

# 冰醋酸对于测定植物材料中 超氧阴离子含量的灵敏度的影响

陆巍, 许晓明, 张荣铎, 戴新宾

(南京农业大学生命科学学院 210095 南京)

[摘要] 利用羟胺氧化法测定超氧阴离子,在偶氮反应试剂中加入冰醋酸能够提高检测灵敏度 50%。在植物材料的  $O_2^-$  的提取过程中同时加入 EDTA 和羟胺,抑制 SOD 活性并及时“固定” $O_2^-$ ,这样所测得的  $O_2^-$  含量更能反映体内的实际情况。同时发现提取上清液照光不产生  $O_2^-$ ,间接验证了  $O_2^-$  来源于光合膜系统。

[关键词] 植物材料,超氧阴离子,含量,灵敏度,光合膜

[中图分类号] Q945.11, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2004)01-0082-03

氧化胁迫是高等植物经常遇到的逆境。植物接受的光能除通过光合电子传递转化为同化力,并最终形成碳水化合物外,其余能量通过各种途径,如荧光、热量等耗散出去,防止它们对光合机构造成损害;同时还有一部分过剩能量的耗散表现为光合电子传递链通过 PSI 将电子传递给氧分子,形成超氧阴离子  $O_2^{\cdot-}$ <sup>[1]</sup>。超氧阴离子是植物体内活性氧的最初产物,其它更具伤害性的活性氧形式( $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$  和  $^1O_2$  等)都是它的衍生物<sup>[2]</sup>。因此植物中检测超氧阴离子的含量具有更加重要的意义,可作为反映植物体内氧化胁迫的重要指标,也间接反映了光合效率的高低。

王爱国等(1990)<sup>[3]</sup>介绍和改进用了羟胺氧化反应法来检测植物材料  $O_2^-$  的方法,该方法廉价、灵敏,专一性强。本文旨在该方法的基础上加以改进,并结合植物材料,试图对其生理意义进行探讨。

## 1 方法

### 1.1 溶液配制

#### 1.1.1 $\alpha$ -萘胺溶液

将 0.5 g  $\alpha$ -萘胺溶于 100 mL 煮沸的去离子水中,冷却到室温后加入 125 mL 冰醋酸,再用 275 mL 去离子水定容至 500 mL,置于暗处保存。由于市售的  $\alpha$ -萘胺纯度不高,溶于热水时会见到一些红色油滴状液体杂质沉于烧杯底部,可通过倒出上层水溶液的方法去除。

#### 1.1.2 对氨基苯磺酸溶液

将 1.65 g 对氨基苯磺酸溶于 375 mL 温热的去离子水中,再加入 125 mL 冰醋酸。

以上两种溶液用来测定亚硝酸含量,其中的冰醋酸非常重要。

#### 1.1.3 盐酸羟胺溶液(10 mmol/L)

6.9 mg 盐酸羟胺溶于 10 mL 去离子水,该溶液直接同  $O_2^-$  反应,将后者“固定”成亚硝酸。

#### 1.1.4 PBS 缓冲液

磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(65 mmol/L, pH7.8)。

#### 1.1.5 亚硝酸钠(1 mmol/L)

将 69 mg 亚硝酸钠溶于去离子水,定容至 1 000 mL。

### 1.2 植物材料中 $O_2^-$ 含量的测定

取植物成熟叶片 0.5 g 左右,依次加入 PBS 缓冲液 3 mL、羟胺溶液 1 mL 和 0.1 mol/L EDTA 1 mL,在暗中冰浴研磨匀浆,匀浆液 12 000 r/min 离心 30 min,取 1 mL 上清依次加入 1 mL 对氨基苯磺酸和 1 mL  $\alpha$ -萘胺

收稿日期 2003-09-11。

基金项目 国家重点基础研究发展规划项目(G1998010100)资助。

作者简介 陆巍,1971-,南京农业大学生命科学学院副教授,博士,主要从事植物光合与衰老生理的研究,E-mail:luw@mail.njau.edu.cn

通讯联系人 张荣铎,1934-,南京农业大学生命科学学院教授,主要从事植物光合与衰老生理的研究,E-mail:rxzhang@njau.edu.cn

万方数据

溶液 振荡混匀 37℃保温 10 min 后加入 3 mL 乙醚 充分混匀.全部混合物在 2 000 r/min 离心 5 min.吸出水相测定  $A_{530}$ .同时以亚硝酸钠溶液制作标准曲线.

1.3 植物叶片提取液上清中  $O_2^-$  含量的测定

水稻‘汕优 63’和‘Ⅱ优 129’叶片 冰浴上用 PBS 溶液研磨匀浆 12 000 r/min 离心 10 min 上清加 1 mL EDTA 混匀.从中取出 0.5 mL 在晴天阳光下 与羟胺溶液反应不同的时间 测定  $O_2^-$  含量.

2 结果与讨论

利用羟胺氧化反应检测  $O_2^-$  的主要原理是通过羟胺与  $O_2^-$  反应生成亚硝酸 再利用对氨基苯磺酸与亚硝酸反应生成粉红色的偶氮化合物来检测亚硝酸.因此该方法用  $NO_2^-$  作标准曲线 根据反应的化学计量关系 每生成一分子  $NO_2^-$  意味着两分子  $O_2^-$  存在<sup>[4]</sup>.  $\alpha$ -萘胺溶液和对氨基苯磺酸溶液为测定  $O_2^-$  含量的最重要的溶液 其关键在于一定要用冰醋酸配制.一方面由于  $\alpha$ -萘胺和对氨基苯磺酸在水中的溶解度较低 其水溶液的浓度达不到所要求 严重影响了该方法的检测灵敏度和重现性.另一方面 生色反应需要在酸性环境下进行 冰乙酸恰能起到这个作用.如果不用冰醋酸配制 则在测定标准曲线过程中 PBS 缓冲液会抑制偶氮染料的生成 无法生色 除非在测定标准曲线过程中用水代替 PBS(如图 1 所示).运用上述经过改进的方法 可将检测灵敏度提高 50%(如图 2 所示).

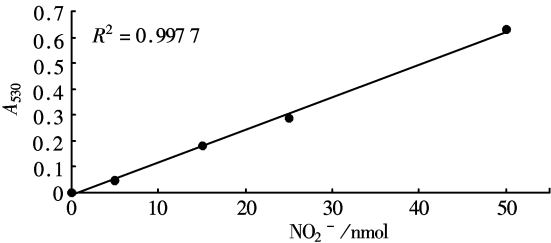


图 1 亚硝酸含量标准曲线(低灵敏度)

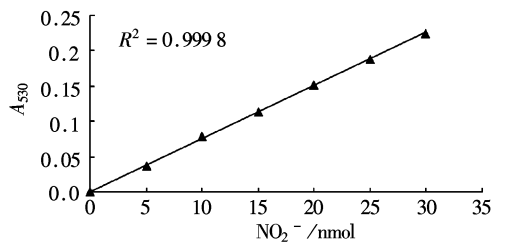


图 2 亚硝酸含量标准曲线(高灵敏度)

本文在匀浆液中同时加入 EDTA 和羟胺是为了抑制 SOD 活性 切断  $O_2^-$  转变成  $H_2O_2$  的途径 从而能较真实地反映植物体内全部  $O_2^-$  含量<sup>[5]</sup>.图 3 为使用以上方法测得的 2 个水稻品种剑叶的  $O_2^-$  含量.

在匀浆液中加入不同处理测得的结果不同 :EDTA 螯合二价阳离子 抑制 SOD 活性 使得  $O_2^-$  积累 ;若代以 PBS 缓冲液 匀浆液中的 SOD 会把一部分  $O_2^-$  清除 此时测得的结果反映叶片内部  $O_2^-$  生成和清除能力的平衡 两者之差可反映 SOD 清除活性氧能力的大小.取‘汕优 63’叶片 加入 PBS 和羟胺溶液后在冰浴中匀浆 匀浆液分成同等 2 份 一份加入 EDTA 另一份加入同体积的 PBS 均 12 000 r/min 离心 30 min 上清取 1.5 mL 测定  $O_2^-$  含量.结果如图 4 所示.加入 EDTA 后  $O_2^-$  清除受阻 导致其在体内积聚 因此测得数值最高 若以 PBS 缓冲液代替 测得数值反映 SOD 酶清除后的含量 低于第一个柱形 图中第三个柱形为前两者之差 可用来反映 SOD 酶活性.

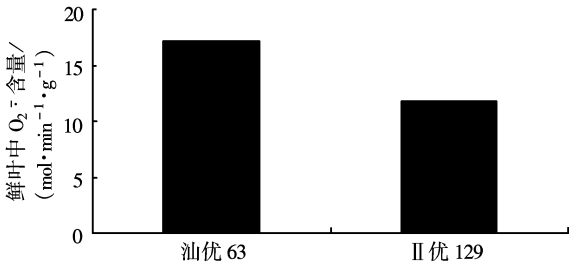


图 3 2 个品种水稻鲜叶片的  $O_2^-$  含量

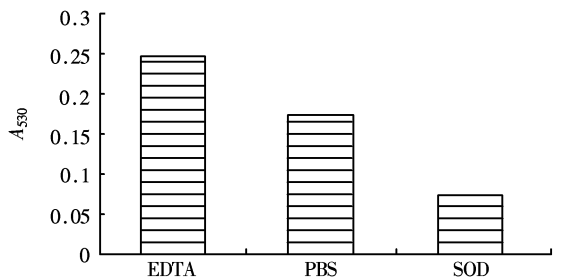


图 4 不同提取方法对  $O_2^-$  的含量的影响

我们认为 在晴天旺盛生长的叶片中  $O_2^-$  主要来源于光合电子传递 即由叶绿体中的光合膜系统产生 由此认为细胞匀浆上清不会产生  $O_2^-$ .为证明这一点 匀浆液上清进行不同时间照光处理(如图 5 所示) 发现随着反应时间的不断延长  $O_2^-$  的含量没有明显增加 表明上清中无  $O_2^-$  产生.

采用羟胺氧化反应测定  $O_2^-$  是一种廉价、灵敏的方法 也是能够直接反映光合电子传递效率的指标.张荣铎等发现在叶片光合功能衰退过程中 叶绿素和光合速率的下降呈现为两个阶段 :缓降期和速降

期<sup>[6]</sup>.而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在缓降期转变为速降期的转折点后表现为快速的上升.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是活性氧被清除过程中的一个产物 而作为光合电子传递产生活性氧的第一个产物 O<sub>2</sub><sup>-</sup> ,可能更能代表活性氧产生和清除的水平.采用冰醋酸配制溶液 ,能大幅度提高其检测灵敏度 ;在测定植物材料中的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量时 ,加入 EDTA 抑制 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的清除 ,从而较好地反映体内 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产生总量.本文发现 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 来源于膜系统 ,也间接验证了 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 来源于光合电子传递.

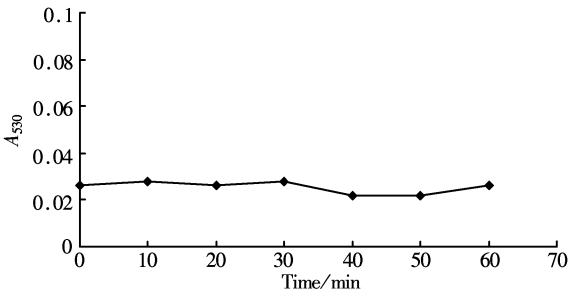


图 5 匀浆上清与羟胺反应的时间进程

[ 参考文献 ]

[ 1 ] Krall J P , Edwards G E. Relationship between photosystem II activity and CO<sub>2</sub> fixation in leaves[ J ]. Physiologia Plantarum , 1992 , 86 :180 ~ 187 .  
[ 2 ] Asada K. The water-water cycle in chloroplasts : scavenging of active oxygen and dissipation of excess photon[ J ]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol , 1999 50 :601 ~ 639 .  
[ 3 ] 王爱国 ,罗广华 .植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[ J ]. 植物生理学通讯 ,1990 ( 6 ) :55 ~ 57 .  
[ 4 ] Elstner E F , Heupel A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylaminonium-chloride : a simple assay for superoxide dismutas[ J ]. Anal Biochem ,1976 ,70 :616 ~ 620 .  
[ 5 ] Scandalios J G. Oxygen stress and superoxide dismutas[ J ]. Plant Physiol ,1993 ,101 :7 ~ 12 .  
[ 6 ] 张荣铨 ,戴新宾 ,许晓明 .叶片光合功能期与作物光合生产潜力[ J ]. 南京师大学报( 自然科学版 ) ,1999 ,22( 3 ) :250 ~ 260 .

Effece of Adding Acetic Acid on Improvement  
of Determination of Superoxide Anion Content in Plants

Lu Wei , Xu Xiaoming , Zhang Rongxian , Dai Xinbin

( School of Life Science , Nanjing Agricultural University , 210095 , Nanjing , PRC )

**Abstract** Method for superoxide anion content determination through hydroxylammonium oxidation was greatly improved by adding acetic acid to the reagents of nitroazo reaction , which led to obvious increase in sensitivity by 50% . When superoxide was extracted from plant , EDTA and hydroxylammonium were added simultaneously to inhibit SOD activity and to fix superoxide immediately . The result thus obtained reflected more precisely the actual situation in plant . Superoxide anion was not produced by irradiation of extract supernatant , which suggests that it be originated from photosynthetic membrane .

**Key words** plant , superoxide anion , content , sensitivity , photosynthetic membrane

[ 责任编辑 孙德泉 ]