

铜绿微囊藻中磷酸腺苷的提取及分析

代瑞华^{1,2} 刘会娟¹ 曲久辉^{*1}

¹(中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室,北京 100085)

²(中国科学院研究生院,北京 100039)

摘要 比较了酸提取、有机溶剂提取、MgSO₄水溶液加热提取以及 MgSO₄水溶液加热超声波提取4种方式对磷酸腺苷(ATP、ADP和AMP)的提取效果,确定以 MgSO₄水溶液加热超声波提取效果最佳。采用 MgSO₄加热超声波提取时,2 mL提取液对 ATP、ADP和AMP的提取效果较好。将 ATP、ADP和AMP的混合标准溶液放于沸水浴中保温时,随着保温时间的延长,对 ATP和AMP的影响较大,而对ADP的影响相对较小。实验结果证明,以 MgSO₄水溶液为提取液,用100℃加热10 min后,在超声波细胞粉碎机中超声破碎10 min的提取效率最高,既简单又无毒。用反相高效液相色谱等强度洗脱分离与紫外检测分析藻细胞中的 ATP、ADP和AMP的含量,在较短的时间内(10 min)实现了较好的分离,分析准确而快速,是一较好的定性和定量分析方法。ATP、ADP和AMP的回收率分别为88%~97%、103%~107%和109%~115%,均在80%~120%之间,并且标准偏差和相对标准偏差均小于10%,证实了可以用加热超声波破碎提取,HPLC分析ATP、ADP和AMP的方法来提取和分析藻细胞中的ATP、ADP和AMP。

关键词 铜绿微囊藻,磷酸腺苷,提取

1 引言

生物的细胞中存在着3种磷酸腺苷,即三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)和磷酸腺苷(AMP),称为腺苷酸库。ATP、ADP和AMP是生物体新陈代谢的能量源泉,它普遍存在于生物细胞内,为细胞内各种需要能量的过程提供能量,是细胞生存的必需因素。在细胞中,ATP、ADP和AMP在某一时间的相对数量控制着细胞活动,并且通过ATP、ADP和AMP分子对某些酶分子进行变构调节来实现细胞能量的变化。这种细胞能量即是Atkinson等^[1-3]提出的能荷(energy charge, EC),它是指细胞中由ATP在全部腺苷酸中所占的比例,如式(1)所示:

$$EC = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]} \quad (1)$$

式(1)中[ATP]、[ADP]和[AMP]分别代表各物质的浓度。

EC代表了生物细胞中腺苷酸系统的能量状态。测定藻细胞中腺苷酸含量对于研究藻类生理生化现象和代谢过程都有重要的意义。根据ATP、ADP和AMP的变化或者能荷的变化,可以估计环境变化对藻类的影响^[4]、藻类的生物量^[5]以及藻类新陈代谢的状态^[5-7]等。本实验以铜绿微囊藻为例,讨论该藻细胞内ATP、ADP和AMP的提取方法以及分析方法。

从生物体中提取ATP、ADP和AMP的方法主要有3种:有机溶剂提取、酸提取以及热水或热缓冲溶液提取^[8]。这3种方法各有优缺点,有机溶剂提取对脂肪和蛋白质含量高的生物材料较为有利^[9],但对人体健康有影响,所以用这种方法提取必须注意人身安全;酸提取一定要保持低温(低于4℃),高温时ATP很容易被水解,而且酸提取后还必须中和,否则会因影响流动相的pH值而改变样品的停留时间,从而影响实验准确度。本研究确定了适合提取铜绿微囊藻细胞内ATP、ADP和AMP的方法,并对不同体积提取液对提取效果的影响及回收率进行了研究。

腺苷酸类分析方法主要有电泳法、层析法、酶学法和荧光素酶法等,其中较经典的是酶学法或荧光

2007-04-18 收稿;2007-08-30 接受

本文系国家自然科学基金(No. 50538090)和国家重点基础研究973计划(No. 2007CB407300)资助项目

* E-mail: jhqu@rcees.ac.cn

素酶法,但因其所需酶试剂种类繁多,实验操作烦琐,耗费高,分析费时致使应用受限。随着高效液相色谱(HPLC)的推广,用HPLC分析人体红细胞内或动物组织中腺苷酸水平的报道日渐增多^[10~12]。但国内迄今未见有用HPLC分析水中微生物或藻类细胞中腺苷酸水平的报道。为此,本研究采用高效液相色谱等强度洗脱分离与紫外检测方法分析微囊藻细胞内腺苷酸的含量,快速灵敏,结果满意。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

JY92-2D型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);HH-S型水浴锅(郑州长城科工贸有限公司);J2-HS型低温冷冻离心机(美国Beckman公司);L-2000系列高效液相色谱(日本Hitachi公司)。

甲醇为色谱纯(美国Fisher公司);HClO₄、乙醇、MgSO₄、K₂HPO₄、KH₂PO₄等试剂均为分析纯;5'-ATP钠盐,5'-ADP钠盐以及5'-AMP钠盐为分析纯(美国Sigma公司);实验用水为去离子水。

鲁哥氏固定液的配制:称取6 g KI溶于20 mL去离子水中,待完全溶解后,再加入4 g I₂溶解,然后加入80 mL水混合均匀。

2.2 藻细胞中的ATP、ADP和AMP的提取方法

取10 mL铜绿微囊藻以8000 r/min、温度为4℃时离心30 min,倒掉上清液,用以下4种方法提取:(1)酸提取 在冰浴中,加冷的5% HClO₄用超声波破碎提取10 min,用NaOH中和到pH为6,离心取上清液待测;(2)有机溶剂提取 取一定量沸腾的乙醇加入离心管中,摇匀,在沸水浴中蒸干乙醇后在冰浴中冷却,然后加入一定量的去离子水,在沸水浴中再保温10 min,取出并在冰浴中冷却后,离心取上清液待测;(3)热提取 向离心管中加入一定量的100℃沸腾的2 mmol/L MgSO₄提取液,摇匀,在沸水浴中保温10 min取出,在冰浴中冷却后,离心取上清液待测;(4)热提取+超声波提取 向离心管中加入一定量的100℃沸腾的2 mmol/L MgSO₄提取液,摇匀,在沸水浴中保温10 min取出,在冰浴中冷却,并且在冰浴中用超声波细胞粉碎机破碎10 min,离心取上清液待测。

2.3 标准溶液的配制

称取一定量ATP、ADP和AMP配成50 mmol/L储备液,再分别配成1、5、10、25、50、70和100 μmol/L标准溶液。

2.4 藻细胞计数

取少量混合均匀的藻细胞悬浮液,用鲁哥氏溶液固定后,在血球计数板上计数,每次至少计数两次,若两次相差超过20%,则需进行第3次计数。

2.5 色谱条件

采用高效液相色谱(HPLC, Hitachi-2000系列)分析藻细胞中的ATP、ADP和AMP。分析条件为:ODS色谱柱(250 mm×4.6 mm, Allsphere);流动相是0.05 mol/L KH₂PO₄-K₂HPO₄的缓冲溶液(内含1 mmol/L EDTA, pH=6)和甲醇,缓冲溶液与甲醇的比例为97.5:2.5(V/V),流速1 mL/min;柱温是(25±1)℃,检测波长259 nm,进样量20 μL。

3 结果与讨论

3.1 ATP、ADP和AMP的标准谱图

图1为高效液相色谱分析ATP、ADP和AMP的标准谱图。由图1可见,当采用ODS作为色谱分离柱,磷酸盐缓冲液与甲醇(97.5:2.5, V/V)为流动相时,ATP、ADP和AMP在10 min内就能被较好的分离,而且具有较好的峰形,可以用来对样品进行定性和定量分析。

3.2 标准曲线

配制一系列浓度的标准溶液,采用HPLC进行分析,用各标准品的峰高与其对应的浓度做标准曲线,结果如图2所示。可以看出,3种物质线性均较好,相关系数均大于0.99,可以为定量分析所用。

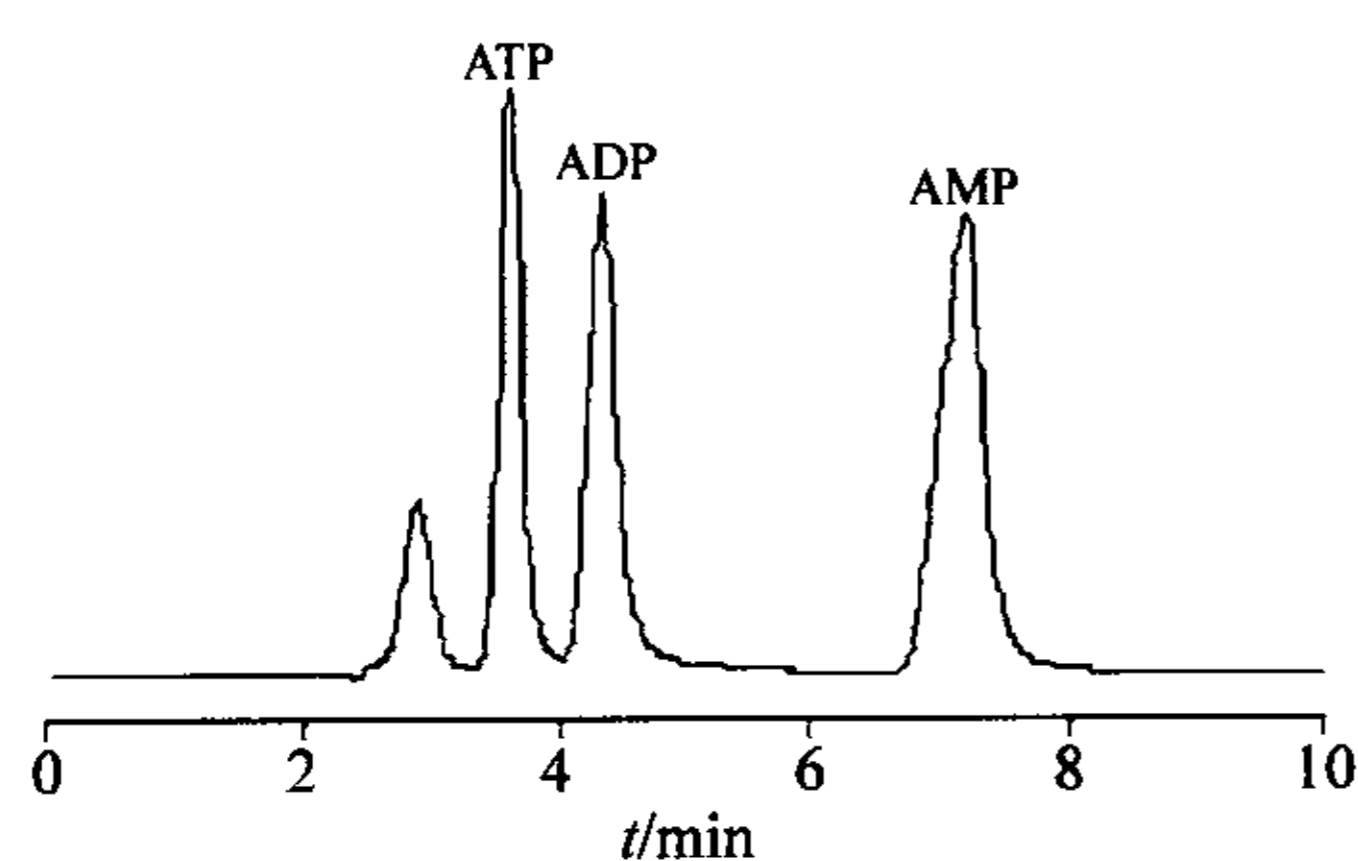


图 1 用高效液相色谱分析 ATP、ADP 和 AMP 的标准谱图

Fig. 1 HPLC profiles for standard adenosine triphosphate (ATP) ($R_t = 3.627$ min), adenosine diphosphate (ADP) ($R_t = 4.347$ min) and adenosine monophosphate (AMP) ($R_t = 7.200$ min)

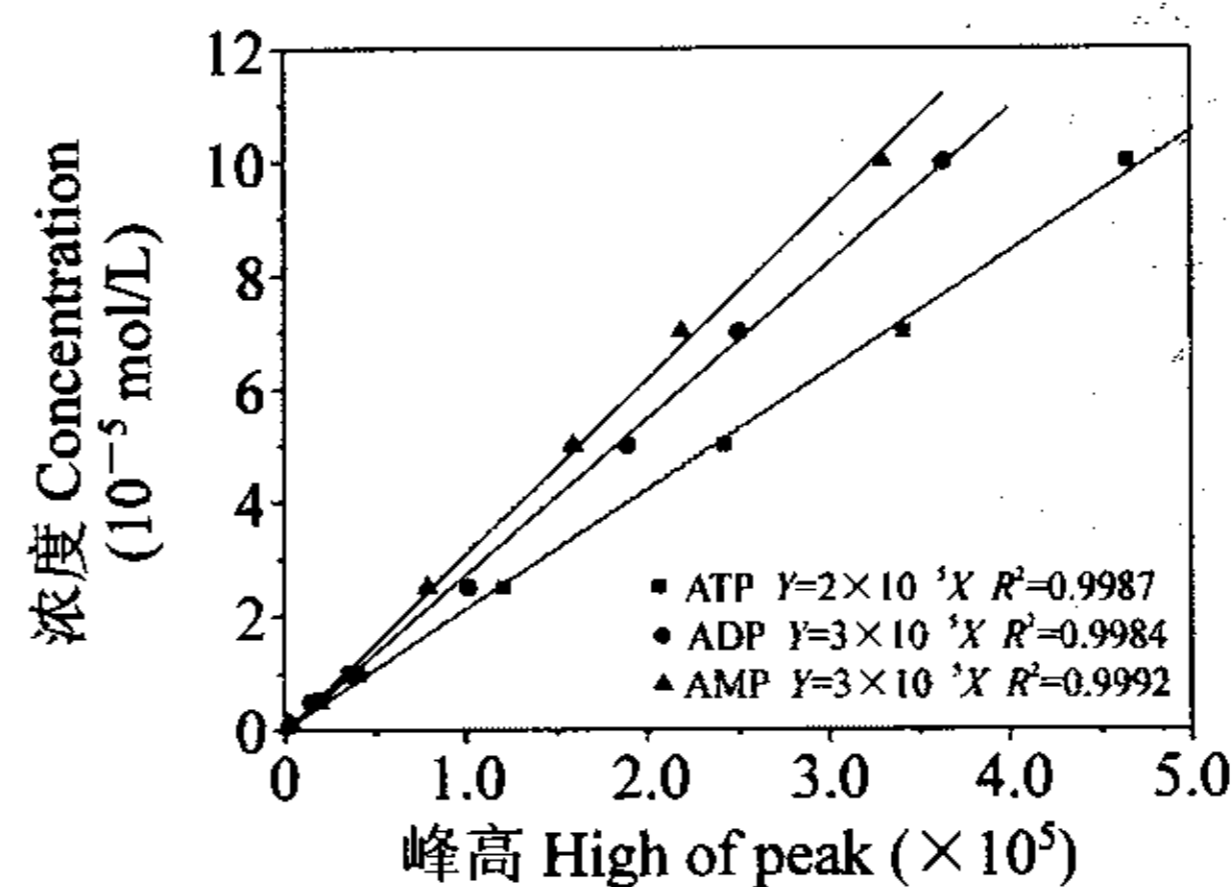


图 2 ATP、ADP 和 AMP 的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of ATP, ADP and AMP

3.3 不同提取方式对提取微囊藻中 ATP、ADP 和 AMP 的比较

取 10 mL 铜绿微囊藻培养基在 4℃ 下,以 8000 r/min 离心 30 min,倒掉上清液,再加入一定量的去离子水,重新悬浮藻细胞,然后再离心,洗掉藻细胞表面所带的各种营养盐,以消除对提取 ATP 等的影响。最后,在各个离心管中加入 1 mL 不同提取液,并且按照如前所述的提取方法进行提取,提取完毕后离心取上清液测定其 ATP、ADP 和 AMP 的量。结果如表 1 所示。

表 1 不同提取方式时铜绿微囊藻中 ATP 和 AMP 的比较

Table 1 Comparison of different methods for extracting ATP, ADP and AMP

提取方法 Extracting method	ATP (mol/cell)	ADP (mol/cell)	AMP (mol/cell)	EC
MgSO ₄ 加热提取 Boiling MgSO ₄ solution	7.29×10^{-17}	ND*	1.60×10^{-17}	0.82
MgSO ₄ 加热超声波提取 Boiling MgSO ₄ solution with ultrasonic	8.11×10^{-17}	ND	1.97×10^{-17}	0.81
冰的 HClO ₄ 提取 Ice HClO ₄	1.70×10^{-17}	ND	ND	1.00
热乙醇提取 Boiling ethanol extraction	7.59×10^{-17}	ND	8.41×10^{-18}	0.9

EC: 能荷 (energy charge); ND: 未检出 (not detected)。

铜绿微囊藻中的 ADP 含量极少,低于方法的检出限。从表 1 可以看出,4 种提取方式中 MgSO₄ 加热超声波对 ATP 和 AMP 的提取效果均最好。冰的 HClO₄ 提取效果最差,可能是由于温度控制不佳导致了 ATP 水解,并且酸中和步骤比较复杂,因此本实验不采取这种提取方法;热乙醇对 ATP 的提取效果较好,但对 AMP 的提取效果则比较差,并且这种方法提取所计算出的能荷的值可能会极大的偏离真实值。热提取的方式比较简便,效果较好,如果加上超声波提取效果会更好,大约可提高 12% 的提取效率。虽然这两种提取方式得出的能荷的值相差不大,但考虑到 ATP 和 AMP 提取的量,本实验采用热提取-超声波提取的方法来提取 ATP、ADP 和 AMP。

3.4 提取液体积对 ATP、ADP、AMP 提取效果比较

取 10 mL 铜绿微囊藻培养基 4℃ 以 8000 r/min 离心 30 min,弃除上清液。按 3.3 所述的方法洗涤离心两次。以 2 mmol/L MgSO₄ 为提取液,分别向各离心管中加入 1、2、5 和 10 mL 提取液,加热超声波提取,比较提取液体积对 ATP、ADP 和 AMP 的提取效果。结果见表 2。

表 2 不同体积提取液对 ATP、ADP 和 AMP 的提取效果

Table 2 Effect of different volume of extracting solution for ATP, ADP and AMP

提取液体积 Volume (mL)	ATP (mol/cell)	ADP (mol/cell)	AMP (mol/cell)	EC
1	1.00×10^{-16}	ND*	1.85×10^{-17}	0.84
2	1.03×10^{-16}	ND	2.41×10^{-17}	0.81
5	1.09×10^{-16}	ND	1.97×10^{-17}	0.85
10	1.03×10^{-16}	ND	ND	1.00

EC: 能荷 (energy charge); ND: 未检出 (not detected)。

从表 2 可以看出,铜绿微囊藻细胞中的 ADP 含量极少,在检出限以下。用 10 mL 提取液对 AMP 的提取效果是最差的;用 1 mL 提取液提取的效果也不佳。而用 2 mL 提取液对 AMP 的提取效果最好,但

对 ATP 的提取效果并不是最好;用 5 mL 提取液对 ATP 的提取效果最好,但对 AMP 的提取不是最佳。综合 ATP 和 AMP 的提取效果、它们的提取总量以及所得的能荷值,用 2 mL 提取液提取效果最好。

3.5 加热保温时间对 ATP、ADP 和 AMP 的影响

通过以上实验可知用加热超声波提取效果较好,但为了检验这种提取方法对 ATP、ADP 和 AMP 是否有破坏作用,实验将标准 ATP、ADP 和 AMP 混合溶液 4 份置于样品瓶中并放在 100℃ 水浴中保温,分别于 10、20、30 和 60 min 各取出一个样品瓶,常温冷却后用超声波破碎 10 min,然后测定 ATP、ADP 和 AMP 的浓度,结果如表 3 所示。从表 3 可以看出,随着保温时间的延长对 ATP 和 AMP

表 3 加热时间对 ATP、ADP 和 AMP 的影响

Table 3 Boiling affecting on concentration of ATP、ADP 和 AMP

保温时间 Heating time (min)	ATP (10^{-5} mol/L)	ADP (10^{-5} mol/L)	AMP (10^{-5} mol/L)
对照 Control	3.00	4.14	3.81
10	2.81	4.20	4.01
20	2.16	4.14	5.00
30	1.80	4.03	5.31
60	0.92	3.27	6.06

的影响较大。保温 60 min 后,ATP 损失了近 70%,而 AMP 增加 60%;虽然对 ADP 影响不大,但随着保温时间的延长,其含量也有所减少。相对而言,保温 10 min 对 ATP、ADP 和 AMP 影响均不大。所以,本实验取保温 10 min,超声波破碎 10 min 来提取样品。

3.6 ATP、ADP 和 AMP 的回收率

本实验以标准样品 ATP、ADP 和 AMP 进行回收率实验,以蒸馏水为介质,配制浓度为 0.5×10^{-5} 、 1×10^{-5} 、 2.5×10^{-5} 和 5×10^{-5} mol/L 的水样,先用 HPLC 分析其初始浓度,然后放入沸水浴中保温 10 min,取出冷却后在超声波细胞破碎仪中破碎 10 min,取出后再用 HPLC 分析其浓度。3 次平行实验,结果如表 4 所示。

由表 4 可知,ATP、ADP、AMP 的回收率分别为 88% ~ 97%、103% ~ 107% 和 109% ~ 115%,均在 80% ~ 120% 之间,并且标准偏差和相对标准偏差均小于 10%。说明用加热超声波破碎提取,再用 HPLC 分析 ATP、ADP 和 AMP 这种方法是比较准确可靠的,可以用此方法对藻细胞中的 ATP、ADP 和 AMP 进行提取和分析。

表 4 ATP、ADP 和 AMP 的回收率

Table 4 Recoveries of ATP, ADP and AMP

化合物 Compounds	添加浓度 Fortified level (mol/L)	平均回收率 Mean recovery (%)	标准偏差 SD (%)	相对标准偏差 RSD (%)
ATP	0.5×10^{-5}	96.2	7.7	8.0
	1.0×10^{-5}	94.6	4.0	4.2
	2.5×10^{-5}	89.9	1.8	2.0
	5.0×10^{-5}	88.8	1.4	1.6
AMP	0.5×10^{-5}	103.5	9.1	8.8
	1.0×10^{-5}	106.6	3.6	3.4
	2.5×10^{-5}	106.3	0.90	0.84
	5.0×10^{-5}	106.4	0.6	0.55
ADP	0.5×10^{-5}	109.9	3.9	3.5
	1.0×10^{-5}	113.6	0.98	0.86
	2.5×10^{-5}	114.5	0.40	0.35
	5.0×10^{-5}	114.4	0.38	0.34

实验结果表明,用 $MgSO_4$ 作提取液,加热超声波对 ATP、ADP 和 AMP 的提取效果最好,并且当提取液体积为 2 mL 时,提取液中 ATP 和 AMP 含量较高。将 ATP、ADP 和 AMP 的混合标准溶液放于沸水浴中保温时,随着保温时间的延长,对 ATP 和 AMP 的影响比较大,而对 ADP 的影响相对较小。在本实验所采用的液相色谱条件下,ATP、ADP 和 AMP 在 10 min 内实现了较好的分离,操作简单,分析准确而快速。

References

- 1 Atkinson D E. *A. Rev. Microbiol.*, **1969**, 23: 47 ~ 68
- 2 Atkinson D E, Walton G M. *J. Biol. Chem.*, **1967**, 242: 3239 ~ 3241
- 3 Chapman A G, Fall L, Atkinson D E. *J. Bact.*, **1971**, 108:1072 ~ 1086
- 4 Ivanovici A M. *Helgolander Meeresunters*, **1980**, 33: 556 ~ 565
- 5 Karl D M, Holm-Hansen O. *Mar. Biol.*, **1978**, 48: 185 ~ 197
- 6 Bickel H, Lyck S, Utkilen H. *Phycologia.*, **2000**, 39 (3): 212 ~ 218
- 7 Witzel K P. *Arch. Hydrobiol.*, **1979**, 12: 146 ~ 165
- 8 Wang Wei-Guang (王维光), Gu Jian-Ben (顾俭本). *Plant Physiology Communication* (植物生理学通讯), **1986**, 5: 54 ~ 55
- 9 Gu Zeng-Hui (顾增辉), Xu Ben-Mei (徐本美). *Plant Physiology Communication* (植物生理学通讯), **1983**, (5): 55 ~ 60
- 10 Hasi Surong (哈斯苏荣), Du Xiao-Yan (杜小燕), Jiang Jin-Shu (蒋金书), Zhu Bei-Lei (朱蓓蕾). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2005**, 33(2): 288
- 11 Miao Yu (缪宇), Wang Cheng-Long (王承龙), Yin Hui-Jun (殷惠军), Shi Da-Zhuo (史大卓), Chen Ke-Ji (陈可冀). *Journal of Perking University: Health Sciences* (北京大学学报:医学版), **2005**, 37(2): 201 ~ 202
- 12 Pan Feng (潘峰), Sun Wei (孙玮), Lu Ju (路菊), Zhang Zheng-Zhi (张正治), Liu Jun-Ze (柳君泽), Li Bing (李兵). *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae* (第三军医大学学报), **2006**, 28(24): 2481 ~ 2482

Extraction and Analysis of Adenosine Phosphate in Cells of *Microcystis Aeruginosa*

Dai Rui-Hua^{1,2}, Liu Hui-Juan¹, Qu Jiu-Hui^{*1}

¹(State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco Environmental Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

²(Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract Four methods, perchloric acid extraction, organic solvent extraction, boiling bitter salt solution extraction and boiling bitter salt solution with ultrasonic extraction, were used to extract adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP) from the cells of *Microcystis aeruginosa*. Bitter salt solution with ultrasonic extraction was testified to be the optimum method. The optimum volume of extracting solution was 2 mL by the method of boiling bitter salt solution with ultrasonic. When ATP, ADP and AMP were put in boiling water bath, the concentration of ATP and AMP changed largely but the content of ADP changed smaller. In this study, the cells were put into boiling water bath for 10 min and then were treated with ultrasonic for 10 min with bitter salt solution as extractive solution. This method was simple and nonpoisonous. A reversed phase high-performance liquid chromatography with UV detection was used for the determination of ATP, ADP and AMP. They were distinctly separated within 10 min. Moreover, the method has the advantage of high sensitivity, rapidity and accuracy. The recovery of ATP, ADP and AMP was 88% - 97%, 103% - 107%, 109% - 115% respectively. The relative standard deviations were less than 10%.

Keywords *Microcystis aeruginosa*, adenosine phosphate, extraction

(Received 18 April 2007; accepted 30 August 2007)