

生物发光法测定玉米籽粒中 ATP 的含量

樊广华 谷淑波 宁堂原 李向东

(山东农业大学农学院 泰安 271018)

摘要 本文采用生物发光法测定玉米籽粒中 ATP 含量, ATP 在 $0.01 \sim 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内, 最大发光强度与浓度的对数成线性关系, 线性回归方程 $Y = 0.9973 + 3.6651X$, 相关系数为 0.9991 ; RSD 值为 1.727% ; 检出限为 $7.80 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{mL}$; 平均回收率 94.5% , 灵敏度、精密度高, 结果准确。此法可用于玉米籽粒中 ATP 含量的测定。

关键词 生物发光法 玉米籽粒 ATP 含量

生物为维持其生命活动和执行各种生理功能都需要消耗能量。ATP 是一种可被生物直接利用的主要能量, 它在储存、输送和释放能量的过程中有着重要的地位。因此, 对其含量进行快速、准确的测定, 对研究生物生长发育和生物产品质量有重要的意义。文献报道用电泳法进行测定¹ 需经过滤纸电泳分离, 紫外分光光度计比色, 手续复杂; 采用高效液相色谱法² 仪器试剂昂贵操作手续繁琐, 不易推广。

用荧光素酶-荧光素的生物发光法是目前测定 ATP 最灵敏的方法, 已广泛应用。但这些应用大多是在药品制剂方面³, 植物器官 ATP 含量的测定报道甚少。本文我们分析测定玉米籽粒中 ATP 的含量, 方法简单, 灵敏度、精密度高, 结果准确, 拓宽该方法的应用范围。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

FG-300 发光光度计; 荧光素酶-荧光素; 荧光素酶系缓冲液(粉剂); 标准 ATP(粉剂)以上仪器和试剂均为中国科学院上海植物生理研究所生产; 三羟甲基氨基甲烷(TRIS)(含量 $\geq 99\%$); 盐酸(分析纯)。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光素酶液的配制 每支荧光素酶系缓冲液(粉剂)用 50mL 重蒸水溶解, 即成内含 $6606 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甘氨酸甘氨酸($\text{pH}7.6$), $1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 硫酸镁、 $372.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EDTA 的缓冲液。保存条件 4°C 。用上述缓冲液溶解荧光素酶-荧光素, 配成含荧光素酶-荧光素 $3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 即为测定所用的荧光素酶液。

1.2.2 样品的提取 称取剪碎的鲜样品 1g , 放入离心管中, 加 5mL 丙酮(浸没为好), 沸水浴加热 5min , 使丙酮挥发完全; 加 3mL TRIS-HCl 缓冲液(0.02M , $\text{pH}7.6$), 沸水浴加热至沸腾, 保温 10min , 离

心($3000\text{rads}/\text{min}$, 10min), 取上清液冰浴冷却, 供测定用。

1.2.3 标准样品的配制和工作曲线的制作 每支标准 ATP(粉剂)用 1mL 荧光素酶系缓冲液溶解, 即成 $27.55 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ATP 标准样品溶液, 然后用上述标准样品溶液配成 $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 6 种浓度的 6 个标准样品, 取荧光素酶系缓冲液 0.2mL (空白样品), 置反应杯中, 放入发光光度计的反应暗室, 注射 0.8mL 荧光素酶液, 记录发光峰值为相对发光强度, 作为荧光素酶系内源 ATP 本底, 按此步骤分别测定 $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 6 个不同浓度的 ATP 标准样品溶液相对发光强度, 记录其最大峰值(I), 将每个 ATP 标准样品溶液的相对发光强度分别扣除荧光素酶系内源 ATP 本底(既空白样品的发光强度)后, 取对数值作纵坐标, 将不同 ATP 标准样品浓度取对数值作横坐标, 绘制成 ATP 工作曲线(见图 1)。

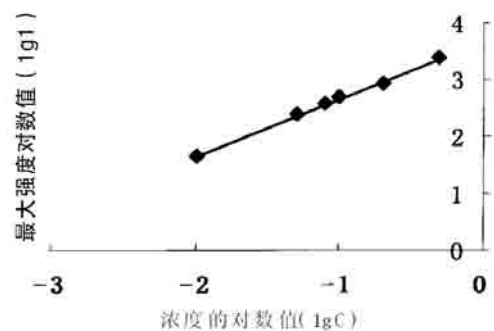


图 1 工作曲线

1.2.4 样品测定 取待测样品提取液 0.2mL , 置反应杯中, 放入发光光度计的反应暗室, 注射 0.8mL 荧光素酶液, 记录最大发光强度。

2 结果与讨论

2.1 工作曲线

经试验,ATP 标准溶液浓度在 $0.01 \sim 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间,相对发光强度高峰值的对数值与 ATP 标准样品浓度对数值之间呈良好的线性关系,回归方程 $Y = 0.9973X + 3.6651$,相关系数为 0.9991 。回归方程亦可表示为: $1\text{gl} = 0.99731\text{gC} + 3.6651$ 。

2.2 方法精密度试验

将同一样品按 1.2.2 节中的处理方法处理 6 次,再按 1.2.4 节中的测定方法分别测定。测得该方法的精密度: $\text{RSD} = 1.727\%$ 。

2.3 方法灵敏度试验

将空白样品按 1.2.2 节中的处理方法和 1.2.4 节中的测定方法重复测定 9 次,记录每次的最大发光强度值,由工作曲线方程计算出相对应的浓度,求出标准偏差(s),设工作曲线斜率为 A ,根据 IUPAC 对检出限的规定,检出限 $D_L = 3s/A = 3 \times 2.59 \times 10^{-5} / 0.9973 = 7.80 \times 10^{-5} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4 回收率实验

选择 2 个样品,每个样品重复 4 次,进行加标回收实验,考察方法的回收率,结果见表 1,平均回收率均为 94.5% , RSD 分别为 1.4% 和 2.5% 。

表 1 回收率测定数据

样 品	重 复	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}$			回收率 (%)	RSD (%)
		样品含量	加入量	测得量		
A	1	0.333	1.46	1.741	96	1.4
	2	0.334		1.705	94	
	3	0.312		1.701	95	
	4	0.328		1.687	93	
	平均	0.327		1.709	94.5	
B	1	0.122	1.34	1.362	93	2.5
	2	0.124		1.401	96	
	3	0.115		1.354	92	
	4	0.120		1.427	97	
	平均	0.120		1.387	94.5	

表 2 部分样品的测定结果 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

样 品	重 复	测定值		样 品	重 复	测定值	
		重复	平均			重复	平均
A	1	0.032	0.032	G	1	0.275	0.285
	2	0.032			2	0.295	
B	1	0.017	0.017	H	1	0.141	0.267
	2	0.017			2	0.126	
C	1	0.023	0.023	I	1	0.170	0.176
	2	0.023			2	0.182	
D	1	0.263	0.257	J	1	0.093	0.099
	2	0.251			2	0.105	
E	1	0.275	0.285	K	1	0.013	0.013
	2	0.295			2	0.013	
F	1	0.110	0.113	L	1	0.263	0.254
	2	0.115			2	0.245	

2.5 讨论

该生物发光反应为酶催化反应,只有当 ATP 浓度较低时与发光强度成正比。本实验适当加大酶的用量并适当控制样品中 ATP 浓度在 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下,可获得良好的线性关系;从表 2 可以看出当 ATP 含量较低时重复性好。因此,当待测样品浓度高时应适当稀释后再测定,则可获得满意的结果。荧光素酶反应的最适 pH 值 = $7.4 \sim 7.8$,最佳温度是 $23 \sim 25^\circ\text{C}$, 25°C 以上荧光素酶逐渐变的不稳定。因此,测定时使用空调或其他控温设备控制室内温度。注射荧光素酶的速度会影响最大发光强度,速度快时最大发光强度是稳定的,重复性好。

参考文献

- 1 刘翠英.电泳法测定 ATP 含量及影响因素的讨论,海峡药学,2000,12(1):102~103
- 2 李治洪,刘克江.高效液相色谱法测定 ATP 制剂含量,药物分析杂志,1997,17(4):245~247
- 3 刘苏亚,易刚,康格非,生物发光法测定 ATP 制剂含量,重庆医科大学学报,1994,19(2):142~143

Determination of ATP in maize kernel by bio-luminescence

Fan Guanghua Gu Shubo Ning Tangyuan Li Xiangdong

(College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian Shandong, 271018)

Abstract The contents of ATP in maize kernel were determined by bio-luminescence. A linear calibration graph which was $y = 0.9973x + 3.6651$ ($r = 0.9991$), was obtained in the range of $0.01 \mu\text{g} / \text{mL}$ to $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ with detection limit of $7.80 \times 10^{-5} \mu\text{g} \cdot \text{mL}$ for ATP. The RSD value was 1.727% and the average recovery of ATP was found to be 94.5% . The method was sensitive and accurate, can be applied to determinate the contents of ATP in plant organs.

Key words ATP content Maize kernel Bio-luminescence