

人参毛状根及愈伤组织中 ATP 动态变化的生物发光法测定

刘峻, 丁家宜, 张婷

(中国药科大学中药学院生物技术研究室, 江苏南京 210038)

Bioluminescent determination of ATP dynamic changes in hairy root and cultured callus of *Panax ginseng* C. A. Mey
LIU Jun, DING Jia-yi, ZHANG Ting (Laboratory of Biotechnology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China),
J. Plant Resour. & Environ. 2001, 10(2): 61-62

Abstract: ATP content of cultured callus and hairy root introduced by Ri plasmid of *Panax ginseng* C. A. Mey was detected by bioluminescence. The result showed that ATP content in hairy root is obviously higher than that in callus within a growth cycle. The highest ATP content in hairy root is 26.6×10^{-12} mmol/g (fresh weight), while ATP in callus is 2.68×10^{-12} mmol/g (fresh weight). Total saponin content in hairy root reaches 2.486% (dry weight), while the saponin in callus is 1.105% (dry weight). The hairy root induced by Ri plasmid has vigorous ability in secondary metabolism for ginseng saponin synthesis.

关键词: 人参; 毛状根; 愈伤组织; ATP; 生物发光法

Key words: *Panax ginseng* C. A. Mey; hairy root; callus; ATP; bioluminescence

中图分类号: S567.5⁺1; Q524 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2001)02-0061-02

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)系五加科(Araliaceae)人参属(*Panax* L.)植物,是一种贵重药材。随着植物生物技术的发展,Ri质粒介导产生的植物毛状根培养是植物基因工程和细胞工程相结合的一项新技术^[1,2]。人参毛状根系统的建立是对人参资源开发和利用的新形式。ATP是生物体的能量“通货”及重要的代谢调节物质,对生命活动至关重要。随着生物有机体的生长发育,ATP含量也呈一定的变化趋势,并反映出生物体的生长代谢情况。由于ATP测定操作复杂,仪器试剂昂贵^[3],不便于进行动态监测。本文采用改进的生物发光法^[4-6],对人参愈伤组织及转化的毛状根在生长周期中ATP的动态含量进行测定和比较。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

SHG-C生物化学发光测量仪(上海上立检测仪器厂),漩涡混合器(上海环宇仪器厂),800型离心沉淀器(上海手术器械厂),SHG-C微机工作站。标准ATP粉剂(Sigma公司),荧光素-荧光素酶,荧光素酶系缓冲液(购自中国科学院上海植物生理研究所),其余试剂均为分析纯。

1.2 植物材料

人参愈伤组织及人参毛状根由中国药科大学中药学院生物技术研究室提供。

1.3 方 法

1.3.1 ATP标准曲线的绘制 吸取200 μ L不同浓度的ATP标准液于玻璃管中,包括无ATP的对照管(吸取200 μ L 0.05mol/L Tris-盐酸缓冲液),放入反应池内。注入800 μ L荧光素-荧光素酶液启动发光,记录发光强度。发光强度的对数值为纵坐标,ATP浓度的指数为横坐标,ATP浓度在 10^{-12}

$\sim 10^{-9}$ mmol/L之间线性关系良好。每隔7d测定标准曲线,结果表明标准曲线重现性好,漂移很小。 $Y = 0.872\ 606X + 12.620\ 554$, $r = 0.99$,回收率 = 127.4%。

1.3.2 人参愈伤组织及毛状根中ATP的提取 定量称取人参毛状根和愈伤组织,立即置于玻璃匀浆器中,加入适量0.05 mol/L pH 7.6 Tris-盐酸缓冲液,在沸水浴中匀浆抽提10 min,取出冷却至室温。然后以2 000 r/min离心15 min,吸取上清液以Tris-盐酸缓冲液定容至5 mL待测。

1.3.3 培养组织增长倍数的计算 定量取人参毛状根和人参细胞于B₅无激素固体培养基上,培养条件为(25 \pm 2) $^{\circ}$ C,黑暗培养29 d。以培养物的增长倍数为标准测定生长量。增长倍数 = (收获生物量 - 接种生物量)/接种生物量。

1.3.4 人参愈伤组织及毛状根中ATP的测定 吸取200 μ L人参愈伤组织或毛状根提取液置于玻璃管中,放入反应池内,注入800 μ L荧光素酶液启动发光,并记录发光强度。ATP含量计算:ATP含量(鲜组织)mmol/g = $0.005 \times C/FW$ [式中C为ATP浓度(mmol/L),FW为样品鲜重(g)]。

1.3.5 人参毛状根及人参愈伤组织中人参皂甙含量的测定 参照章观德等^[7]方法,收获培养20 d后的人参细胞和人参毛状根干燥粉末用乙醚脱脂,90%甲醇冷浸后80 $^{\circ}$ C回流8 h,用水饱和的正丁醇多次萃取,减压回收并用甲醇定容至1 mL,即得人参总甙。以人参二醇为标准品(中国生物制品鉴定所)比色测定,根据标准曲线 $Y = 107.8X + 3.255$ 求得样品人参皂甙含量。

收稿日期: 2000-11-14

作者简介: 刘峻(1971-),男,山东青州人,硕士,主要从事中药生物技术及自由基生物学研究。

2 结果

2.1 人参毛状根和愈伤组织增长倍数及 ATP 含量

人参毛状根和愈伤组织在相同生长周期内的增长倍数及 ATP 含量变化见图 1 和图 2。从图 1 可看出,在相同培养时间,人参毛状根的增长倍数明显高于愈伤组织,前者大约是后者的 3~4 倍。图 2 表明人参毛状根中 ATP 含量明显高于同时期培养的愈伤组织,培养 25 d 时人参毛状根中 ATP 含量(以鲜重计)高达 26.6×10^{-12} mmol/g,而愈伤组织中仅为 2.68×10^{-12} mmol/g,前者约为后者的 10 倍。这表明毛状根是一类分生代谢能力很强的组织,在对数生物期内,组织代谢合成加快,因此 ATP 的含量较高。



图 1 人参毛状根和愈伤组织增长倍数对比

Fig. 1 Comparison of the growth rate of hairy root and callus of *Panax ginseng* C. A. Mey



图 2 人参毛状根和愈伤组织中 ATP 含量对比

Fig. 2 Comparison of ATP content of hairy root and callus of *Panax ginseng* C. A. Mey

2.2 人参毛状根和愈伤组织中人参皂甙含量

培养 29 d 后人参毛状根中人参皂甙含量(以干重计)高

达 2.486%, 是人参愈伤组织含量(1.105%)的 2 倍以上, 进一步说明人参毛状根是分生代谢能力较强的组织, 其次代谢产物人参皂甙的合成能力也较愈伤组织强。

3 讨论

(1) 影响 ATP 生物发光的因素很多, 酶反应对许多因素非常敏感(如酶的用量、反应体系的 pH 值、缓冲液系统和反应温度等)。本实验选择 pH 7.6、Tris-盐酸缓冲液系统以及 23~25℃ 的温度, 对酶反应是较适宜的。

(2) 从组织和体液中抽提 ATP 的关键取决于提取是否完全及是否对检测产生干扰。本实验采用沸水提取法, 优点是提取液对荧光素酶无干扰作用, 无须校正。该方法测定 ATP 具有简便、快速、灵敏、专一性强等特点。

参考文献:

- [1] 刘峻, 王建波, 丁家宜. Ri 质粒转化人参的研究[J]. 中国野生植物资源, 1999, (5): 6-10.
- [2] 王关林. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 237.
- [3] 顾建国, 荣沛, 王义明, 等. 反相 HPLC 法测定大鼠梗塞心肌组织中 ATP, ADP 与 AMP[J]. 中国药科大学学报, 1989, 20(2): 103.
- [4] Koop A, Cobbold P H. Continuous bioluminescent monitoring of cytoplasmic ATP in single isolated rat hepatocytes during metabolic poisoning[J]. Biochem J, 1993, 295: 165-170.
- [5] Koszegi T, Keller Mayer M, Kovacs F, et al. Bioluminescent monitoring of ATP release from human red blood cells treated with nonionic detergent[J]. J Clin Chem Clin Biochem, 1998, 26(10): 599-604.
- [6] 王维光. 虫荧光素酶系的制备及性质[J]. 植物生理学通讯, 1982(4): 38-41.
- [7] 章观德, 周志华, 王慕邹, 等. 人参的分析 II. 人参皂甙的测定[J]. 药学报, 1980, 15(3): 175.

(责任编辑: 宗世贤)