

转基因烟草中的海藻糖测定*

周 坚 杨 波 戴秀玉**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词: 高效液相层析(HPLC), 蒸发光散射检测器(ELSD), 转基因烟草, 海藻糖

中图分类号: Q533 文献标识码: B 文章编号: 0001-6209 (2001) 03-0378-03

海藻糖(Trehalose)是由两个葡萄糖分子以 α, α 1 $\rightarrow$ 1 糖苷键结合的非还原性双糖, 它广泛存在于细菌、真菌、昆虫以及某些低等动植物中^[1]。海藻糖对各种不同生物的抗逆耐受性起着重要作用^[2]。利用海藻糖的抗逆耐干特性, 采用基因工程技术将海藻糖合成能力转入农作物, 培育抗旱耐盐的作物新品种, 对糖食的增产增收具有重要意义。我们已将大肠杆菌海藻糖合成酶基因(*otsA*)转入烟草^[3], 但如何检测植物中海藻糖是个关键问题。已经建立的薄层层析(TLC)测定海藻糖方法^[4]因所需样品多, 且要求有一定的浓度, 制约了 TLC 法在该实验中的应用。

目前糖分析采用得最多的是高效液相层析法(HPLC), 通常用糖分析柱^[5]、氨基键合柱^[6]或 C18 柱^[7]作固定相, 以乙腈和水的混合溶剂或纯水作流动相。由于糖在紫外区无吸收, 用 HPLC 法测糖时一般采用示差折光器(RID)来检测吸收峰, 但灵敏度较低、误差大。蒸发光散射检测器(ELSD)是一种新型的通用检测器。目前已被用于类酯^[8]、表面活性剂^[9]等物质的检测, 但用于检测糖类, 特别是海藻糖尚未有报道。本工作利用 ELSD 检测的 HPLC 方法, 完成了转基因烟草中海藻糖含量测定。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

HP1100 高效液相色谱仪, 美国 Hewlett Packard 公司制造, 配有 Alltech 蒸发光散射检测器(ELSD), 美国 Alltech 公司产品; 海藻糖购自 Sigma 公司, 用甲醇配制成 1000mg/L 的标准溶液, 使用时适当稀释。

1.2 层析条件

层析柱为 Zorbax RX-SIL 动态修饰硅胶柱(250mm $\times$ 4.6mm I.D., 5 μ m Hewlett-Packard), 流动相为水: 乙腈(1:2.6, V/V 或甲醇: 水), 并加入 0.03% 体积的乙二胺作为修饰剂, 加入 0.05 体积的羟氨使 pH 值为 9~10。流量为 1.0ml/min, 柱温为 25 $^{\circ}$ C, 进样量 25 μ L。在开始分析之前, 先用加入 0.03% 体积乙二胺的水: 乙腈(1:2.6, V/V)作流动相洗柱, 以使硅胶表面完全被乙二胺覆盖。检测器为蒸发光散射检测器(ELSD), 检测器漂移管温度为 85 $^{\circ}$ C, 气流速度为 2.0SLPM(Standard Liter per Minute)。

1.3 转基因烟草中的海藻糖样品制备

取 10 g 烟草叶片, 用液氮在研钵中研碎, 加入 10 mL 蒸馏水, 100 $^{\circ}$ C 加热 15 min, 5000 r/min 离心 10 min 后取上清, 往上清液中加入一定体积的无水乙醇, 使乙醇终浓度达 80%。轻轻振荡混匀后用 3MM 规格的 Waltman 滤纸过滤, 上清液加热到 80 $^{\circ}$ C 左右并以磁力搅拌, 使溶液中的乙醇全部挥发干净。留取再过滤后的澄清液进行各种糖分的定性和定量分析。

* 国家自然科学基金资助项目(39980023)

** 联系作者

作者简介: 周 坚(1962~), 男, 上海市人, 中国科学院微生物研究所实验师, 主要从事微生物学研究。

收稿日期: 2000-11-10, 修回日期: 2000-12-28

2 结果和讨论

2.1 标准曲线的建立

将海藻糖配成 30、50、100、300、500 mg/L 的标准系列浓度,依次进样 20 μ L,根据 ELSD 测得的峰面积与相对应的标准溶液浓度进行回归,发现线性很差。换一种算法,以海藻糖浓度的对数与 ELSD 测得的峰面积的对数进行线性回归,则得到良好的线性关系,见图 1。根据这一线性关系,取最低浓度的标准溶液(30 mg/L)逐级稀释,依次进样 20 μ L,以确定能检测出最低海藻糖浓度,结果显示检测的下限为 5 mg/L。

2.2 转基因烟草中糖份的测定

按照材料和方法所述从转基因烟草中提取制备的样品,除了海藻糖外,还有葡萄糖、果糖、蔗糖等其他糖类。因此首先要对多糖组分进行 HPLC 分离,并用 ELSD 检测器检测以确定每一种糖,特别是海藻糖的洗脱时间和出峰位置,以野生型烟草为对照,检查转基因烟草中是否有海藻糖的合成。图 2 是四种糖标样的层析图谱。可见果糖、葡萄糖、蔗糖和海藻糖的出峰时间分别为 7.86 min、8.96 min、11.48 min 和 14.63 min,依照图谱并结合糖浓度与峰面积的标准曲线,就可测得烟草样品中各种糖的组分和浓度。

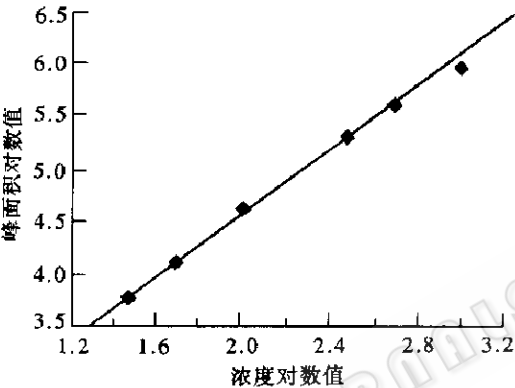


图 1 峰面积对数与海藻糖浓度对数的线性关系

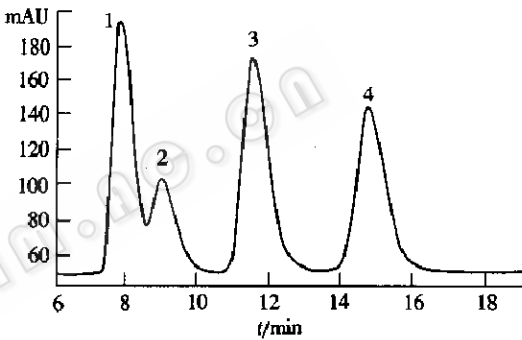


图 2 四种糖标样的 HPLC-ELSD 层析图谱
峰指认:1. 果糖;2. 葡萄糖;3. 蔗糖;4. 海藻糖

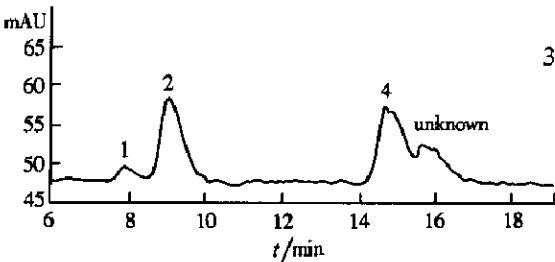
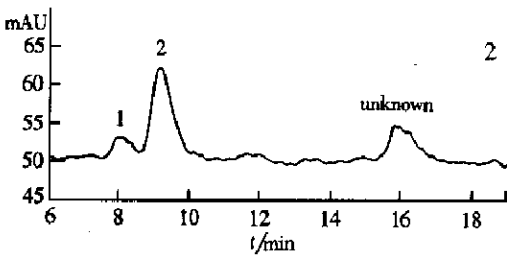
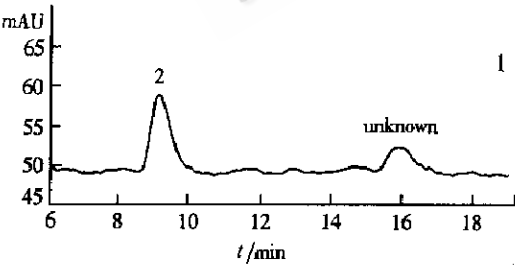


图 3 多糖组份的 HPLC-ELSD 层析图谱

1. 野生型烟草; 2. 转空载体烟草; 3. 转基因烟草.

2.3 转基因烟草中海藻糖含量的测定

按照以上获得的多糖组分的 HPLC 色谱图,分析野生型烟草、转植物双元载体烟草和转海藻糖合成酶基因烟草的糖类提取物,结果如图 3。

与图 2 中不同糖所对应的峰为参照进行比较,图 3-1 是野生型烟草的,未检测到海藻糖峰;图 3-2 是转空载体的,也未呈现海藻糖峰;图 3-3 是转海藻糖合成酶基因烟草的,可以看到海藻糖峰,并根据峰面积与糖浓度的标准曲线及选用的烟草叶片湿重计算出转基因烟草的海藻糖含量为 $14.7 \mu\text{g} \cdot (\text{g FW})^{-1}$ (其他糖分含量计算略)。分析结果表明只有在转海藻糖合成酶基因烟草中才有海藻糖的合成。用 ELSD-HPLC 方法有效解决了转基因烟草中海藻糖测定的关键问题,可以弥补 HPLC 传统检测器(RID)的不足,显示了 ELSD 检测器对无紫外吸收的有机大分子化合物,包括糖类的检测的优越性。

致谢 本工作得到清华大学理化测试中心丁明玉副教授、魏 决同学的大力帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Crowe J H, Crowe L M, Chapman D. *Science*, 1984, **223**: 701 ~ 703.
- [2] Hottiger T, Boller T, Wiemken A. *FEBS Lett.* 1987, **255**: 5518 ~ 5522.
- [3] 戴秀玉,王忆琴,周 坚. 微生物学报, 2001, 待发表.
- [4] 周 坚,吴大鵬,戴秀玉. 微生物学通报, 1997, **24**: 125 ~ 127.
- [5] 高文元,肖培根. 中国医药杂志. 1997, **22**: 590 ~ 592.
- [6] Clement A, Yong d, Brechet C. *J Liq Chromatography*, 1992, **15**: 805 ~ 817.
- [7] 丁明玉,小泉均,铃木义仁. 色谱. 1997, **15**: 281 ~ 283.
- [8] Marcato B, Ceccehin G. *J Chromatography (A)*, 1996, **730**: 83 ~ 90.
- [9] Kibbey T C G, Yavaraski T P, Hayes K F. *J Chromatography (A)*, 1996, **752**: 155 ~ 165.

DETECTION OF TREHALOSE IN TRANSGENIC TOBACCO BY HPLC WITH ELSD*

Zhou Jian Yang Bo Dai Xiuyu

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080 China)

Abstract: The *E. coli* trehase synthalose gene(*otsA*) was transferred into *Nicotiana tabacum* mediated by *Agrobacterium*, but the method for detecting low concentration of trehalose in transgenic plant was not available. The high performance liquid chromatograph(HPLC) with evaporative light-scattering detector (ELSD) using water:methyl cyanide(1:2.6 v/v) as mobile phase was established in this work. An ODS column Zorbax RX-SIL was employed. the trehalose detection limits of ELSD was 5mg/L. From the linear relationship between the logarithm of trehalose concentration and the logarithm of peak area, it was shown there was $14.7 \mu\text{g} \cdot (\text{g FW})^{-1}$ in transgenic plant. The data strongly confirmed that trehalose was responsible for the improved stress tolerance of the tobacco.

Key words: HPLC, ELSD, Transgenic tobacco, Trehalose

* Project Granted by National Natural Science Foundation of China(39980023)