

微生物细胞 ATP 释放条件研究*

张菊梅^{1,2,3} 吴清平^{1**} 吴慧清¹ 郭伟鹏¹ 李程思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: 在 ATP 生物发光法微生物细胞 ATP 释放剂的筛选研究中, 发现采用环糊精等环状化合物可以解除表面活性剂类细胞 ATP 释放剂对发光反应系统的抑制作用, 其中, 7.5g/L 环糊精 CD (a) 能中和 1.5g/L 的表面活性剂 Ec 和 Es、Et, 可以完全排除 Ec、Es、Et 对发光反应的抑制作用。通过比较各种细胞 ATP 释放剂释放 ATP 效果, 筛选、组合出以表面活性剂 Ec 为代表的微生物细胞 ATP 释放剂; 通过优化实验, 发现用 0.25 ~ 0.50g/L 的 Ec 处理菌液 1 ~ 2min 时, 细胞 ATP 的释放效果最好, 从而建立了室温条件下简便、快速的微生物细胞 ATP 释放方法和 ATP 释放剂对发光反应系统抑制的消除方法。

关键词: 微生物, 生物发光, ATP 释放剂, 抑制作用, 筛选

中图分类号: Q93-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0100-06

Study on the Releasing Conditions of Microbial Cell ATP*

ZHANG Ju-Mei^{1,2,3} WU Qing-Ping^{1**} WU Hui-Qing¹ GUO Wei-Peng¹ LI Cheng-Si¹

(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 the screen of ATP releasing reagent for microbial cell, it was found that 7.5g/L cyclodextrin (a) could neutralize 1.5 g/L surfactants Ec, Es and Et, and completely obviated the analytical interference from surfactants used as ATP releasing reagents. By comparing the effect of a variety of ATP releasing reagents, surfactant Ec was screened and compounded as microbial ATP releasing reagent. The optimization experiment indicated that by using 0.25 ~ 0.50g/L Ec to treat cell suspension for 1 ~ 2min, the best releasing effect had been achieved. As a result, an easy and rapid releasing method for releasing of microbial cell ATP was established, and a way of removing the analytical interference completely from ATP releasing reagent was set up in this study.

Key words: Microorganism, Bioluminescence, ATP releasing reagent, Inhibition, Screen

在微生物细胞 ATP 生物发光法快速检测中, 微生物细胞 ATP 从胞内释放出来是关键的第一步。自从开展生物发光法在微生物数量快速测定中的应用以来, 各国研究人员相继对各种微生物细胞 ATP 释放方法进行了试验, 据文献报道的有: 煮沸缓冲液法 (Tris-HCl、Tricine)、各种稀酸 (硝酸、硫酸、过氯酸、三氯醋酸、蚁酸)、有机化合物 (二甲基亚砷、乙醇、丙酮、氯仿、丁酮) 及各种表面活性剂 (Triton X-100、氯化苄烷铵、CTAB、SDS) 等^[1~10]。理想的细胞 ATP 释放方式需满足如下要求: (1) 快速、完全; (2) 能使 ATP 转化酶不可逆地失活、不破坏 ATP; (3) 不抑制荧光素酶的

* 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: 2005-11-08, 修回日期: 2005-12-22

活性; (4) 对细胞具有选择性。一种释放剂如果完全满足上述 (1) (2) 的要求, 常常达不到 (3) 的要求, 除非对样品进行大量的稀释, 同时受各种样品复杂性的影响, 需结合不同的条件进行不同的处理。Lundin 等报道对 5 种微生物细胞用 10 种不同的释放方法进行处理, 证明只有三氯醋酸 (TCA) 对细胞 ATP 的释放效果是最好的^[1]; Kricka 等的实验同样证明了这一点, 认为用 12.5 ~ 100.0g/L 的 TCA (终浓度取决于样品) 处理样品效果是完全的^[2]; 令人遗憾的是, TCA 对发光反应体系中荧光素酶活性的抑制也是最大的, 测定时必须进行大量稀释, 这样必然降低了检测灵敏度。

在本研究的前期亦发现除煮沸缓冲液外, 稀酸、稀碱及表面活性剂 Et 均对发光反应系统有一定干扰, 并随浓度的升高, 抑制作用增大; 酸、碱中和虽然可以消除稀酸、稀碱对系统的影响, 但酸碱中和产生的盐又对系统造成一定影响。而发光测定系统中存在很微量的 TCA 和表面活性剂 Ec 和 Es, 都将对反应造成严重抑制。因此, 研究如何解除微生物细胞 ATP 释放剂对发光测定系统的抑制作用且不降低发光检测灵敏度成为微生物细胞 ATP 释放剂应用的关键所在。有研究表明牛血清白蛋白 (BSA) 可以保护荧光素酶, 但在随后的优化过程中发现高浓度的 BSA (25 ~ 100g/L) 有抑制作用, 因此 BSA 非理想的解抑制剂。细菌学上用到的一些抗微生物物质如季铵盐化合物, 可用非离子表面活性剂 (Tween 80 或 Triton X-100) 进行中和, 但他们的中和效果并不理想^[1]。

已有文献报道的各种释放方法能实际应用的并不多, 用作商业用途的有关详细资料则更少。因此加强微生物细胞 ATP 释放机理研究, 建立简便、有效的微生物细胞 ATP 释放方法, 在温和条件下将微生物细胞 ATP 从胞内释放出来, 提高 ATP 释放剂的释放效果, 并消除 ATP 释放剂对发光反应系统的抑制作用, 提高检测灵敏度, 就成为 ATP 生物发光法微生物快速检测要得到进一步发展和实际应用所必需解决的重要问题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 荧光素酶-荧光素组合试剂、ATP、表面活性剂 Ec、Es、Et 和解抑制剂环糊精 CD (a) 和 CD (b) 等购自 Sigma 公司; BSA、TCA、EDTA、Tricine、KOH、HNO₃ 等由广东环凯微生物科技有限公司提供; SHG-C 生物化学发光测量仪, 上海上立检测仪器厂生产。

1.1.2 测试菌株: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538、白色念珠菌 (*Candida albicans*) ATCC 10231、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) MIG 2.34、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC16404 和 MIG3.25、绿色木霉 (*Trichoderma pseudokoningi*) MIG 3.139 等均由广东省菌种保藏与应用重点实验室提供。

1.2 试剂和菌悬液的制备

Tricine 缓冲液: 含 25mmol/L Tricine、5mmol/L MgSO₄、0.5mmol/L EDTA、0.5mmol/L DTT、500μg/L BSA, 调 pH 至 7.8。

ATP 标准溶液: 用 pH7.8, 25mmol/L Tricine 缓冲液配制成 10⁻⁹mol/mL。

荧光素酶-荧光素组合试剂: 直接用超纯水配制成 10mg/mL。

表面活性剂 Ec、Es、Et 和 TCA、KOH、HNO₃, 以及解抑制剂 CD (a) 和 CD (b)

均用灭菌超纯水配成一定浓度。

菌悬液制备：细菌于营养琼脂斜面 37℃ 培养 24h，灭菌生理盐水洗下，5,000 r/min 离心 5min，沉淀加灭菌生理盐水重新悬浮，使含菌量为 $10^6 \sim 10^7$ cells/mL；酵母菌于麦芽汁琼脂斜面 30℃ 培养 48h，用灭菌生理盐水洗下，5,000r/min 离心 5min，沉淀加灭菌生理盐水重新悬浮，使含菌量为 $10^5 \sim 10^6$ cells/mL。

孢子悬液制备：霉菌于察氏琼脂斜面 30℃ 培养 3 ~ 5d，孢子用灭菌生理盐水洗下，5,000r/min 离心 5min，沉淀加灭菌生理盐水悬浮使孢子含量为 $10^5 \sim 10^6$ cells/mL。

1.3 ATP 释放剂对发光反应系统抑制作用的消除

测试方法：取一定体积 ATP 释放剂，加入一定体积的解抑剂，混合均匀，取出 0.1mL 于发光管中，加入 0.1mL 10^{-9} mol/mL ATP，以 25mmol/L Tricine 缓冲液 (pH7.8) 将体积补足至 0.9mL，摇匀，再加入 0.1mL 荧光素酶 - 荧光素试剂 (简称 1mL 测试系统)，立刻摇匀，并置于 25℃ 生物发光检测仪中进行发光脉冲计数，记录 1min 的发光脉冲计数值 (CPM)。对照以灭菌超纯水代替中和物，进行同样测试。

1.4 不同细胞 ATP 释放剂对微生物细胞释放 ATP 的作用比较

释放剂：煮沸缓冲液 (含 50 mmol/L Tricine、10 mmol/L MgSO_4 和 2 mmol/L EDTA, pH7.8)；KOH 100mmol/L (含 10 mmol/L Tris、2 mmol/L EDTA)； HNO_3 600 mmol/L；TCA 500mmol/L；表面活性剂 Ec、Es、Et 分别配成 10g/L。

ATP 释放方法：(1) 煮沸缓冲溶液法：取 0.5mL 菌液，加入预先于沸水中预热的 4.5mL Tricine 缓冲液中，煮沸 5min，取出后冰浴 10min，定容至 5mL，恢复至室温。(2) 煮沸 KOH 法：取 0.5mL 菌液，加入预先于沸水中预热的 4.5mL 的 KOH 中，煮沸 5min，取出冰浴 10min，然后中和，定容至 5mL，恢复至室温。(3) TCA 法：取 0.5mL 菌液，加入 1.2mL TCA 溶液，室温作用 15min，用乙醚抽提 3 次去除 TCA，然后用 10mmol/L KOH 中和，稀释至 5mL。(4) HNO_3 法：取 1mL 菌液，加入 1mL HNO_3 中，室温处理 5min。(5) 表面活性剂处理法：分别取 1mL 菌液，加入 1mL 表面活性剂 Ec, Es, Et, 作用 2min。(6) 丙酮处理法：取 1mL 菌液，离心后去上清液，沉淀加 1mL 丙酮，于沸水浴上煮沸 5 min，待丙酮挥发后，加 1mL 灭菌超纯水。

测定方法：将各种 ATP 释放剂处理后的样品稀释到同样浓度，分别取 0.1mL 进行发光测定，表面活性剂处理样品需加入适量解抑剂，测定时采用上述 1mL 测定系统，以样品代替标准 ATP。

1.5 ATP 释放剂释放条件的选择

菌液与 0.5g/L 的 Ec 分别作用 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、5.0、10min，然后取 0.1mL 样液进行发光测定，测定时采用上述 1mL 测定系统。

菌液分别与一系列浓度的 Ec 作用 1.5min，取 0.1mL 样液进行发光测定，Ec 的浓度分别为：0.005、0.0125、0.025、0.05、0.25、0.50、2.5、5.0g/L。

2 结果与讨论

2.1 ATP 释放剂对发光反应系统抑制作用的消除

环糊精 (简称 CD) 是由 n 个葡萄糖单元结合起来的环状化合物，其种类随 n 值的不同而变化。“内疏水，外亲水”的特殊分子结构，使得 CD 能与多种客体分子通过醚氧键、范德华力、疏水相互作用、电荷传递等各种效应形成包络物等很多领域得到广

泛应用。本研究选用环糊精 CD (a) 和 CD (b) 作为解抑剂进行测定表面活性剂类细胞 ATP 释放剂对发光反应系统抑制作用消除的实验, 从图 1、图 2 可以明显看出, 7.5g/L 的 CD (a) 能中和 1.5g/L 的表面活性剂 Ec, 完全解除 Ec 对发光反应的抑制, 故 CD (a) 是一个优良的解抑剂。在实验中同样发现 CD (a) 能中和表面活性剂 Es 和 Et。而 CD (b) 对 Ec 亦有一定的中和作用, 但随浓度的升高, 本身对测定系统又有一定的抑制作用, 并不能完全解除 Ec 对分析的干扰。

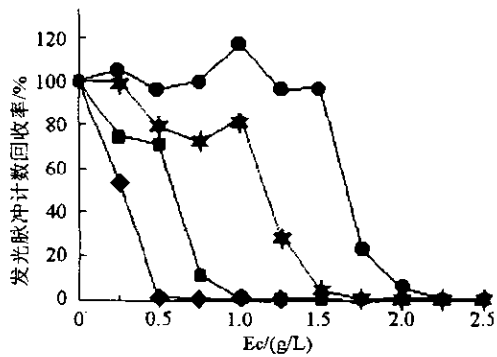


图 1 CD (a) 与 Ec 的中和曲线
—●— 0g/L CD (a), —■— 2.5g/L CD (a),
—★— 5g/L CD (a), —◆— 7.5g/L CD (a)

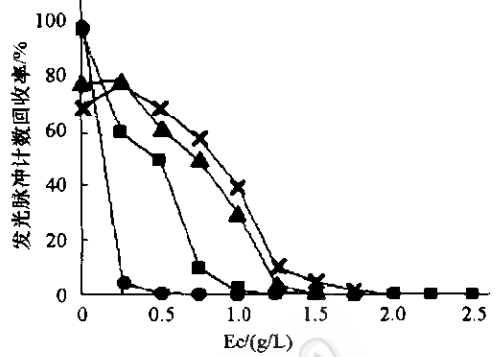


图 2 CD (b) 与 Ec 的中和曲线
—●— 0g/L CD (b), —■— 2.5g/L CD (b),
—▲— 5g/L CD (b), —×— 7.5g/L CD (b)

2.2 ATP 释放剂对微生物细胞释放 ATP 的作用比较

根据文献报道, 煮沸缓冲液法是一个释放细胞 ATP 较为可信的方法, 但对有些菌其 ATP 释放效果不理想, 另外与常温 ATP 释放剂相比, 应用于在线检测时不方便, 因此, 本研究对常温 ATP 释放剂与煮沸缓冲液法的细胞 ATP 释放效果进行比较 (表 1)。

表 1 ATP 释放剂对微生物细胞释放 ATP 的作用比较

ATP 释放方法	发光脉冲计数 CPM 值回收率 (%) *						平均回收率 (%)
	ATCC25922	ATCC6538	ATCC10231	MIG2. 34	MIG3. 25	MIG3. 139	
煮沸缓冲液	141	80	156	155	195	274	167
煮沸 KOH	146	123	147	130	217	234	166
TCA	4	3	1	1	2	3	2
HNO ₃	108	144	63	77	36	32	77
表面活性剂 Ec	145	195	228	164	132	83	158
表面活性剂 Es	134	182	152	117	44	70	117
表面活性剂 Et	36	30	14	116	118	53	61
丙酮	84	42	39	39	57	51	52

* 回收率 (%) = $\frac{\text{发光脉冲计数 CPM 值}}{\text{相同菌株不同 ATP 释放方法的平均发光脉冲计数 CPM 值}} \times 100\%$

从表 1 可以看出, 煮沸缓冲液和煮沸 KOH 法对各种菌均有较好的释放效果, 尤其对真菌孢子。表面活性剂 Ec、Es 和 Et 对细菌和酵母的释放效果等于或优于煮沸缓冲液法, 但对霉菌孢子则不如煮沸法好, 其中 Ec 的释放效果又比 Es 和 Et 好。HNO₃对细胞 ATP 有一定释放效果, 但在室温条件下不如 Ec 和 Es, 同时应用 HNO₃进行样品处理时, 酸性条件下会造成部分 ATP 水解, 并影响反应体系的 pH 值, 故细胞 ATP 释放后还必须中和, 但中和产生的盐对反应体系也有抑制作用。尽管有报道说 TCA 对细胞 ATP 的

释放效果最佳,但经过 3 次乙醚抽提后,用 KOH 中和,并稀释,依然不能消除 TCA 对反应体系的抑制,因此,该法的实际应用受到了很大的限制。丙酮对脂肪和蛋白质含量高的生物材料较为有利,但它却是荧光素酶的抑制剂,因此,实际操作不易控制。作为室温 ATP 释放法, Ec 处理后,添加解抑制剂不失为一个优良的微生物细胞 ATP 释放方法,对生产企业现场微生物检测较为方便。

2.3 微生物细胞 ATP 释放条件的选择

2.3.1 不同处理时间微生物细胞 ATP 释放效果比较:从图 3 的时间曲线可以看出,细菌以大肠杆菌 ATCC25922 (培养 24h, 菌悬液 1.5×10^7 cfu/mL) 和金黄色葡萄球菌 ATCC6538 (培养 24h, 菌悬液 2.1×10^7 cfu/mL) 为材料,真菌以白色念珠菌 ATCC10231 (培养 48h, 菌悬液 5.0×10^5 cfu/mL) 和黑曲霉 ATCC16404 (培养 24 h, 孢子悬液 3.5×10^6 cfu/mL) 为材料,用 0.5g/L 的 Ec 处理,对于 ATCC25922 和 ATCC10231 的最适处理时间为 1.0min,而 ATCC6538 和 ATCC16404 分别为 2.0 和 2.5min,随着时间的延长,ATP 的释放并无增加的趋势,故选择微生物细胞 ATP 释放剂的处理时间为 1~2min。

2.3.2 不同浓度细胞 ATP 释放剂释放效果比较:采用微生物细胞 ATP 释放剂 Ec,浓度从 0.005~5.0g/L 进行微生物细胞 ATP 释放效果比较,细菌以大肠杆菌 ATCC25922 (37℃ 培养 22h, 菌悬液 6.0×10^7 cfu/mL) 和金黄色葡萄球菌 ATCC6538 (37℃ 培养 22h, 菌悬液 7.1×10^7 cfu/mL) 为材料,真菌以白色念珠菌 ATCC10231 (30℃ 培养 48h, 菌悬液 2.4×10^6 cfu/mL) 和绿色木霉 MIG3.139 (30℃ 培养 8d, 孢子悬液 1.7×10^7 cfu/mL) 为材料,图 4 表明,当 Ec 作用浓度大于 0.25g/L 时,即有较好的细胞 ATP 释放效果。为了减少解抑制剂的用量,选用 0.25~0.50g/L 的 Ec。

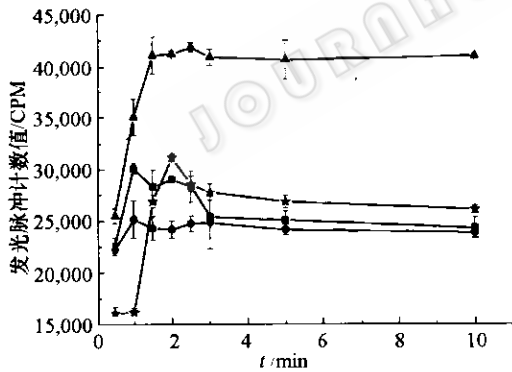


图 3 Ec 不同处理时间对微生物细胞 ATP 释放效果比较
—■— ATCC 10231, —▲— ATCC 16404,
—●— ATCC 25922, —★— ATCC 6538

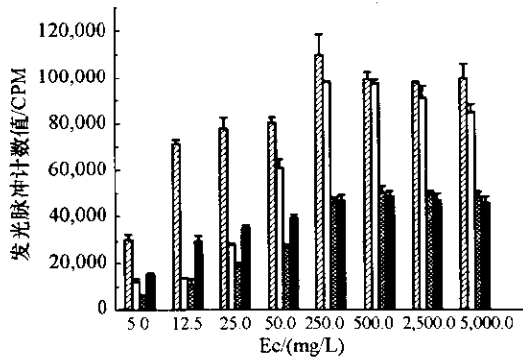


图 4 Ec 不同浓度对微生物细胞 ATP 释放效果比较
▨ ATCC 10231, — MIG 3.139,
▤ ATCC 25922, ■ ATCC 6538

3 结论

表面活性剂与环糊精分子在疏水基团内部化学结合,从而形成稳定的化合物,经研究发现,采用环糊精等环状化合物可以解除表面活性剂对发光反应系统的抑制作用,其中,7.5g/L CD (a) 能中和 1.5g/L 的表面活性剂 Ec 和 Es、Et,可以完全消除 Ec、

Es、Et 对分析的干扰, 而 CD (b) 对 Ec 亦有一定的中和作用, 但不能完全解除 Ec 对发光反应系统的抑制作用。

各种细胞 ATP 释放剂释放 ATP 效果比较发现, 表面活性剂 Ec 和 Es 对细菌和酵母的释放效果等于或优于煮沸缓冲液法, 其中 Ec 释放效果又比 Es 和 Et 好。HNO₃、丙酮的 ATP 释放效果均不如 Ec, 而 TCA 经乙醚抽提、中和、稀释后, 依然难以排除对反应体系的抑制, 故该法的实际应用受到很大限制, 因此, 作为一种简便、快速的 ATP 释放方法, 经 Ec 处理后, 添加 CD (a) 作为解抑制剂不失为一个好的细胞 ATP 释放方法。

通过比较 Ec 不同时间、不同浓度的 ATP 释放效果, 发现用 0.25 ~ 0.50 g/L 的 Ec 处理菌液 1 ~ 2 min 时, 细胞 ATP 的释放效果最好。

参考文献

- [1] Lundin A, Thore A. *Applied Microbiology*, 1975, **30** (5): 713 ~ 721.
- [2] Kricka L J. *Anal Biochem*, 1988, **175** (1): 14 ~ 21.
- [3] Tsuji F L. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, **338** (1): 250 ~ 253.
- [4] Wen G, Voroney R P, Curtin D, *et al.* *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, **37** (11): 1999 ~ 2006.
- [5] Larson E L, Aiello A E, Gomez-Duarte C, *et al.* *Food Microbiology*, 2003, **20** (6): 735 ~ 739.
- [6] Delahaye E, Welté B, Levi Y, *et al.* *Water Research*, 2003, **37** (15): 3689 ~ 3696.
- [7] Yang N C, Ho W M, Chen Y H, *et al.* *Analytical Biochemistry*, 2002, **306**: 323 ~ 327.
- [8] Dexter S J, Cámara M, Davies M, *et al.* *Biomaterials*, 2003, **24**: 27 ~ 34.
- [9] Squirrell D J, Price R L, Murphy M J. *Analytica Chimica Acta*, 2002, **457**: 109 ~ 114.
- [10] 张菊梅, 吴清平, 周小燕, 等. 荧光素酶研究进展, 2001, **28** (5): 98 ~ 101.