

徐 婷,薛金嫒,陈亚东,等.一种简易检测 6-磷酸葡萄糖的方法[J].江苏农业科学,2019,47(10):209-212.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.047

一种简易检测 6-磷酸葡萄糖的方法

徐 婷,薛金嫒,陈亚东,刘 华,陈钰佩

(浙江农林大学农业与食品科学学院,浙江杭州 311300)

摘要:6-磷酸葡萄糖(G6P)是多种代谢途径的关键中间产物,一种简易高效的 G6P 测定法建立将有利于深入了解其在有机体中的代谢状态。前期研究发现,基于离子排斥色谱柱 Bio-Rad Aminex HPX-87H 与示差折光检测器的高效液相色谱分析无法有效地将这一化合物与 1,6-二磷酸果糖、3-磷酸甘油酸区分开来。因而,拟建立一种简便、专一且灵敏,检测浓度范围为 0.2~10 $\mu\text{mol/L}$ 的 G6P 的酶学荧光检测法。同时,我们以模式真核生物酵母为材料,对 G6P 的提取方法进行改进,以使样本的测定更加稳定。

关键词:6-磷酸葡萄糖;高效液相色谱;酶学荧光检测;酵母

中图分类号:Q532+.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)10-0209-04

6-磷酸葡萄糖(G6P)是细胞内一种常见的化合物,它由葡萄糖在己糖激酶的作用下生成,在细胞内主要参与 3 种代谢途径:(1)进入糖酵解途径,为生物合成提供细胞能量或碳骨架;(2)进入磷酸戊糖代谢途径,为细胞提供还原型辅酶 II(NADPH)和核酸前体;(3)进入糖原合成途径,为糖原合成提供 G1P(葡萄糖-1-磷酸)^[1]。因此,G6P 是生物代谢途径的一个关键节点,其含量会影响细胞活力。已有研究表明,在磷酸戊糖途径中,葡萄糖经葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

(G6PD)的作用生成 G6P,同时伴随着 NADPH 和中间产物的形成,它们在多种生物和非生物胁迫的应答反应中起着重要的作用^[2]。

目前,提取动物细胞内 G6P 的方法有 2 种,分别为 Antonio 法^[3]和 Ritter 法^[4],都是使用三乙醇胺溶液提取 G6P。测定动物细胞内 G6P 的方法则有色谱法^[5-7]、高效液相色谱法(HPLC)^[8]和酶学法^[9]。色谱法须要配备昂贵的色谱仪,如 Nicolet 公司的 Magna-IR750 傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR),APPLIED SYSTEMS 公司的 Durasampl IR 衰减全反射附件(ATR)^[10]。高效液相色谱法虽然可以测定代谢过程中大多数有机酸和糖,但是在试验过程中发现不能有效分离 G6P、果糖-1,6-二磷酸、3-磷酸甘油酸。而酶学荧光定量法^[11]通过放大检测信号,可以提高酶学测定的灵敏度^[12-13]和准确性,与高效液相色谱相比,该方法更为有效、经济。

收稿日期:2018-01-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:31370287)。

作者简介:徐 婷(1992—),女,安徽马鞍山人,硕士研究生,主要从事油脂代谢分子生物学和生物化学研究。E-mail:1209250518@qq.com。

通信作者:陈钰佩,硕士,主要从事油脂代谢分子生物学和生物化学研究。E-mail:shuiweipei2014@163.com。

- pressure in hypertensives: a dose-response trial[J]. Eur J Clin Nutr, 2013, 67(1): 64-70.
- [16] 梅四卫,朱涵珍.大蒜研究进展[J].中国农学通报,2009,25(8):154-158.
- [17] Qiu Z, Lu X, Li N, et al. Characterization of garlic endophytes isolated from the black garlic processing[J]. Microbiologyopen, 2018, 7(1): e547.
- [18] Kim J H, Hwang C E, Lee C K, et al. Characteristics and antioxidant effect of garlic in the fermentation of Cheonggukjang by *Bacillus amyloliquefaciens* MJ1-4[J]. J Microbiol Biotechnol, 2014, 24(7): 959-968.
- [19] 王继华,徐世强,张木清.解淀粉芽孢杆菌的研究进展[J].亚热带农业研究,2017,13(3):191-195.
- [20] Caulier S, Gillis A, Colau G, et al. Versatile antagonistic activities of soil-borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against phytophthora infestans and other potato pathogens[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 143.
- [21] Uwamahoro M C, Massicotte R, Hurtubise Y, Gagné-Bourque F, et al. Evaluating the Sporicidal Activity of Disinfectants against

- stridium difficile* and *Bacillus amyloliquefaciens* Spores by Using the Improved Methods Based on ASTM E2197-11[J]. Front Public Health, 2018, 6: 18.
- [22] Ren H, Su Y T, Guo X H. Rapid optimization of spore production from *Bacillus amyloliquefaciens* in submerged cultures based on dipicolinic acid fluorimetry assay[J]. AMB Express, 2018, 8(1): 21.
- [23] Mendis H C, Thomas V P, Schwientek P, et al. Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0193119.
- [24] Prajapati A S, Pawar V A, Panchal K J, et al. Effects of substrate binding site residue substitutions of xynA from *Bacillus amyloliquefaciens* on substrate specificity[J]. BMC Biotechnol, 2018, 18(1): 9.
- [25] Omony J, de Jong A, Krawczyk A O, et al. Dynamic sporulation gene co-expression networks for *Bacillus subtilis* 168 and the food-borne isolate *Bacillus amyloliquefaciens*: a transcriptomic model[J]. Microb Genom, 2018, 4(2): 1-13.

目前,在具有细胞壁的真核生物(诸如酵母与植物)中,测定 G6P 的酶学方法鲜有报道。细胞壁的存在很大程度上增加了 G6P 的提取难度。本研究试图以模式真核生物——酵母为材料,建立以 6-磷酸葡萄糖脱氢酶促反应^[14]为基础的荧光定量法,用于测定细胞内 G6P 的含量。该方法通过硫辛酰胺脱氢酶作用,使 G6PD 的产物与刃天青进行反应生成荧光物质^[15],放大 G6P 信号,从而达到微量检测的目的。鉴于植物细胞与酵母均存在细胞壁,本研究建立的方法对植物体内 G6P 的测定也具有一定的指导借鉴意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 Y10000 型野生酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4742,由笔者所在实验室保存。

1.1.2 供试试剂 刃天青(Sigma, R7017),三乙醇胺(Sigma, 900257),6-磷酸葡萄糖-(Sigma, V900924),6-磷酸葡萄糖脱氢酶(Sigma, A5885),硫辛酰胺脱氢酶(Sigma, D5540),烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Sigma, NADP-RO),3-磷酸甘油酸(Sigma, P8871),果糖-1,6-二磷酸[生工生物工程(上海)股份有限公司, A60048-0025],甲醇(Amethyst, 116481),三氯甲烷(上海凌峰化学试剂有限公司,分析纯),硫酸(西陇化工股份有限公司,分析纯)。

1.1.3 供试仪器 小型台式离心机(Eppendorf 5424),-80℃低温冰箱(Thermo Fisher Scientific TSE240V),-20℃低温箱(SANYO MDF-U539-C),多功能酶标仪(*synergyH1),高速冷冻离心机(*CF16RX II),真空冷冻干燥机(D-37520),高效液相色谱仪(Agilent1200 型)配 RID 检测器,Agilent 色谱工作站(美国安捷伦科技有限公司),离子排斥色谱柱(Bio-Rad Aminex HPX-87H)。

1.2 酵母细胞培养

在 30℃条件下,将细胞置于缺尿嘧啶(URA)的固体葡萄糖 SC 培养基板上培养 2 d 左右,然后选取单菌落于 3 mL 液体半乳糖 SC 培养基中培养 1 d。测定 $D_{600\text{ nm}}$ 后转接至 10 mL 液体半乳糖 SC 培养基中, $D_{600\text{ nm}}=0.05$,培养约 10 h 左右,取 $D_{600\text{ nm}}=1.00$ 的菌液 10 mL(细胞数约为 2.0×10^8 ,干质量为 28 mg),5 000 g、离心 5 min 后弃上清,用预冷的磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤并悬浮细胞,再转移至 2 mL 离心管中离心后弃上清,于-80℃保存。

1.3 提取方法

1.3.1 Antonio 法 G6P 的提取方法参照 Antonio 等的报道^[3],取细胞数为 2.0×10^8 (干质量为 28 mg)左右的酵母细胞用 1 mL PBS 溶液洗涤 2 次,去上清,然后加入 1 mL 预冷的甲醇/三氯甲烷混合液(体积比为 2:1),混合后涡旋,于-20℃静置 2 h,加入 500 μL 50% 甲醇溶液(4 mmol/L tricine 两性离子缓冲液,pH 值为 5.4),18 000 g、4℃离心 10 min,转移上层水相,用 1 mL 50% 甲醇溶液对三氯甲烷相进行再次提取。合并 2 次提取液,在高速冷冻离心机中干燥后于-80℃保存。

1.3.2 Ritter 法 G6P 的提取方法参照 Ritter 等的报道^[4],取细胞数为 2.0×10^8 (干质量为 28 mg)左右的酵母细胞用 1 mL PBS 溶液洗涤 2 次,去上清,加入 600 μL 50% 甲醇溶液

(4 mmol/L tricine 两性离子缓冲液,pH 值为 5.4),超声波处理 5 min,重复 1 次后转移至 2 mL 离心管中,加入 600 μL 三氯甲烷,涡旋振荡 30~60 s,收集提取液约 1 mL。最后,在真空离心干燥机中干燥后于-80℃保存。

1.3.3 Antonio 改进法 在 Antonio 法的基础上进行改进,取细胞数为 2.0×10^8 (干质量为 28 mg)左右的酵母细胞用 1 mL PBS 溶液洗涤 2 次,去上清,加入 200 μL 预冷的甲醇/三氯甲烷混合液(体积比为 2:1),0.3 g 酸洗过的玻璃珠(直径为 0.2~0.4 mm)涡旋仪振荡 6 min(30 s 冰上,30 s 涡旋交替),加入 500 μL 50% 甲醇溶液(4 mmol/L tricine 两性离子缓冲液,pH 值为 5.4),18 000 g、4℃离心 10 min,转移上层水相,用 1 mL 50% 甲醇溶液对三氯甲烷相进行再次提取。合并 2 次提取液,加入等体积的 ddH_2O ,于-80℃冷冻后转移至真空冷冻干燥机,干燥完全后于-20℃保存。

1.3.4 Ritter 改进法 在 Ritter 法的基础上进行改进,取细胞数为 2.0×10^8 (干质量为 28 mg)左右的酵母细胞用 1 mL PBS 溶液洗涤 2 次,去上清,加入 200 μL 预冷的 50% 甲醇溶液(4 mmol/L tricine 两性离子缓冲液,pH 值为 5.4),0.3 g 酸洗过的玻璃珠(直径为 0.2~0.4 mm)涡旋仪振荡 6 min(30 s 冰上,30 s 涡旋交替),再次加入 800 μL 50% 甲醇溶液,1 mL 三氯甲烷,混匀离心后取上层水相,18 000 g、4℃离心 10 min。提取物中加入等体积的 ddH_2O ,于-80℃冷冻后转移至真空冷冻干燥机,干燥完全后于-20℃保存。

1.4 G6P 的荧光检测法

将提取物溶于 50 μL ddH_2O 中,取 10 μL 样品或 G6P 的标准品(浓度依次为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$)于 96 孔板中,加入 90 μL 混合液:50 mmol/L 的三乙醇胺(TEA)(pH 值为 7.6)、1.0 mmol/L MgCl_2 、100 $\mu\text{mol/L}$ NADP^+ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 刃天青、0.1 U/mL G6PD 和 0.2 U/mL 硫辛酰胺脱氢酶。反应液在室温条件下静置 30 min 后,在激发光 530 nm、荧光 590 nm 条件下进行检测,对照组以 TEA 替代 G6PD,其余条件保持一致。对照组的荧光检测值为非 G6P 的干扰物质造成的荧光读数。

1.5 高效液相色谱检测法

1.5.1 色谱条件 离子排斥色谱柱:Bio-Rad Aminex HPX-87H 型(300 mm \times 7.8 mm,9 μm),流动相为 5 mmol/L H_2SO_4 溶液,流量为 0.6 mL/min,柱温为 60℃,检测器为 RID,进样体积为 20 μL 。

1.5.2 标准品及混合标准品溶液的配制 用超纯水分别配制浓度为 1 g/L 的 1,6-二磷酸果糖、3-磷酸甘油酸和 6-磷酸葡萄糖标准品以及混合标准品的储备溶液,然后按 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、16.0、32.0、64.0 mmol/L 的浓度配制 G6P 标准溶液以确定其测定范围,接着按照“1.5.1”节中的色谱条件进行分析。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱法检测 G6P 的非专一性

HPLC 常用于糖浓度的测定,在检测过程中,G6P 标准品的保留时间和 1,6-二磷酸果糖、3-磷酸甘油酸极为接近。如图 1 所示,1 g/L 1,6-二磷酸果糖、3-磷酸甘油酸和 6-磷酸葡萄糖标准品的保留时间分别为 5.928、6.365、

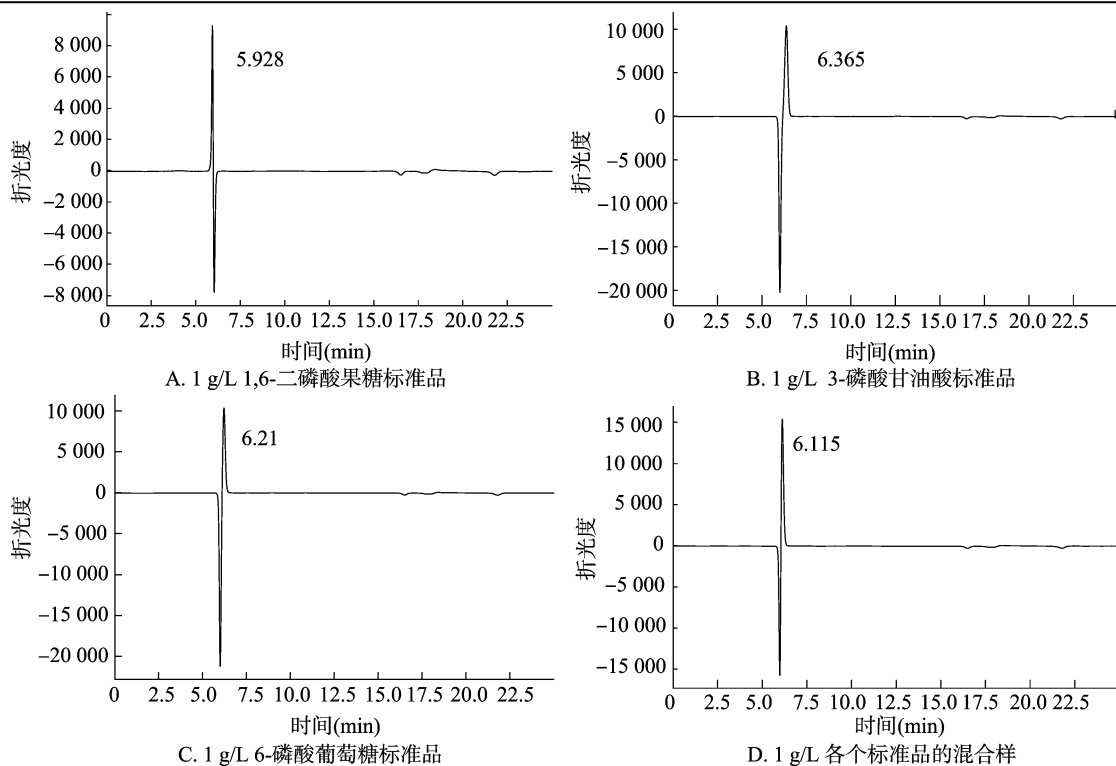


图1 不同标准品的色谱图及保留时间

6.210 min, 峰面积分别为 368 984、231 419、232 975 mAU · min, 而混合样品中只出现 1 个保留时间, 为 6.115 min, 峰面积为 736 738 mAU · min (面积约为 3 种标准品面积之和)。HPLC 难以有效区分以上 3 种物质, 因此无法通过该方法测定细胞内 G6P 的浓度。

2.2 酶学荧光检测法的建立

酶学荧光检测法是通过放大酶学信号, 以检测 G6P 的微量变化。如图 2 所示, 游离态 G6P 在 G6PD 的作用下形成 6-磷酸葡萄糖内酯, 并将 NADP^+ 还原生成 NADPH, 而 NADPH 在硫辛酰胺脱氢酶的作用下可以与刃天青反应, 生成荧光性物质。G6P 浓度的计算公式如下:

$$\text{G6P 浓度} = \frac{(\text{试验值} - \text{背景值}) - \text{标准曲线的截距}}{\text{标准曲线的斜率} \times \text{样品质量}} \times \text{稀释倍数}。$$

其中, 背景值 (即没有加 6-磷酸葡萄糖脱氢酶处理) 代表样品中含有的游离态 NADPH 及其他干扰物质的含量; 试验值 (即加入 6-磷酸葡萄糖脱氢酶处理) 代表样品中 G6P 和干扰物质的含量。

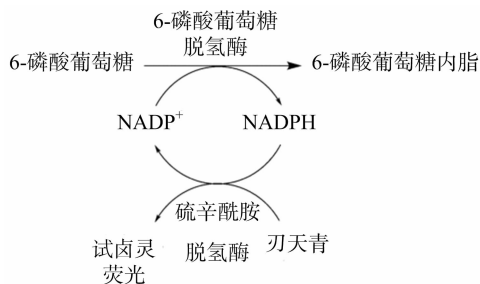


图2 G6P 检测的反应原理

利用标准品制作 G6P 标准曲线, 试验重复 2 次, 如图 3

所示, 在 0.2 ~ 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, G6P 含量和反应产物的荧光强度呈线性关系, 且标准误差值较低。为避免系统误差对试验结果的影响, 每次测定 G6P 的含量时均重新制作标准曲线。使用 HPLC 测定 G6P 时, 样品量至少为 1 mL, 检测浓度范围为 0.4 ~ 32.0 mmol/L, 而酶学荧光检测法只需 10 μL 的样品, 检测的摩尔浓度范围为 0.2 ~ 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 。说明使用酶学荧光检测法测定 G6P, 灵敏度高, 稳定性好, 对待测样品中 G6P 的浓度要求低。

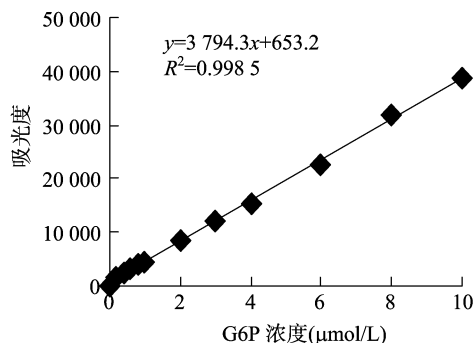
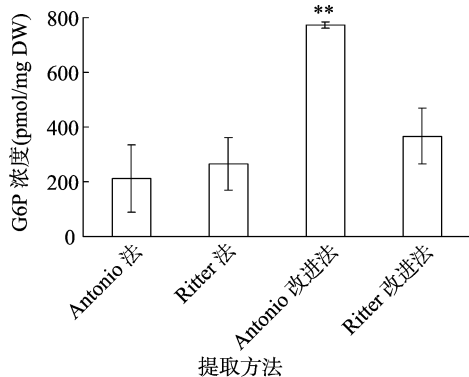


图3 G6P 浓度测定的线性范围

2.3 G6P 提取方法的优化

Antonio 法和 Ritter 法是目前已知可以提取细胞内 G6P 的 2 种方法^[3-4], 其分别采用冻融和超声波处理方式来破碎动物细胞, 但这 2 种方法均无法完全破碎酵母细胞, 在浓缩提取液时, 高速离心浓缩须持续离心 24 h 且效果不佳。为解决上述问题, 在 Antonio 法和 Ritter 法的基础上本研究使用玻璃珠和冻干机进行细胞破碎和提取液冻干处理。如图 4 所示, 在 Antonio 法和 Ritter 法的基础上进行改进, 结果发现 Antonio 改进法与其他 3 种方法得到的 G6P 浓度存在极显著差异。

已有文献报道,动物细胞内 G6P 含量约为 714 pmol/mg DW, Antonio 法和 Ritter 法所测得的 G6P 浓度仅分别为 211.8、264.9 pmol/mg DW,且标准误差大,这 2 种方法可行性较低^[3]。Antonio 改进法和 Ritter 改进法测得的 G6P 浓度分别为 774.0、365.8 pmol/mg DW。因此,使用 Antonio 改进法 - 酶学荧光定量检测法可有效测定酵母体内 G6P 的浓度。



**表示在 0.01 水平上差异显著

图4 不同的提取方法对酵母细胞内 G6P 浓度测定的影响

经研究推测, Antonio 改进法提取效率高的原因是(1)通过玻璃珠使酵母细胞破碎完全,可提高所测定的 G6P 浓度值,此方法也适用于含有细胞壁的植物细胞;(2)提取的过程中先加入三氯甲烷,可以破坏细胞膜引发细胞死亡,使细胞内的相关酶瞬间失活,从而减少了由 G6P 降解所引起的损耗;(3)通过真空冻干机对样品进行冷冻干燥处理,由于冷冻干燥机可以将温度维持在 -20℃ 以下,以保证将所有样品冻干至粉末状,大大提高了提取效率。

3 结论

本试验在原有测定 G6P 方法的基础上进行适度改进,从而建立了适用于具有细胞壁细胞的提取方法。此方法亦可应用于植物细胞中,但由于植物细胞比酵母细胞结构更为复杂,还须要进一步试验以摸索并改善相关条件。该方法除了可用于测定 G6P 的含量,还可用于胞内 NAD⁺ 和 NADPH 含量的测定。由于目前普遍使用试剂盒检测动物细胞内 NAD⁺ 和 NADPH 的含量,但试剂盒法并不适用于大样本及植物细胞的测定,而使用 Antonio 改进法 - 酶学荧光定量检测法可以大大降低成本,并为进一步测定具有细胞壁的细胞体内 NAD⁺ 和 NADPH 的浓度提供借鉴。

参考文献:

[1] Legras J L, Merdinoglu D, Cornuet J M, et al. *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history [J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(10): 2091 - 2102.

[2] 于定群, 汤浩茹, 张 勇, 等. 高等植物葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶的研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2012, 28(7): 800 - 812.

[3] Zhu A P, Romero R, Petty H R. An enzymatic fluorimetric assay for glucose - 6 - phosphate; application in an in vitro Warburg - like effect [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 388(1): 97 - 101.

[4] Ritter J B, Genzel Y, Reichl U. Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: optimization using experimental design [J]. *Analytical Biochemistry*, 2008, 373(2): 349 - 369.

[5] Buchholz A, Takors R, Wandrey C. Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic - electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques [J]. *Analytical Biochemistry*, 2001, 295(2): 129 - 137.

[6] van Dam J C, Eman M R, Frank J, et al. Analysis of glycolytic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae* using anion exchange chromatography and electrospray ionization with tandem mass spectrometric detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 460(2): 209 - 218.

[7] Bhattacharya M, Fuhrman L, Ingram A, et al. Single - run separation and detection of multiple metabolic intermediates by anion - exchange high - performance liquid chromatography and application to cell pool extracts prepared from *Escherichia coli* [J]. *Analytical Biochemistry*, 1995, 232(1): 98 - 106.

[8] 杨海燕, 法 芸. 离子排斥色谱法同时测定生物质液体燃料发酵液中的有机酸、糖、醇 [J]. *化学分析计量*, 2014, 23(增刊 1): 13 - 15.

[9] Antonio C, Larson T, Gilday A, et al. Quantification of sugars and sugar phosphates in *Arabidopsis thaliana* tissues using porous graphitic carbon liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1172(2): 170 - 178.

[10] 陈洁梅, 潘 涛, 陈星旦. 二阶导数光谱预处理在用 FTIR/ATR 方法定量测定葡萄糖 - 6 - 磷酸和果糖 - 6 - 磷酸中的应用 [J]. *光学精密工程*, 2006, 14(1): 1 - 7.

[11] Gibon Y, Vigeolas H, Tiessen A, et al. Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system [J]. *Plant Journal*, 2002, 30(2): 221 - 235.

[12] Self C H. Enzyme amplification—A general method applied to provide an immunoassisted assay for placental alkaline phosphatase [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1985, 76(2): 389 - 393.

[13] Johansson A, Ellis D H, Bates D L, et al. Enzyme amplification for immunoassays - detection limit of 100th of an attomole [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1986, 87(1): 7 - 11.

[14] De Jong D W, Woodlief W G. fluorimetric assay of tobacco leaf dehydrogenases with resazurin [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1977, 484(2): 249 - 259.

[15] Batchelor R H, Zhou M. Use of cellular glucose - 6 - phosphate dehydrogenase for cell quantitation: applications in cytotoxicity and apoptosis assays [J]. *Analytical Biochemistry*, 2004, 329(1): 35 - 42.