

技术与方法 Techniques and Methods

测定植物组织中 NH_4^+ 浓度的荧光法

陆彬彬 张吉 张楚富* 周卫

武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 生命科学学院, 武汉 430072

A Method for Determining Ammonium Ion in Plant Tissue by Fluorometry

LU Bin-Bin, ZHANG Ji, ZHANG Chu-Fu*, ZHOU Wei

Key Laboratory of Ministry of Education for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072

摘要 NH_4^+ 与荧光试剂邻苯二醛(OPA)产生衍生作用后, 用高效液相色谱仪(HPLC)作荧光定量分析, 可以在数分钟内快速而准确地检测到植物组织提取液以及介质中的 NH_4^+ 含量。

关键词 铵离子; 测定; 荧光分析; 谷氨酰胺合成酶

NH_4^+ 是高等植物的一种重要的氮(N)素营养和氮素代谢的产物。植物根吸收外源 NH_4^+ 后在谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)和谷氨酸合酶(glutamate synthase, GOGAT)构成的循环反应中将其同化成谷氨酰胺和谷氨酸^[1]。

通常认为, 根吸收的外源 NH_4^+ 大部分在根中同化, 只有少数转运到叶片中^[2]。叶片生理代谢活动中产生的 NH_4^+ 也很快同化, 不会在叶片组织内积累。为了研究植物组织对 NH_4^+ 的吸收及同化和利用的效率, 必须建立一种灵敏的方法, 以便能对组织抽提液和培养介质中的 NH_4^+ 进行快速、准确的测定。但是, 通常采用的奈氏试剂法操作繁琐、耗时, 且易受到氨基酸、多胺类物质及蛋白质的干扰而不准确, 灵敏度和重复性也差。

邻苯二醛(OPA)可以同 NH_4^+ 发生衍生作用(derivatization)^[3]。OPA 是荧光试剂, 将此反应与 HPLC 相结合, 可以检测 NH_4^+ 。虽然此反应同样也会受到某些因素的干扰, 但是当 pH 值降至 6.8 左右、并加入 2- 巯基乙醇作为还原剂时, 对 NH_4^+ 的检出具有很强的专一性和极高的灵敏度^[4]。本文介绍了此法的原理、操作过程, 并且以在不同温度下生长的水稻幼苗为材料进行了实例分析。

材料与方 法

1 实验材料

水稻(*Oryza sativa*)品种汕优 64 经 HgCl_2 表面消毒、浸种、催芽处理后移栽至含氮营养液^[5]中

于 30℃ 人工气候箱中培养 5 d 左右, 进行如下处理: 一部分继续放在 30℃ 下生长; 另一部分转至低温 20℃ 中生长。湿度为 60%~70%, 光照度为 60 mol·m⁻²·s⁻¹, 每天光照 14 h。定时对水稻生长的营养液取样, 测定 NH_4^+ 浓度和 pH 值。

以上处理 72 h 后, 将水稻根洗净、吸干水分、分装称重后置于低温冰箱中保存或立即用于组织抽提。加入少许石英砂, 按 1:3 的比例加抽提液于研钵中进行匀浆(4℃)。抽提液成分为: 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.6)、1.0 mmol·L⁻¹ EDTA、1.0 mmol·L⁻¹ MgCl₂·6H₂O、10 mmol·L⁻¹ 2- 巯基乙醇。于 4℃ 下 12000×g 离心 30 min, 收集上清液, 即为粗酶抽提液, 用于 NH_4^+ 浓度和 GS 酶活性的测定。

2 测定

2.1 仪器 高效液相色谱仪(HPLC Agilent 1100 series, USA)。

2.2 OPA 试剂 由磷酸盐缓冲液、OPA 和巯基乙醇组成, 新鲜配制。各组分浓度如下: 100 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液、3 mmol·L⁻¹ OPA、10 mmol·L⁻¹ 2- 巯基乙醇。磷酸盐缓冲液由等摩尔 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 组成, 溶液的 pH 值为 6.8。配制好的 OPA 试剂以 0.2 μm 微孔滤膜过滤后备用。

收稿 2004-03-18 修定 2004-06-28

资助 国家自然科学基金(30270130)。

* 通讯作者(E-mail: cfzhang@whu.edu.cn, Tel: 027-87867314)。

2.3 操作流程 参见文献3和4。OPA试剂流经HPLC泵, 含 NH_4^+ 样品由加样环注入。样品与OPA试剂混合后, 于 63°C 下发生衍生作用, 产生荧光物质, 由HPLC的荧光监测器自动检测并记录峰值。流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 每个样品的检出时间大约在5 min左右。上样量 $5\ \mu\text{L}$ 。荧光检测的激发波长和发射波长分别为410和470 nm。以不同浓度的 NH_4Cl 溶液作标准曲线。

2.4 GS活性测定 GS活性测定参照文献6进行。1个GS活性单位定义为于 37°C 下每分钟催化产生 $1\ \mu\text{mol}$ γ -谷氨酰基异羟肟酸(γ -glutamylhydroxamate)所需要的酶量。

实验结果

1 标准曲线的制作

如图1所示。在 $0\sim 5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl 范围内, 荧光值与 NH_4Cl 浓度呈现非常好的线性正相关。

2 不同温度下水稻幼苗营养液中 NH_4^+ 和pH值的变化

对水稻营养液中的 NH_4^+ 和pH值进行了连续测

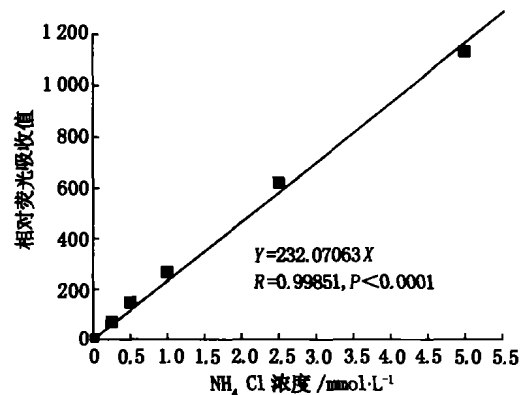


图1 NH_4^+ 标准曲线

定, 如图2所示。植物根组织吸收 NH_4^+ 的同时释放出 H^+ , 因而营养液中 NH_4^+ 和pH显著下降。 20°C 下两者下降的幅度大一些, 显示在较低的温度下, NH_4^+ 吸收多些。

3 不同温度下水稻根组织中 NH_4^+ 的积累

在水稻幼苗生长72 h后, 在 20 和 30°C 下, 根提取液中的 NH_4^+ 浓度分别是 0.38 和 $0.35\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图3)。 20°C 下生长的水稻根部 NH_4^+ 浓度增高7%。与此同时, 20°C 下营养液中残留的 NH_4^+

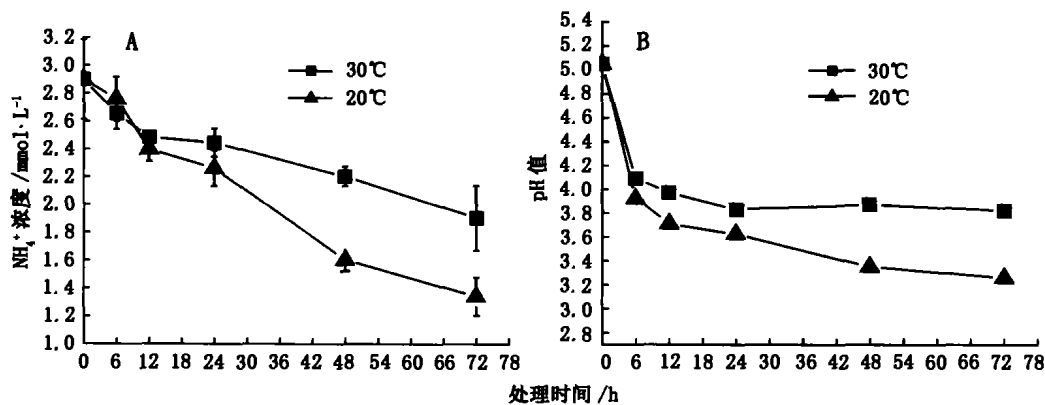


图2 营养液中 NH_4^+ 浓度(A)和pH值(B)变化曲线

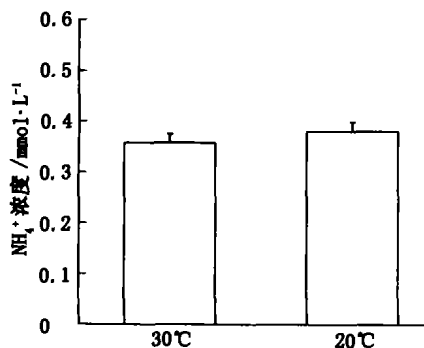


图3 低温处理下水稻根粗提液中 NH_4^+ 的积累

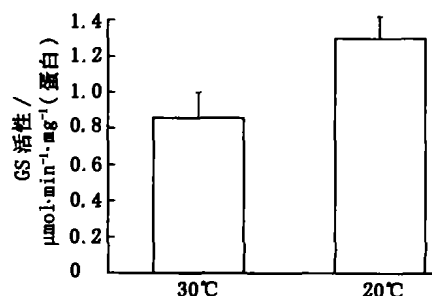


图4 低温处理下水稻根粗提液中GS的活性

浓度比30℃下减少10%。营养液中 NH_4^+ 的吸收与根部 NH_4^+ 的积累大体上是一致的。

4 不同温度下水稻根组织中的GS活性

低温明显促进GS活性的增加(图4)。20℃下GS活性比30℃下的提高50%左右,说明低温有助于 NH_4^+ 的同化。这可能有助于解释水稻根中 NH_4^+ 积累与营养液中 NH_4^+ 的降低之所以不完全成对应关系的原因。因为在低温下生长的水稻根的GS活性明显高于30℃下的,而GS的高活性可以加速 NH_4^+ 的同化,从而导致根提取液中 NH_4^+ 并没有明显积累。这些结果表明较低的温度有助于 NH_4^+ 的吸收以及GS活性的增高,而增高的GS活性又可以反过来促进 NH_4^+ 的同化。

讨 论

本文的方法可以消除其它氮代谢物的干扰,且重复性很好,灵敏度高。对于5和20 μL 的上样量来说,其检测极限分别为1.0和0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [3]。如果把pH从6.8升高至11.0,用 SO_3^{2-} 作为还原剂的话,检测极限甚至可以达到0.02 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,这是常规的化学检测法不能做到的[7]。当然,这个检测极限的增加是以 NH_4^+ 选择性的降低为基础的,可能会受到某些特殊的氨基酸如Gly、Ala、Gln的严重干扰。

文中给出的OPA试剂配方适用于常规分析。如果想得到更高的灵敏度,OPA的浓度可以增高至10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。如果需要更大的缓冲能力来维持pH值的相对稳定(这与样品的pH有关),可以将磷酸盐缓冲液的浓度增至200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。上样量主要与灵敏度、线性范围以及样品的pH值有关,应

根据实际情况作具体调整。对于5 μL 乃至更小的上样量来说,建议使用自动加样器,因为样品体积的微小改变都可能导致荧光吸收值产生极大偏差。另外一个值得注意的问题是保留时间。因为无需过柱,OPA试剂与样品瞬间即可汇合,导致保留时间太短,反应不充分。根据我们的经验,对此可增加一段合适长度的塑料管,让缓冲液流经该管再与样品反应以延长反应时间,同时对流速加以控制。一般说来,保留时间应大于2 min。

参考文献

- 1 Lea PJ, Blackwell RD, Joy KW. Ammonia assimilation in higher plants. In: Mengel K, Pilbeam DJ (eds). Nitrogen Metabolism of Plants. Oxford: Oxford Sci Publ, 1992. 289
- 2 Seshley KA, Yamaya T, Oaks A. Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. Int Rev Cytol, 1992, 134: 85~163
- 3 Goyal SS, Rains DW, Huffaker RC. Determination of ammonium ion by fluorometry or spectrophotometry after on-line derivatization with o-phthalaldehyde. Anal Chem, 1988, 60:175~179
- 4 Husted S, Hebborn C, Mattsson M et al. A critical experimental evaluation of methods for determination of NH_4^+ in plant tissue, xylem sap and apoplastic fluid. Physiol Plant, 2000, 109:167~179
- 5 Yoshida S, Forno DA, Cock JH et al. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. 3rd ed. Manila, Philippines: International Rice Research Institute, 1976. 61~66
- 6 Rhodes D, Rendo GA, Stewart GR. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. Planta, 1975, 125: 201~211
- 7 Genfa Z, Dasgupta PK. Fluorometric measurement of aqueous ammonium ion in a flow injection system. Anal Chem, 1989, 61: 408~412