

利用生物发光分析技术快速检测 微生物的方法学研究

舒柏华 赵志耀 徐顺清 周宜开

(同济医科大学环境医学研究所, 武汉 430030)

摘要 阻碍三磷酸腺苷(ATP)-虫萤光素酶发光体系用于微生物快速检测的主要因素之一, 在于使用了不适当的非微生物 ATP 清除方法和微生物 ATP 提取方法. 文章对非微生物 ATP 的清除和微生物 ATP 提取方法进行了实验研究. 选择 Triton X-100 作为非微生物 ATP 淬取剂. Apyrase 作为非微生物 ATP 清除剂. 三氯醋酸作为微生物 ATP 的淬取剂. 观察了淬取剂及清除剂浓度对淬取效果及 ATP 分析的影响. 最佳工作浓度分别为: Triton X-100 0.15%、apyrase 0.1%、三氯醋酸 1.5%. 对超声、加热超声、加热、三氯醋酸、氯仿淬取微生物 ATP 的方法作了对比研究, 认为三氯醋酸方法更简便, 易于推广使用.

关键词 快速微生物学, 三磷酸腺苷(ATP), 生物发光

1 引 言

ATP-虫萤光素酶发光体系用于分析从微生物中提取的 ATP, 为在数分钟内检测微生物提供了一种简便而灵敏的方法^[1]. 近几年来, 这一技术在发达国家已越来越多地用于微生物快速检测^[2-4]. 国内在这方面的研究报导较少, 更没有广泛地实际应用^[5]. 其主要原因在于对这一技术的具体方法缺乏研究, 在应用中用了不恰当的淬取剂和不合适的微生物 ATP 淬取方法^[6], 致使测量结果不理想, 从而放弃使用这一技术进行微生物快速检测分析. 在对 ATP 技术中非微生物 ATP 的清除以及微生物 ATP 淬取方法进行了实验观察后, 结果表明: 利用生物发光 ATP 技术快速检测微生物时, 必须对非微生物 ATP 进行有选择地淬取和水解, 同时必须选择合适的微生物 ATP 淬取剂和淬取方法. 否则可能得出错误的结果.

2 材料和方法

2.1 样品

尿样由同济医科大学附属医院检验科提供, 所选病例为疑尿道感染患者. 尿样置于无菌试管内, 并于一小时内进行 ATP 分析.

2.2 非微生物 ATP 的清除

取 1ml 尿样, 加入不同浓度的 Triton X-100 和 apyrase (Sigma Chemical Co.) 混合液 1ml, 在室温下放置 10 分钟.

2.3 微生物 ATP 淬取

2.3.1 超声粉碎提取 取清除了非微生物 ATP 的细菌尿 1ml, 用超声波粉碎器超声处理 5 分钟后, 离心取上清备用.

2.3.2 加热提取 样品与沸腾的缓冲液(0.1M Tris-acetate, 2mM EDTA, pH7.75)按1:9混合后煮沸90秒钟,冷却后备用.

2.3.3 加热超声提取 先按2.3.2方法将样品加热,再按2.3.1方法进行超声粉碎提取.

2.3.4 三氯醋酸(TCA)提取 将样品与等体积冷(4℃)的3%TCA相混合,震荡1分钟后备用. TCA对萤光素酶有抑制作用,因此,在测量此备用液中的ATP量之前,需将其中的TCA清除或进行稀释(用缓冲液稀释50倍),清除方法^[6]:用3倍的提取液与2倍的水饱和二乙基醚混合,震荡1分钟,然后用氮气吹10分钟.

2.3.5 氯仿提取 按文献^[7]对样品进行提取.

2.4 测量

用LKB 1251 Luminometer(LKB-Wallac, Turku, Finland)测量发光强度,测量条件为:温度25℃,测量时间为6秒,测量值取6秒内的积分值. ATP标准(Sigma Chemical Co.)用0.1M Tris-acetate 2mM EDTA pH7.75的缓冲液稀释成 10^{-7} M/L.将ATP提取液置于25℃水浴中保温20分钟,利用内标准方法进行ATP分析,步骤如下:

1. 在发光管中加入600 μ l Tris/EDTA缓冲液.
2. 加入200 μ l 虫萤光素-萤光素酶(中国科学院上海植物生理研究所).
3. 测量6秒钟发光强度 B (本底发光值).
4. 加入提取液100 μ l, 测量6秒发光值 S .
5. 加入内标准ATP 100 μ l, 测量6秒发光值 I .
6. 计算: $ATP(10^{-7}M/L) = (S - B) \times ATP标准 / I(10^{-7})$.

3 结 果

3.1 Triton 和 apyrase 的最佳浓度

选用Triton X-100作体细胞ATP淬取剂,apyrase作非微生物ATP的清除剂.观察了Triton和apyrase浓度对体细胞ATP淬取及水解的影响,结果如表1、表2所示.

表1 Triton X-100对体细胞ATP的淬取率

Table 1 Extraction rate of Triton X-100 extracting somatic cell ATP.

Concentration of Triton X-100(%)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30
Somatic cells	80	98	99	99	100
ATP extraction rate					
Bacteria	0.40	1.00	1.20	2.00	2.20

Extraction rate = Light intensity(LI) of Triton extracting / LI of ultrasonic boiling extracting $\times 100\%$.

表2 Apyrase对ATP的水解率

Table 2 Hydrolysing rate of apyrase hydrolysing ATP.

Concentration of apyrase(%)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30
Non-microbial ATP	81	98	99	99	100
Hydrolysing rate					
Microbial ATP	0.30	0.97	1.20	2.00	2.20

Hydrolysing rate = LI of low concentration apyrase / LI of 2% apyrase $\times 100\%$.

实验发现: Triton和apyrase的最佳工作浓度分别为: 0.15%和0.1%. 此时,对体

细胞 ATP 有较充分的淬取和水解, 而对细菌 ATP 基本上不淬取, 且对萤光素酶的抑制较小.

3.2 TCA 淬取曲线

当 TCA 被加到含有活细胞的液体样品中时, 有两种作用: 一是使细胞膜破裂, 导致 ATP 释放, 二是使 ATP 转化酶失活. 因此, TCA 浓度需足够高, 以便获得 ATP 的最大淬取; 但淬取后, 又要求 TCA 浓度足够低, 以免抑制萤光素酶与 ATP 的反应. 为确定 TCA 的适当工作浓度, 对不同浓度的 TCA 对细菌 ATP 淬取效果进行了实验观察, 结果如图1所示.

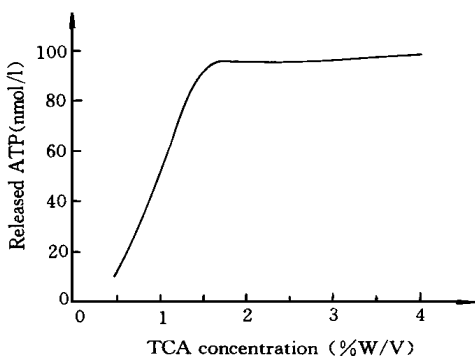


图1 细菌 ATP 淬取曲线

Fig. 1 Extraction curve of bacteria ATP.

3.3 细菌 ATP 淬取方法的比较

按上述五种方法对同一样品进行 ATP 淬取, 并对提取效果进行了比较, 结果见表3.

4 讨 论

许多样品均含有 ATP, 而不是细菌 ATP, 如临床样品、食品、环境样品和许多其它样品均含有来自动植物的体细胞 ATP. 因此, 首先必须将这些 ATP 与微生物 ATP 分离, 也就是选择合适的体细胞 ATP 淬取剂, 它只选择性地对体细胞 ATP 进行淬取, 而不淬取微生物 ATP. 然后用适当的方法将非微生物 ATP 进行清除. 目前大多使用 Triton 作为体细胞 ATP 淬取剂, 并用 apyrase 对非微生物 ATP 进行水解. 但是, Triton 和 apyrase 必须适量, 少了达不到清除非微生物 ATP 的效果; 多了会抑制虫萤光素酶的活性, 影响 ATP 分析结果. 文章对 Triton X-100 和 apyrase 的最佳工作浓度作了观察, 结果表明: 它们的最佳工作浓度分别为: 0.15% 和 0.1%.

表3 微生物 ATP 淬取方法的比较

Table 3 Comparison of different extraction methods of microbial ATP.

	Ultrasonic	Ultrasonic-boiling	Boiling	TCA	Chloroform
Extraction rate	70	100	95	95	60
Inhibition rate	50	5	5	25	40
Dilution ratio	1:10	1:10	1:10	1:100	1:10

Extraction rate= LI of an extraction method/LI of ultrasonic boiling $\times 100\%$.

Inhibition rate= LI of ATP standard treated by an extraction method/LI of ATP standard $\times 100\%$.

微生物 ATP 的淬取方法很多, 主要有: 加热、超声、酸、有机溶剂等淬取方法. 通过对超声、加热超声、加热、TCA、氯仿等五种淬取方法进行的比较, 结果显示: 超声加热方法最佳, 加热次之. 它们对微生物 ATP 分析抑制较小, 淬取率高, 但需副加设备, 操作繁琐, 难于推广. 超声方法的淬取效果尚可, 但不能使 apyrase 变性, 故会水解微生

物 ATP, 从而使分析的细菌 ATP 水平较实际水平大为降低. 氯仿的淬取效率较低, 且不使 apyrase 变性而水解细菌 ATP. TCA 对细菌 ATP 有较高的淬取效率, 且能很快使 apyrase 变性, 价格低廉, 易于得到, 不需附加设备. 为降低 TCA 对萤光素酶的抑制, 只需对 TCA 进行适当的稀释即可得到较为满意的结果. 因此, 作为一种实用技术, TCA 淬取方法简便易行, 易于推广应用.

参 考 文 献

- [1] Stanley P E. J. *Biolumin. Chemilumin.*, 1989, **4**(1): 375.
- [2] Davidson C A, Griffith C J, Fielding L M. J. *Biolumin. Chemilumin.*, 1997, **12**(2): 96.
- [3] Siragusa G R, Dorsa W J, Cutter C N. J. *Biolumin. Chemilumin.*, 1996, **11**(6): 297.
- [4] Petty R D, Sutherland L A, Hunter E M *et al*, J. *Biolumin. Chemilumin.*, 1995, **10**(1): 29.
- [5] Sun Changui. *Foreign Medicine. Issue of Clinical Biochem. and Detection*, 1995, **16**(1): 29(in Chinese).
- [6] Schram E, Witzenburg A W. J. *Biolumin. Chemilumin.*, 1989, **4**: 390.
- [7] Stanley P E. *Methods Enzymol.*, 1986, **133**: 14.

STUDY ON THE RAPID BIOLUMINESCENCE ASSAY METHOD FOR THE DETECTION OF BACTERIA

Shu Baihua Zhao Zhiyao Xu Shunqing Zhou Yikai

(*Institute of Environmental Medicine, Tongji Medical University, Wuhan 430030*)

Abstract

One of major factors that have hampered bioluminescent ATP techniques application to biomass assays is the improper removal methods of somatic ATP and inadequate microbial ATP extraction methods that have been used in the ATP rapid microbiology. The experimental study of non-microbial ATP removal methods and the microbial ATP extraction methods has been done. Triton X-100 and apyrase are used as extractant and removal reagent of somatic ATP. Trichloroacetic acid is used to extract microbial ATP. The optimum concentration of them has successively been determined as 0.15%, 0.10% and 1.50%. The comparative research of microbial ATP extraction methods such as ultrasonic disintegration, boiling, ultrasonic boiling, TCA and chloroform has been done. The conclusion is that the trichloroacetic acid is preferable to other extraction methods. The method is simple and easy to be widely used.

Key words rapid microbiology, adenosine triphosphate, bioluminescence