

生物发光法微生物快速检测试剂的性质 及其影响因素研究*

张菊梅^{1,2,3} 吴清平^{1**} 李程思¹ 吴慧清¹

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)¹

(中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)² (中国科学院研究生院 北京 100049)³

摘要: 研究了 ATP 生物发光微生物快速检测试剂的反应动力学、反应最适温度、pH 以及各种影响因素。在 ATP 生物发光反应中, 测试系统中 D-荧光素用量为 40 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对反应已经足够; 发光脉冲计数 CPM 值随反应时间的延长不断降低, 开始的 1min 内, 其 CPM 值下降最快, 然后下降速度不断减缓; 反应的最适温度为 24℃ ~ 25℃; 而体系的最佳 pH 为 7.2 ~ 7.4。配制好的发光试剂溶液置于 4℃ 保存 45h, 可以保持 86% 的活力, 在 25℃ 时保温 1h, 活力下降较少, 随时间的增加, 活力逐渐下降, 到 6.5h 时, 仅剩 53.5% 的活力, 而在 33℃ 时, 随着保温时间的延长, 酶活力下降较快, 保温 1.5h, 活力剩下 59.1%, 因此保存温度对发光试剂活力的影响非常大。各种化学物质如酸、碱、盐及表面活性剂都会抑制 ATP 发光反应, 当 NaCl 浓度达到 1.5g/L 时, 即可以抑制 52.5% 的发光, TritonX-100 及酸、碱对系统均有一定的影响, CTAB、SDS 及 TCA 则严重抑制发光反应。

关键词: 生物发光, 微生物, 快速检测试剂, 性质, 影响因素

中图分类号: Q93-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0036-06

Study on the Characteristics and Influential Factors of Microbial Rapid Detection Reagent by Bioluminescence*

ZHANG Ju-Mei^{1,2,3} WU Qing-Ping^{1**} LI Cheng-Si¹ WU Hui-Qing¹

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Culture Collection and Application,

Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)¹

(South China Sea Institute of Oceanology, Academia Sinica, Guangzhou 510301)²

(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)³

Abstract: In this assay, the reaction kinetics, optimum temperature, pH and various influential factors of ATP microbial rapid detection reagent by bioluminescence were studied. The results showed that it's enough for detection system to have 40 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ D-Luciferin. The light production decreased fastest in the first minute of reaction, then began to decay slowly. The optimal reaction temperature was 24℃ ~ 25℃ and the optimal pH was pH 7.2 ~ 7.4 in the reaction system. In addition, when stored at 4℃ for 45h, the dissolved reagent solution could keep its 86% activity. When preserved at 25℃, the enzyme activity decreased less for 1h, and degraded gradually as time went by and only left 53.5% of its activity after 6.5h. While stored at 33℃, the enzyme activity decreased quickly with the time and only left 59.1% after 1.5h. The result indicated that storage temperature was a very important influential factor to the activity of reagent. Meanwhile, different chemical substance such as acid, alkali, salt and surfactants inhibited the ATP bioluminescent reaction. When the concentration of NaCl reached 1.5g/L, it could inhibit 52.5% light production. Triton X-100, acid, and alkali also had some effects on the reaction, while CTAB, SDS and TCA would inhibit the bioluminescent reaction seriously.

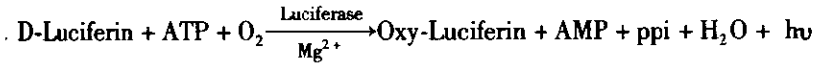
Key words: Bioluminescence, Microorganism, Rapid detection reagent, Characteristic, Influential factor

* 广东省科技攻关项目 (No. 2003B30902)

** 通讯作者 Tel:020-87688132/87680942, Fax:020-87688132, E-mail: zhangjm926@126.com, wuqp@gdas.ac.cn

收稿日期: 2005-07-22, 修回日期: 2005-10-21

微生物数量检测是微生物分析检测中的重要项目,传统的方法以培养为基础无法快速得到结果,不能满足食品、药品及化妆品企业进行生产质控和出入境检验检疫、质监及疾控部门进行环境卫生监督等现场检测的要求,而 ATP 生物发光检测技术在微生物快速检测方面的应用具有很强的优势。ATP 生物发光技术的原理是萤火虫荧光素酶 (Firefly Luciferase) 以 D-荧光素 (D-Luciferin)、三磷酸腺苷 (ATP) 和 O_2 为底物,在 Mg^{2+} 存在时,将化学能转化为光能,发出光量子,反应可表示如下:



ATP 既是荧光素酶催化发光的必需底物,又是所有生物生命活动的能量来源,在荧光素酶催化的发光反应中,ATP 在一定的浓度范围内,其浓度与发光强度呈线性关系^[1]。D'Eustachio 和 Levin 的研究表明,各生长时期的细菌均有较恒定水平的 ATP 含量,因此,提取细菌的 ATP,利用生物发光法测出 ATP 的含量后,即可推算出样品中的含菌量,整个过程仅为十几分钟^[2~4]。由于生物发光法无需培养过程,操作简便、灵敏度高,数分钟内可得到结果,具有其它微生物检测方法无法比拟的优势,是目前检测微生物最快的方法^[5~7]。

在 ATP 生物发光反应中,荧光素酶及荧光素是反应的关键组分,在本项目研究中,将荧光素酶及荧光素组合在一起制备了微生物快速检测试剂盒。由于 ATP 生物发光是酶反应,反应体系中各种因素均可影响到发光效率,因此对微生物快速检测试剂的反应动力学、反应最适温度、pH 以及各种影响因素进行研究,将为试剂盒的应用提供参考^[8,9]。

1 材料与方法

1.1 材料

牛血清白蛋白 (BSA)、三氯醋酸 (TCA)、Glycylglycine、 $MgSO_4$ 、EDTA、KOH、 HNO_3 、TritonX-100、CTAB、SDS 等由广东环凯微生物科技有限公司提供。

ATP、DTT 购于 Sigma 公司。

萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase, 简称 FL, 编号 041208)、D-荧光素 (D-Luciferin, 简称 Ln, 编号 041120)、生物发光法微生物数量快速检测试剂盒——复合发光试剂 (简称发光试剂, 编号 041208)、无菌超纯水等由本实验室制备。

SHG-C 生物化学发光测量仪,上海上立检测仪器厂生产。

LTD20G 超级恒温水浴仪 (Grant)。

1.2 实验方法

- 1.2.1 试剂制备: (1) 25mmol/L Glycylglycine 缓冲液 (简称 GB): 含 25mmol/L Glycylglycine、5mmol/L $MgSO_4$ 、0.5 mmol/L EDTA、0.5 mg /L BSA、0.5 mmol /L DTT, 分别调 pH 至 6.5、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.5。(2) 25mmol/L Glycylglycine 含 20g/L NaCl 缓冲液 (GB-NaCl): 含 25mmol/L Glycylglycine、5mmol/L $MgSO_4$ 、0.5 mmol/L EDTA、0.5 mg /L BSA、0.5 mmol /L DTT、20g/L NaCl, 调 pH 至 7.2。(3) 用无菌超纯水将 KOH、 HNO_3 、TCA、TritonX-100、CTAB、SDS 配制成一定浓度。(4) 标准 ATP 溶液: 用无菌超纯水配制成 $10^{-5} \sim 10^{-11}$ mol/L。(5) FL 溶液: 用 pH7.2

25mmol/L GB 配制成使用浓度。(6) 发光试剂溶液: 分别用 pH7.2 25mmol/L GB、无菌超纯水配制成使用浓度。(7) Ln 溶液: 用 50 mmol/L GB 配成 1mg/mL。

1.2.2 Ln 用量与发光值的关系: 于发光管中依次加入 100 μ L 10^{-7} mol/L ATP 溶液、Ln、25mmol/L pH7.2 GB, 摇匀, 再加入 100 μ L FL, 立即摇匀, 并置于生物发光检测仪中进行发光脉冲计数。其中 1mg/mL Ln 溶液的用量分别为 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 μ L, 用 pH7.2 GB 使体系总体积至 1mL。记录脉冲发光计数值。测试环境温度 23 $^{\circ}$ C ~ 24 $^{\circ}$ C。

1.2.3 ATP 生物发光反应动力学曲线: 于发光管中依次加入 800 μ L 25mmol/L pH7.2 GB、100 μ L 10^{-5} mol/L ATP 溶液、100 μ L 发光试剂, 立即摇匀, 并置于生物发光检测仪中进行连续发光脉冲计数, 记录发光脉冲计数值。测试环境温度 24 $^{\circ}$ C。

1.2.4 温度对测试的影响: 于发光管中依次加入 800 μ L 25mmol/L pH7.2 GB、100 μ L 10^{-7} mol/L ATP 溶液, 置超级恒温水浴中至恒定温度后, 加入预温好的 100 μ L 发光试剂溶液, 立即摇匀, 并置于生物发光检测仪中进行发光脉冲计数, 记录发光脉冲计数值。测试反应温度分别为: 10 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、21 $^{\circ}$ C、22 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、24 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、26 $^{\circ}$ C、27 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C。

1.2.5 pH 对测试的影响: 将配制好的不同 pH 的 25mmol/L GB, 置于 25 $^{\circ}$ C 超级恒温水浴中。于发光管中依次加入 800 μ L 25mmol/L GB、100 μ L 10^{-7} mol/L ATP、100 μ L 发光试剂溶液, 立即摇匀, 并置于生物发光检测仪中进行发光脉冲计数, 记录发光脉冲计数值。观察 25 $^{\circ}$ C 时不同 pH 下其发光值的变化。

1.2.6 配制后的发光试剂在不同温度下的衰减曲线测定: 将配制好的发光试剂溶液分别置于 4 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、33 $^{\circ}$ C, 一定时间后再分别测试其相应的发光脉冲计数值。开始间隔 0.5h 测一次, 而后间隔 1h 测一次, 长时间观察其活力变化。

1.2.7 酸、碱、盐及表面活性剂对发光的影响: 25mmol/L pH7.2 的 GB 及 GB-NaCl 按比例调配成含 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10、20g/L NaCl 的混合 GB, 于水浴中恒温至 25 $^{\circ}$ C。依次于发光管中加入 800 μ L 25mmol/L pH7.2 的含一定浓度的混合 GB、100 μ L 10^{-7} mol/L ATP, 再加入 100 μ L 发光试剂, 立即摇匀, 并置于生物发光检测仪中进行发光脉冲计数。测试环境温度 25 $^{\circ}$ C。用 KOH、HNO₃、三氯醋酸 (TCA)、TritonX-100、CTAB、SDS 等干扰剂, 同上进行发光检测。

2 结果与讨论

2.1 Ln 用量与发光值的关系

在 1mL 反应体系中, 当 ATP 浓度为 10^{-7} mol/L 时, 添加 Ln 的量分别为 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 μ g。从试验结果 (图 1) 可以看出, 随着 Ln 浓度的增加 (5 ~ 40 μ g/mL), 发光脉冲计数 CPM 值逐渐增大, 当达到 45 μ g/mL 以上时 CPM 值不再增加, 接近饱和。试验表明, 测试系统中 Ln 用量为 40 ~ 50 μ g/mL 是足够的。

2.2 ATP 生物发光反应动力学曲线

在发光反应体系中, 当反应达到起始的发光脉冲计数最大值后, 随反应时间的延

长其发光不断减弱, 开始的 1min 内, 其 CPM 值下降最快, 以后随时间下降速度不断减缓 (图 2), 在 10min 或更长的时间内均可以测到。

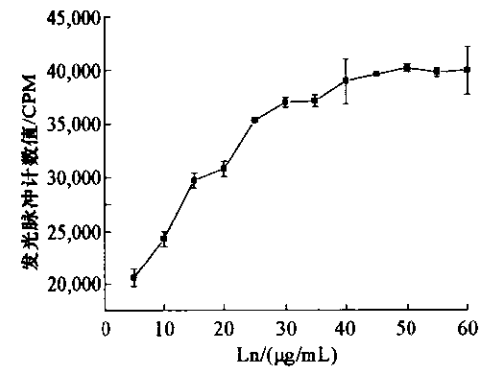


图 1 Ln 的用量与发光强度的关系

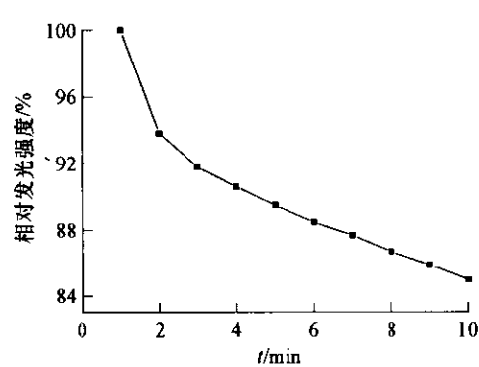


图 2 ATP 生物发光反应动力学曲线

2.3 温度对生物发光反应的影响

在 25mmol/L pH7.2 GB 缓冲体系中测试不同温度下的发光反应, 结果 (如图 3) 表明, 随着温度的升高, 发光脉冲计数值增加, 在 24℃ ~ 25℃ 达到最高值, 26℃ ~ 28℃ 时趋于平缓, 当温度超过 28℃ 时, 发光值开始下降。因此, 反应的最适温度为 24℃ ~ 25℃。

2.4 pH 对测试的影响

在 25℃ 条件下, 分别测试了缓冲体系的 pH 值为 6.5、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.5 的发光 CPM 值, 结果如图 4。

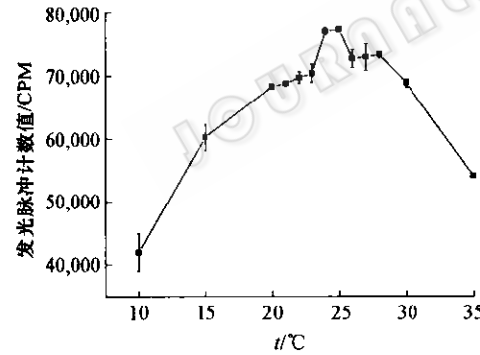


图 3 温度对生物发光反应的影响

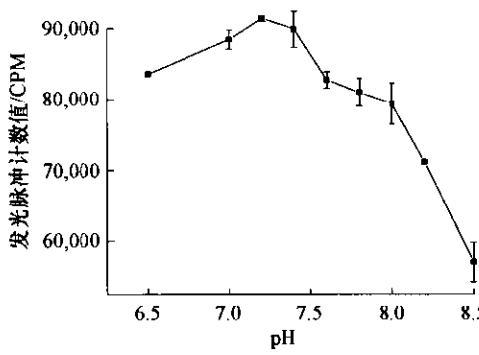


图 4 不同 pH 缓冲体系对测试的影响

从实验结果可以看出, 体系的最佳 pH 为 7.2 ~ 7.4。

2.5 配制后的发光试剂溶液在不同温度下的衰减曲线

在 4℃、25℃ 和 33℃ 温度条件下, 配制的发光试剂溶液活力随时间的变化趋势结果如表 1 及图 5。

表 1 4℃ 冷藏发光试剂使用液的活力随时间变化表

放置时间 (h)	0	45	144
活力回收率 (%)	100.0	86.0	73.0

配制好的试剂溶液置于 4℃ 保存，放置 45h 及 144h 以后进行发光检测，活力回收率分别为 86.0%、73.0%。

图 5 表明，配制的发光试剂溶液在 25℃ 时保温 1h，活力下降较少，随时间的增加，活力逐渐下降，到 6.5h 时，仅剩 53.5% 的活力。而在 33℃ 时，活力下降较快，保温 1.5h，活力剩下 59.1%。由此可以看出，配制好的试剂应特别注意温度的影响。当天使用不完，置于 4℃ 冷藏是较好的选择。

2.6 酸、碱、盐及表面活性剂对发光的影响

在 25℃，25mmol/L pH7.2 GB 缓冲液的 1mL 测试体系中，测定了 0.5 ~ 20g/L 的 NaCl 对发光反应的影响。结果发现 NaCl 对生物发光反应的影响非常明显，当 NaCl 浓度达到 1.5g/L 时，即可以抑制 52.5% 的发光（图 6）。

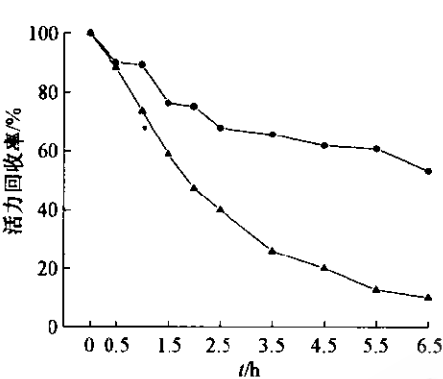


图 5 检测试剂盒在不同温度下的活力随时间变化曲线
●—25℃，▲—33℃

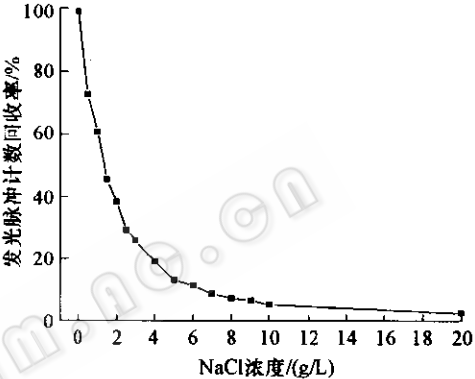


图 6 NaCl 对生物发光反应的影响

分别在测试系统中添加 KOH、HNO₃、TCA、TritonX-100、CTAB 和 SDS 作为干扰剂，考察它们对发光反应的影响。从表 2 可以看出，TritonX-100 及酸、碱对系统均有一定的影响，而 CTAB、SDS 及 TCA 严重抑制发光反应。

表 2 酸、碱及表面活性剂对发光反应的影响

影响物质	在系统中的浓度 (mmol/L)	发光脉冲计数 回收率 (%)	影响物质	在系统中的浓度 (g/L)	发光脉冲计数 回收率 (%)
KOH	0	100	Triton X - 100	0	100
	1	95		1.0	90
	2	93		3.0	87
	5	88		5.0	82
	10	62		7.5	81
HNO ₃	0	100	CTAB	0	100
	6	73		0.1	5
	12	73		1.0	9.9 × 10 ⁻³
	30	84		3.0	7.6 × 10 ⁻³
	60	79		5.0	7.9 × 10 ⁻³
TCA	0	100	SDS	0	100
	5	89		0.1	3.4 × 10 ⁻³
	10	53		1.0	3.8 × 10 ⁻³
	25	5 × 10 ⁻³		3.0	3.7 × 10 ⁻³
	50	4 × 10 ⁻³		5.0	3.8 × 10 ⁻³

3 结论

在 ATP 生物发光反应中, 测试系统中 D-荧光素用量为 40 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 时对反应已经足够; 发光脉冲计数 CPM 值随反应时间的延长不断降低, 开始的 1min 内, 其 CPM 值下降最快, 然后下降速度不断减缓; 通过反应温度试验, 随着温度的增加, 发光脉冲计数值在增加, 在 24 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 达到最高值, 26 $^{\circ}\text{C}$ ~ 28 $^{\circ}\text{C}$ 时趋于平缓, 当温度超过 28 $^{\circ}\text{C}$ 时, 发光值开始下降。因此, 反应的最适温度为 24 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$, 与文献报道一致; 体系的最佳 pH 为 7.2 ~ 7.4。配制好的发光试剂溶液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 可以保持较长时间的活力, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时保温 1h, 活力下降较少, 随时间的增加, 活力逐渐下降, 到 6.5h 时, 仅剩 53.5% 的活力。而在 33 $^{\circ}\text{C}$ 时, 随着保温时间的延长, 酶活力下降较快, 保温 1.5h, 活力剩下 59.1%, 因此保存温度对发光试剂活力的影响非常大, 配制好的试剂不应长时间置于室温或高温环境中。

各种化学物质如酸、碱、盐及表面活性剂都会抑制 ATP 发光反应, 当 NaCl 浓度达到 1.5g/L 时, 即可以抑制 52.5% 的发光, TritonX-100 及酸、碱对系统均有一定的影响, 而 CTAB、SDS 及 TCA 严重抑制发光反应, 因此实际使用时应特别注意抑制因素的影响。

参考文献

- [1] LaRossa R A. Methods in Molecular Biology, Vol. 102: Bioluminescence Methods and Protocols, Totowa, New Jersey: Humana Press, 1998. 3 ~ 20.
- [2] 舒柏华, 赵志耀, 徐顺清. 等. 发光学报, 1999, 20 (1): 77 ~ 80.
- [3] Chappelle E W, Levin G V. Biochem Med, 1968, 2: 41 ~ 52.
- [4] D'Eustachio A J, Levin G V. Bact Prpc, 1967, 121.
- [5] Squirrel D J, Price R L, Murphy M J. Analytica Chimica Acta, 2002, 457: 109 ~ 114.
- [6] Werlein H D. Meat Science, 2001, 59: 165 ~ 168.
- [7] Griffiths M W. Food Technology, 1996, 6: 63 ~ 72.
- [8] Lember N, Idahl L A. Biochem J, 1995, 305 (3): 929 ~ 933.
- [9] Galis I, Jiraskova J. Biol Plant, 1993, 35 (1): 147 ~ 150.