

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.06.005

噻虫胺胁迫对小白菜中谷胱甘肽和蛋白质含量的影响

陈雁君¹* 王 艳² 程晓平¹ 郭建丽¹ 张建萍¹ 赵艳霞¹

(¹ 济宁医学院医学检验系, 山东 济宁 272067; ² 临沂市蒙阴县坦埠医院, 山东 临沂 276200)

摘 要 **目的** 寻找较敏感的生物标记物, 作为噻虫胺污染蔬菜的早期诊断指标。**方法** 谷胱甘肽(GSH)含量测定采用 Ellman 法。可溶性蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝。**结果** 在胁迫初期 GSH 含量急剧降低, 低浓度处理组 GSH 含量在第 5 天下降到最低点, 高浓度处理组 GSH 含量在第 7 天下降到最低点。处理组的蛋白质含量均明显低于对照组, 浓度越高蛋白质含量越低, 与对照组有显著性差异。**结论** GSH 和蛋白质均可作为噻虫胺污染蔬菜的早期敏感生物检测指标。

关键词 噻虫胺; GSH; 蛋白质; 小白菜

中图分类号: R155.5+4 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)12-395-03

Effect of clothianidin stress on the content of Protein and GSH in Brassica pekinensis

CHEN Yan-jun, WANG Yan, CHENG Xiao-ping, et al

(Department of Sanitary chemistry, Jining Medical University, Jining. 272067, China)

Abstract: Objective To study the effect of Clothianidin stress on the content of GSH and Protein in Brassica pekinensis. **Methods** The content of GSH and Protein in Brassica pekinensis is determined by Coomassie brilliant blue and Ellman methods. **Results** The results showed that the synthesis of GSH and protein was suppressed under the Clothianidin stress in the high and low concentration groups. The concentrations in study groups were lower than controls significantly. At last, it is consistent with the control group. **Conclusion** The content of GSH and protein in Brassica pekinensis suffered Clothianidin stress changes significantly in early time. So it could be served as sensitive biomarker under Clothianidin stress in Brassica pekinensis.

Key words: Clothianidin; GSH; Protein; Brassica pekinensis

噻虫胺(Clothianidin), 是新型烟碱类内吸杀虫剂^[1]。化学名称: (E)-1-2-(2-氯-1,3-噻唑-5-基)-3-甲基-2-硝基胍, 可有效防治半翅目、鞘翅目和某些鳞翅目等害虫, 因与传统的杀虫剂作用机理不同, 故对拟除虫菊酯类、有机磷、氨基甲酸酯类产生抗性的害虫亦有效。对水稻、果树、蔬菜等作物安全性高, 对人畜低毒^[2]。适宜的作物为果蔬、棉花、茶叶、水稻、草皮和观赏植物等^[3]。该农药为农业部推广在果蔬中使用的毒性较低的农药, 但随着应用的日趋广泛, 必然造成对果蔬及其它食品的污染, 对人体造成危害, 当污染达到一定程度, 会导致对动、植物中酶活性影响和组织细胞生化代谢功能的失常, 对动植物造成危害。

有关农药污染对蔬菜营养素含量和抗氧化物分子影响的研究国内外报道也较少, 本文研究了高、低两种浓度噻虫胺胁迫后, 小白菜体内 GSH 和蛋白质的变化规律, 寻找遭受噻虫胺胁迫时植物

体反应比较敏感的生物标志物, 作为该农药污染蔬菜的早期诊断指标。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备

高效液相色谱仪(日本岛津 LC-10Avp); RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 高速组织粉碎机(北京化玻联医疗器材有限公司); KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); XW-80A 旋涡混匀器(海门其林贝尔仪器制造有限公司); BP211DSartorius 电子天平(Germany); Sartorius 纯水器(Germany); ZT-III 台式真空泵(上海之信仪器制造有限公司); UV2550 紫外可见分光光度计(日本岛津)。

1.2 主要试剂

噻虫胺标准品: 纯度 ≥ 99.5% (德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 50% 噻虫胺水溶性颗粒剂

(扬州市先锋化工有限公司);谷胱甘肽标准品(西安沃尔森生物技术有限公司);牛血清蛋白标准品;硅胶吸附剂(国药集团化学试剂有限公司);实验用水均为超纯水(过 0.45 μ m 滤膜);DTNB(厦门星隆达化学试剂有限公司);磷酸二氢钠(天津市北辰骅跃化学试剂厂);磷酸氢二钠,(天津市北辰骅跃化学试剂厂)。所用化学试剂均为分析纯。

1.3 试验设计

田间试验设 3 个试验小区,每小区面积 20m²,当幼苗长至 10cm 左右时第 1 次喷药,以后每隔 2 天喷 1 次,共喷施 3 次。施药量(按有效成分计)分别为 50g/hm²(推荐量)和 200g/hm²,另设一不喷药的空白对照小区。最后一次喷洒噻虫胺后的第 0 天、第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天、第 10 天、第 12 天,用双对角线法采集全株小白菜进行 GSH 和蛋白质含量测定,每个喷施浓度取 6 个平行样。。

1.4 小白菜 GSH 含量的测定

采用 Ellman 的方法^[2],GSH 与 DTNB 试剂反应生成 5-硫代二硝基苯甲酸阴离子,呈黄色,412nm 处有最大吸收峰。样品提取液的制备同蛋白质,0.2ml 样品液中加入 2.6ml Tris-Hcl(1mol/L,pH8.0),混合后再加入 0.2ml DTNB 试剂,摇匀,于 30℃ 保温 5min,用磷酸缓冲溶液(pH7.0)代替 DTNB 试剂做空白,测定 A₄₁₂。精确称取 GSH 标样 0.1g,用去离子水定容到 100ml,分别移取 0.5ml,1.0ml,2.0ml,3.0ml,4.0ml 在 5 个 100ml 容量瓶中,再分别用去离子水定容至刻度(在使用前临时配制),其余处理同样品,得 GSH 标准曲线,外标定量法计算样品中 GSH 的含量。

1.5 小白菜蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[1],称取小白菜 1.0g,加少量石英砂和 2.0ml 水,匀浆,转入离心管中,放置 0.5~1h 以充分提取,等重后以 3500r/min 离心 15min,上清液转入 25ml 容量瓶,蒸馏水定容至刻度,即得待测样品提取液。取 6 支 10ml 干净的具塞试管,按表 1 取样,盖塞后将各试管中溶液纵向倒转混合,静置 2min,测各管的 A₅₉₅ 值,将蛋白质含量和对应平均吸光度值进行回归分析,得回归方程为 $A=2.964M+0.15$, $r=0.9981$,

将回归方程拟合成一条直线即为蛋白质的标准曲线。

表 1 蛋白质测定的试剂用量

	0	1	2	3	4	5
牛血清蛋白(mg/ml)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
蒸馏水(ml)	1.0	0.95	0.9	0.8	0.7	0.6
染色液(ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
蛋白质含量(mg)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4

吸取 0.5ml 样品提取液于试管中,加入考马斯亮蓝 G-250 染色液 5.0ml,充分混匀,放置 5min,测 A₅₉₅ 值,记录结果,查标准曲线得蛋白质含量。

2 结果

2.1 噻虫胺胁迫后小白菜 GSH 含量的变化

噻虫胺对小白菜 GSH 含量影响如表 2、图 1,实验结果表明,两个处理组 GSH 表现出相似的变化趋势,在胁迫初期即最后一次施药当天 GSH 含量急剧降低,低浓度组 GSH 含量在第 5 天下降到最低点,高浓度组 GSH 含量在第 7 天下降到最低点,此后两组 GSH 含量逐渐开始升高,在第 12 天左右与对照组 GSH 含量基本达到一致。经统计学软件 SPSS13.0 处理,实验天数内,高浓度组与对照组之间、高浓度组与低浓度组之间有显著性差异($P<0.05$),施药后前 10 天,低浓度组与对照组有显著性差异($P<0.05$)。

2.2 噻虫胺胁迫后小白菜蛋白质含量的变化

施用噻虫胺后,高、低两个浓度处理组及对照组的蛋白质含量变化如表 3、图 2 所示,处理组的蛋白质含量均明显低于对照组,低浓度组第 5 天达到最低值,此后逐渐增加,第 12 天左右与对照组基本一致;高浓度组蛋白质第 1 天后开始降低,第 7 天达到最小值,第 12 天时仍与对照组有显著性差异。经统计学软件 SPSS13.0 处理,实验天数内高浓度组与对照组、低浓度组与高浓度组差异性显著($P<0.05$),施药后前 10 天,低浓度组与对照组差异性显著($P<0.05$),第 12 天低浓度组与对照组无显著性差异($P>0.05$)。

表 2 噻虫胺胁迫对小白菜 GSH 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$,mg/kg)

组别	时间(d)						
	0	1	3	5	7	10	12
对照组	7.08 $\pm$ 0.23	7.52 $\pm$ 0.19	7.23 $\pm$ 0.27	7.31 $\pm$ 0.69	7.42 $\pm$ 0.72	7.85 $\pm$ 0.93	7.85 $\pm$ 0.12
低浓度组	6.38 $\pm$ 0.46*	5.48 $\pm$ 0.25*	4.48 $\pm$ 0.11*	3.52 $\pm$ 1.01*	4.62 $\pm$ 0.59*	6.51 $\pm$ 0.82*	7.83 $\pm$ 0.39
高浓度组	5.42 $\pm$ 0.26* Δ	4.50 $\pm$ 0.31* Δ	3.65 $\pm$ 0.55* Δ	2.50 $\pm$ 0.91* Δ	2.10 $\pm$ 1.21* Δ	3.72 $\pm$ 0.47* Δ	6.95 $\pm$ 0.50* Δ

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与低浓度组比较, $\Delta P<0.05$ 。

表 3 噻虫胺胁迫对小白菜蛋白质含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6, \text{mg/kg}$)

组别	时间(d)						
	0	1	3	5	7	10	12
对照组	0.067±0.0046	0.066±0.0016	0.067±0.0031	0.068±0.0025	0.070±0.0056	0.072±0.0064	0.073±0.0039
低浓度组	0.056±0.0011*	0.052±0.0058*	0.048±0.0044*	0.041±0.0090*	0.049±0.0082*	0.064±0.0109*	0.071±0.0079
高浓度组	0.047±0.0032*△	0.043±0.0029*△	0.041±0.0102*△	0.038±0.0013*△	0.031±0.0034*△	0.047±0.0830*△	0.058±0.0095*△

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与低浓度组比较,△ $P<0.05$ 。

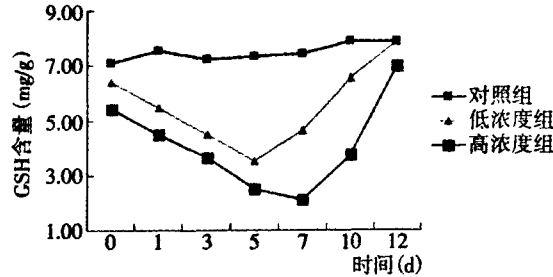


图 1 噻虫胺胁迫对小白菜 GSH 含量的动态影响

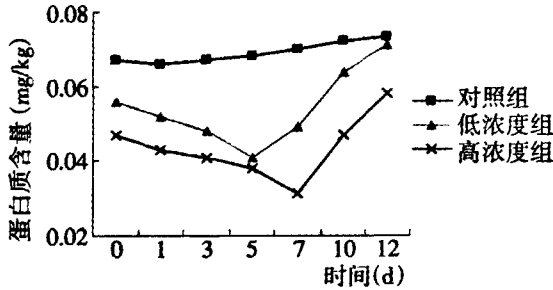


图 2 噻虫胺胁迫对小白菜中蛋白质含量的动态影响

3 讨论

3.1 噻虫胺胁迫对小白菜 GSH 含量的影响

GSH 是植物中普遍存在的硫醇,在还原硫的贮存和运输、蛋白质和核酸合成方面均有重要作用,且在植物抗逆性方面的作用尤为重要^[6]。作为植物体内重要的抗氧化分子,GSH 一方面可作为谷胱甘肽过氧化物酶的底物,将 H_2O_2 还原为 H_2O ;另一方面 GSH 也可通过直接与活性氧反应以清除植物体内过多的活性氧^[7]。

本实验在胁迫初期,植物体消耗大量的 GSH 来清除活性氧,使得 GSH 含量下降,随后噻虫胺在体内迅速降解且机体所具有防御机能启动,自身防御体系中的抗氧化酶类活性升高以消除过多的活性氧,使得 GSH 消耗减少,其含量逐渐回升。

3.2 噻虫胺胁迫对小白菜蛋白质含量的影响

蛋白质是维持生命活动的物质基础,具有促进血液送氧、调节生理功能和防御疾病感染等功能^[4]。生物的结构和形状都与蛋白质有关,蛋白质还参与基因表达的调节,以及细胞中氧化还原、电子传递、神经传递乃至学习和记忆等多种生命活动过程,它是生物体的重要构成成分,当暴露于污染

环境之中,蛋白质的结构、性能必然发生相应的变化。蛋白质分子受某些物理因素(如热、紫外线、超声波、高电压等)和化学因素(如酸、碱、有机溶剂、重金属盐类、尿素、表面活性剂等)的作用,会引起分子的二、三、四级结构发生变化,导致蛋白质丧失生物活性,含量减少,当外界刺激减弱或消失,蛋白质又会恢复活性或合成增加。Ismail Sead M. M^[5]等用丙溴磷对西红柿及西红柿制品的研究发现,随着作用时间的延长,其影响减少,最终处理组蛋白质含量与对照组几乎一致,与本实验结果一致。

结论:噻虫胺胁迫后,小白菜蛋白质、GSH 含量均出现了较明显的变化趋势,均可作为噻虫胺污染小白菜的早期敏感生物检测指标。

根据施用噻虫胺后,其残留对果蔬中抗氧化分子及蛋白质含量均有影响的实验结果,建议应更加关注果蔬中直接施用噻虫胺,尤其是可新鲜食用的果蔬,不宜过量施用,且急需噻虫胺的推荐最大容许残留量(MRL)的建立,以控制其应用,避免残留的不利影响。

参考文献:

[1] 葛志荣,李元平,黄冠胜,等. 食品中农业化学品残留限量[M]. 北京:中国标准出版社,2006;332-336.
[2] Mota Sanchez D. Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Manag Sci*, 2006 Jan; 62(1): 30-7.
[3] A structure-activity study of the mode of [3H]imidacloprid displacement in *Myzus persicae* and *Aphis craccivora*. *Pest Manag Sci*. 2004; 60(10): 945-58.
[4] 葛黎. 野菜与栽培蔬菜维生素 C 和蛋白质含量的比较分析[J]. 种子(Seed), 2007, 26(03): 61-63.
[5] Ismail Sead M. M, Ali Hussein M, Habiba Ramadan A. GC-ECD and GC-MS Analyses of Profenofos Residues and Its Biochemical Effects in Tomatoes and Tomato Products. [J]. *Agric. Food Chem*, 1993, 41(4): 610-615.
[6] 杜琳,张荃. 植物谷胱甘肽与抗氧化胁迫[J]. 山东科学, 2008, 21(2): 27-32.
[7] Mates J M. Glutathione and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death[J]. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002, 34(1): 439-458.

(收稿日期 2011-10-21)