

富锗人参细胞的培养及含量测定

刘 峻, 一家宜(中国药科大学中药学院生物技术研究室, 南京 210038)

摘要:目的:通过在培养基里加入二氧化锗,培养获得富锗人参细胞(GSC),并对其进行组分分离及探讨锗的分布情况。方法:应用胶束增溶分光光度法测定富锗GSC中锗的含量。结果:在5ppm的富锗培养基上培养的GSC中锗的转化率最高(11.18%)。锗在GSC中可能主要以和蛋白质及多糖结合的形式而存在,且单位蛋白质结合的锗的量大于单位糖结合的锗的量。结论:GSC对GeO₂转化率随GeO₂的培养浓度增加而减少,证明GSC对GeO₂有一定的吸收度,GSC可望成为有机锗转化的合适载体。

关键词:锗;胶束增溶分光光度法;人参细胞(GSC)

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2000)05-0288-02

Determination of Germanium in Enriched Germanium *Panax ginseng* Cells (GSC) by Micellar Solubilizing Spectrophotometry

LIU Jun, DING Jia-yi (Department of Biotechnology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE: To obtain enriched germanium *ginseng* cell (GSC) and to detect the Distribution of germanium in GSC.

METHODS: Enriched GSC was examined by micellar solubilizing spectrophotometry. **RESULTS:** GSC contains the highest (11.18%) germanium in 5ppm enriched germanium MS culture medium. Germanium largely conjugated with protein and polysaccharide and it mostly conjugated with protein. **CONCLUSION:** GeO₂ transforming ratio decrease along with increase the concentration of germanium MS culture medium, which proved GSC can absorb germanium and it's a bearer for GeO₂ transforming organic germanium.

KEY WORDS: germanium, micellar solubilizing spectrophotometry, panax ginseng cell (GSC)

研究表明微量元素不仅为人体生长发育所必须,而且对疾病具有特异的治疗效果,已日渐受到人们的重视^[1]。其中,锗(germanium, Ge)对人体有着独特的保健及治疗功效,亦越来越受到关注。本实验通过富锗培养基培养获得了富锗GSC,且利用胶束增溶分光光度法^[2-4](锗与苯基荧光酮-溴化十六烷基三甲基铵络合)测定了GSC培养物中锗的含量,建立了简便快速的测定方法,并对有机锗在GSC中分布进行了探讨。

1 仪器,试剂与材料

1.1 离心甩干机, AF-1型电热干燥箱(东台电器厂),粉碎机(河北家务科学仪器厂), 754型分光光度计(上海第三分析仪器厂)。二氧化锗(GeO₂) (上海化学试剂采购供应站), 溴化十六烷基三甲基胺 CTAB(北京医药站分装); 苯基荧光酮 Phenylfluone, PF; (上海染料化工十四厂); 其余试剂均为分析纯,富锗GSC为本室在含有GeO₂的MS培养基上养的GSC。

2 方法与结果

2.1 富锗GSC的培养

将GSC分别接种至含Ge 5ppm, 10ppm, 30ppm, 40ppm的1000ml MS培养基上,放在温室中培养45天,使其充分成长。

2.2 样品处理

将收集培养的GSC称重,以蒸馏水反复冲洗,甩干(转速为2000r/min),重复3次,直至洗去细胞表面存在的锗。干细胞置60℃干燥后粉碎成末,称重,置于干燥器内备用。

2.3 标准液及试剂的配制

锗标准液:精密称取GeO₂标准品适量,置小烧杯中,加40%NaOH液数滴,加水微热使其溶解后转移至100ml容量瓶中去,定容后使成为每1ml相当于20μg的锗。

1%CTAB水溶液:将CTAB适量放入水中,加热溶解后,趁热过滤,备用。

0.03%PF无水乙醇溶液:将PF适量溶于无水乙醇及H₂SO₄(1:6)溶液中,用无水乙醇稀释到500ml,摇匀,放置一夜,过滤后使用。

2.4 测定条件

2.4.1 PF浓度对吸收值的影响:在相同的Ge浓度条件下,加入2~10ml不同量的0.03%PF溶液后进行测定,结果540nm吸收值变化不明显,故本实验中0.03%PF的用量定为5ml。

2.4.2 测定时间与吸收值的关系:在540nm处每隔一段时间对同一测定液进行测定,结果表明,在同一条件下A

值在 1~ 3h 内稳定,故实验应控制在 3h 之内完成。

2.5 标准曲线的制备

精密吸取锗标准液 0.0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0ml 分置 100ml 容量瓶中,依次加入 H₂SO₄(1:1) 20ml, 1% CTAB 10ml, 0.03% PF 10ml, 定容后,在 540nm 处测定吸收值。计算出回归方程为: $A = -0.024 + 0.0575C$, $r = 0.9998$ (详见图 1)。

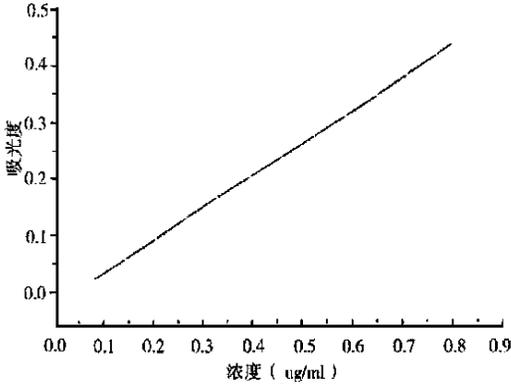


图 1 锗标准曲线

2.6 样品的准备

分别精密称取含 GeO₂ 不同培养浓度培养的 GSC 适量,沸水煮提 2 小时,过滤,滤渣再煮提 1.5 小时,过滤,合并两次滤液,浓缩至 10ml,加入 95% 乙醇 85ml,使含醇量达 85%,过滤,将沉淀干燥,即得糖和蛋白质粗品。GSC 沸水煮提出后的残余物干燥,即得细胞骨架。

2.7 样品的处理及测定

2.7.1 将样品加入浓 HNO₃ 5ml 于 190℃ 油浴中进行消化至干后,加入 H₂O₂ 5ml,再加热至干,取出,冷至室温,加 40% NaOH,加水溶解,过滤,转移至 100ml 容量瓶中,按测定条件同 2.5,在 540nm 处测定吸收值(以不含 GeO₂ 培养基培养的人参细胞提取物做为空白)。不同锗浓度培养的 GSC 中干细胞,细胞骨架,粗多糖和蛋白质含锗量(详见表 1)。

表 1 不同锗浓度培养条件下的 GSC 含锗量

培养基中锗的浓度(ppm)	5	10	30	40
干细胞含锗量(μg/g)	85.07	143.53	200.98	253.80
细胞骨架含锗量(μg/g)	45.81	61.59	94.25	118.43
糖和蛋白质粗品含锗量(μg/g)	213.15	473.56	588.48	865.70

不同锗(GeO₂) 浓度培养的 GSC 转化成为有机锗的转化率详见表 2。

表 2 GSC 对有机锗的转化率

	5ppm	10ppm	30ppm	40ppm
干细胞含锗量	85.07μg/g	143.53μg/g	200.98μg/g	253.80μg/g
干细胞重	6.57g	6.51g	6.40g	6.32g
转化率	11.18%	9.34%	4.29%	4.01%

2.7.2 取 5ppmGeO₂ 培养基上培养的 GSC 适量同 2.7.1 提取方法,在浓缩液中加入(NH)₂SO₄ 固体,使(NH)₂SO₄ 饱和度达 50%,静置一夜,过滤,滤渣即为粗蛋白,干燥备用。滤液适当浓缩,加 95% 乙醇使含醇量达 85%,静置片刻,过滤,滤渣即为多糖,干燥备用。将多糖和蛋白质分别消化,然后按测定吸收值的方法处理,得蛋白中含 342μgGe/g,多糖中含 177μgGe/g,细胞骨架含锗量 45.81μg/g。详见图 2。

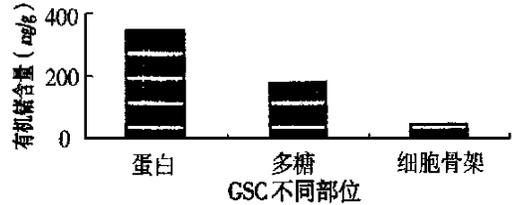


图 2 有机锗在 GSC 中的分布

3 讨论

3.1 实验结果表明,通过在培养基中添加 GeO₂ 可使 GSC 在生长过程中富集锗,进而实现对锗的生物转化。经检测(详见表 1),GeO₂ 被 GSC 吸收后主要和蛋白质及多糖结合的形式而存在,而在细胞骨架中则结合的较少,可能是锗在细胞中主要与蛋白质及多糖结合,但具体的结合机理和位点有待进一步讨论。

3.2 GSC 吸收 GeO₂ 的量随培养液中 GeO₂ 的浓度增加而减少,虽然外源 GeO₂ 在高浓度时 GSC 吸收锗的绝对量高,但相对转化率则较低。而在 5ppmGeO₂ 培养基上培养的 GSC,锗转化为有机锗的转化率最高(11.18%)(详见表 2)。检测结果发现(详见图 1),每克 GSC 多糖中含 177μg 锗,每克 GSC 蛋白质中含 342μg 锗,每克 GSC 细胞骨架中含 44μg 锗,说明锗在人参细胞中可能易于和蛋白质结合。

3.3 CTAB 在较低温度下(约 15℃ 以下)的溶解度较低,易析出结晶。此时可将 CTAB 在水浴上加热,溶解后应用。因 PF 溶液是用无水乙醇作溶剂,而无水乙醇极易挥发,所以采取及时加塞和低温保存等方法,以免造成浓度不同从而导致误差。

参考文献:

[1] 蔡君峰,赵恒,孙劲彦,等.富锗人参的研制[J].人参研究,1994,2:33.
 [2] 陈齐,戴春雷,王宇新.分光光度法测定富锗人参细胞[J].中国药科大学学报,1996,27(3):172
 [3] 陈青川,杨惠芬.锗的光度分析进展[J].光谱实验室,1994,11(6):25.
 [4] 张德良,许洪沛.锗的胶束增溶分光光度法[J].分析化学,1975,3(3):203.