): 595–600]
- Nikitovic D, Holmgren A (1996). S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J Biol Chem*, 271 (32): 19180–19185
- Saville B (1958). A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst*, 83 (993): 670–672
- Stamler JS (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78 (6): 931–936
- Tanou G, Ziogas V, Belghazi M, Christou A, Filippou P, Job D, Fotopoulos V, Molassiotis A (2014). Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant Cell Environ*, 37 (4): 864–885
- van der Vliet A, 't Hoen PAC, Wong PSY, Bast A, Cross CE (1998). Formation of S-nitrosothiols via direct nucleophilic nitrosation of thiols by peroxynitrite with elimination of hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 273 (46): 30255–30262
- Wang C, Tian Y, Shen W (2000). S-nitrosothiols and determination method. *Foreign Med Sci-Sect Clin Biochem Lab Medicine*, 21 (5): 225–227 (in Chinese) [王成彬, 田亚平, 沈文梅(2000). S-亚硝基硫醇及其测定方法. *国外医学: 临床生物化学与检验学分册*, 21 (5): 225–227]
- Yang H, Mu J, Chen L, Feng J, Hu J, Li L, Zhou JM, Zuo J (2015). S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiol*, 167 (4): 1604–1615
- Zhang P (2012). Optimization and application of HPLC detection methods for ZEN, T-2, FB₁ (Master's thesis). Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract) [张鹏(2012). ZEN、T-2、FB₁高效液相色谱检测方法的优化和应用(硕士论文). 南京: 南京农业大学]
- Zheng W, Liu Y, Pan S, Yuan W, Dai Y, Wei J (2011). Involvements of S-nitrosylation and denitrosylation in the production of polyphenols by *Inonotus obliquus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90 (5): 1763–1772
- Zhu H, Guo H, Cao LC, Ren Z, Wang J (2011). Design of fluorescence microscope experiments. *Res Explor Lab*, 30 (11): 128–130 (in Chinese with English abstract) [朱昊, 郭宏, 曹良才, 任舟, 王佳(2011). 荧光显微镜实验的设计. *实验室研究与探索*, 30 (11): 128–130]
- Ziogas V, Tanou G, Filippou P, Diamantidis G, Vasilakakis M, Fotopoulos V, Molassiotis A (2013). Nitrosative responses in citrus plants exposed to six abiotic stress conditions. *Plant Physiol Biochem*, 68: 118–126

Preliminary optimization of colorimetric and fluorometric assays for *S*-nitrosothiols content determination in birch suspension cells

HUANG Ya-Ting, JIAN Duan, ZHAN Ya-Guang, FAN Gui-Zhi*

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: In this study, we established colorimetric and fluorometric determinations for *S*-nitrosothiols content in birch suspension cells. Azo reaction was used in colorimetric method, and 2,3-diaminonaphthalene (DAN) was as a probe in fluorometric assay. Colorimetric assay results indicate that *S*-nitrosothiols content was $(7.54 \pm 0.11) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=6$), the rate of sample recovery was $(101.91 \pm 2.75)\%$ ($n=4$), and the range of stable time in reagent color was from 10 to 35 minutes. Fluorometric assay shows that DAN dyeing time and dyeing concentrations affected the fluorescence intensity of birch suspension cells, and the maximum fluorescence intensity was under $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DAN for 2–4 h. In conclusion, the colorimetric method had good repeatability and high accuracy, and the fluorometric method was intuitive. Accordingly, the above two methods are recommended to detect *S*-nitrosothiols content in plant cells.

Key words: *S*-nitrosothiols; colorimetric assay; fluorometric assay; birch suspension cells

Received 2016-04-01 Accepted 2016-06-24

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31100445), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No. 2572015DY02).

*Corresponding author (E-mail: gzf325@126.com).