

NADH 荧光法快速检测细菌总数

王 晶 王静雪* 林 洪 梅册霞

(中国海洋大学食品科学与工程学院 山东 青岛 266003)

摘 要: 基于细菌胞内 NADH 的荧光特性及其在胞内含量稳定的特性, 建立一种快速检测细菌总数的新方法。该荧光法的 NADH 检测限为 1 nmol/L, NADH 含量在 10 nmol/L~0.2 mmol/L 间与荧光强度呈良好线性关系($R^2=0.9905$)。经离心获得菌体细胞, 热 Tris-HCl 法提取胞内 NADH, 以 342 nm 为激发波长, 461 nm 为发射波长测定提取液荧光强度, 1 h 内可检测到样品 1×10^4 CFU/mL 菌数。结果表明该方法快速、灵敏、简便、重复性好, 可适用于食品卫生与安全、环境检测等领域活细菌数量的定量检测。

关键词: NADH, 荧光法, 细菌总数, 快速检测

Rapid Detection of Total Bacterial Number Using NADH Fluorescence Method

WANG Jing WANG Jing-Xue* LIN Hong MEI Ce-Xia

(Food Science and Engineering Department, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: To set up a new method of detecting bacterial number *in situ*, NADH fluorescence method based on the fluorescent characteristic of NADH was used. When the concentration of NADH ranged from 10 nmol/L to 0.2 mmol/L, its concentration had a good line relationship to the fluorescence intensity($R^2=0.9905$). Separating bacterial cells by centrifugation and extracting NADH with hot Tris-HCl buffer, the result of bacterial count detected with NADH standard plot was 1×10^4 CFU/mL in an hour. In summary, NADH fluorescence method is rapid, sensitive, simple and reliable to detect total bacterial number. Therefore, the method can be widely applied in the field of food sanitation and safety, environment detection and so on.

Keywords: NADH, Fluorescence, Total bacterial number, Rapid detection

作为国际上公认的饮用水、食品等粪源性污染卫生细菌学指标, 细菌总数(Total bacterial number)在食品卫生安全及疾病防治中扮演着非常重要的角色, 建立快速灵敏实用的细菌总数检测方法对环境卫生和人民日常生活质量的提高均具重大的积极意义。

目前普遍采用的方法主要为传统的平板菌落计数法和比浊法^[1], 平板菌落计数法需要菌落培养时间, 因此测定时间在 1 d 以上, 且步骤繁琐, 易引起污染, 人工计数会由于主观误差而降低测定准确度。比浊法方法简便, 耗时少, 但该方法无法分辨死活细胞, 而使其应用受到了限制。近年来, 国内外在

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30500384); 国家 863 计划项目(No. 2006AA09Z431)

* 通讯作者: Tel: 86-532-82032389; E-mail: snow@ouc.edu.cn

收稿日期: 2008-09-26; 接受日期: 2008-12-30

缩短检测时间、简化检测程序方面研究了新的方法^[2],主要有聚合酶链反应(PCR)法^[3]、原位杂交(ISH)法、酶联免疫吸附试验(ELISA)法^[4]、免疫荧光(IFA)法、基因芯片法^[5]以及生物传感器^[6]等。以上方法各具特点,且与平板计数法和比浊法相比,在精确度、敏感性、检测速度等方面都有较大的提高,但许多检测方法或因设备和试剂昂贵、或因操作过程复杂、或因实验条件严格,并非适用于所有的机构和单位。

还原型辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)广泛存在于动、植物和微生物的活细胞中,是许多生物氧化还原电子传递链中的重要物质,在活细胞生长增殖、信号传递、基因调控、线粒体保护等方面起着重要的作用,可作为具有代谢活性的细胞指示物^[7]。NADH是种强荧光物质,早在60年代,Chano B等首先提出了通过显微荧光术观察细胞内辅酶I氧化态和还原态的变化来测量细胞新陈代谢的变化。80年代,Renault G^[8]等用激光感生NADH荧光的方法对离体生物器官的新陈代谢进行了研究。荧光强度信号与存在的NADH的量成正比。Piston等^[9]在研究葡萄糖代谢中发现,在细胞质和线粒体中NADH水平与荧光强度有很好的定量关系。此外,单位菌体胞内NADH含量恒定^[10,11],细菌菌数与NADH含量应呈正相关关系,则细菌菌数与荧光强度呈良好的线性相关。因此,通过测定NADH来监测诸如发酵过程细胞浓度及其生长代谢状态状况的各种参数^[12],将细菌菌数与荧光强度相关联是荧光法测定活细菌数量的理论基础。本实验即以NADH含量为媒介,确立并验证细菌菌数与荧光强度的线性关系。在实际应用中,测定提取液的荧光强度,通过荧光强度信号直接反映活菌数量。

荧光法在整个提取检测过程操作步骤少,只需荧光分光光度计,不需进样器,易操作,从而适应快速准确检测的需求。目前尚未有利用NADH荧光法直接测定细菌总数的报道。

1 材料与方法

1.1 菌株

实验用大肠杆菌 *E. coli* 由中国海洋大学食品安全性实验室提供。*E. coli* 单菌落培养于营养肉汤培养基, 37℃、150 r/min 下恒温振荡培养 12 h 至对数生长期做种子液。取种子液 1 mL, 按 1:100 比例接

种到 100 mL 营养肉汤培养基中培养 12 h, 待用。*E. coli* 菌悬液配制, 细菌平板菌落计数均参照 GB/T 4789^[1]。

1.2 主要试剂和仪器

NADH- Na_2 、EDTA、DTT、Triton X-100、PMSF、Tween 20 和 imidazole 购自美国 Sigma 公司, Tris 和 SDS 购自上海优拓医药有限公司。实验试剂均为分析纯, 实验用水均为双重蒸馏水。F-2500 荧光分光仪(日本日立公司), TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.3 NADH 荧光法的建立

1.3.1 NADH 荧光特性的研究: 对 0.1 mmol/L 的 NADH 进行扫描, 确定其激发与发射波长。选择 310 nm~390 nm 为激发波长, 在 220 nm~800 nm 范围扫描确定其发射波长; 用获得的一个或若干个发射波长重新扫描获激发波长, 据此激发波长测得实际发射波长。扫描条件参数设定: 扫描速度: 3000 nm/min; 延迟: 0; EX 狭缝: 10.0 nm; EM 狭缝: 10.0 nm; 光电倍增管电压: 400 V; 响应: 0.08 s。

1.3.2 NADH 标准曲线与 NADH 荧光法建立: F-2500 荧光分光光度计下检测 NADH 的荧光, 检测中固定其激发和发射波长, 用 1 cm 石英比色皿检测 NADH 标准溶液和样品, 测 3 个平行。无菌 Tris-HCl 溶液 (20 mmol/L, pH 7.75) 配制 0.1 nmol/L~10 mmol/L NADH 溶液, 以 NADH 浓度为横坐标, 荧光强度为纵坐标, 绘制 NADH 的标准曲线。

1.4 菌体细胞的收集

培养 12 h 的菌悬液 3 mL, 4℃ 下经 10000 r/min 离心 10 min 处理, 收集湿菌体, 作初始菌体细胞。

1.5 胞内 NADH 的提取方法的选择和优化^[13-16]

采用裂解液法、裂解结合超声法、反复冻融法和热 Tris-HCl 法 4 种方法。获得的提取液进行 4℃ 下 10000 r/min 离心 10 min 处理, 转移上清至无菌试管, 取 1 mL 提取液立即进行荧光法 NADH 检测, 测定 3 个平行。

1.5.1 裂解液法提取: 选取 6 种裂解液 A~F 对菌体细胞破碎。各裂解液组分如表 1 所示。分别用 3 mL 裂解液 A~F 复溶收集的菌体细胞, 磁力振荡器混匀, 4℃ 放置 30 min 裂解。同时与 4℃ 过夜裂解提取效果比较。

1.5.2 裂解液结合超声法提取: 用 3 mL 无菌裂解液 A~F 复溶收集的菌体细胞, 磁力振荡器混匀, 冰

表 1 裂解液组分
Table 1 Lysis buffer components

No.	Components	pH
A	10 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT	8.0
B	100 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA	8.0
C	100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA	8.0
D	100 mmol/L Tris-HCl, 2% SDS	8.0
E	100 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 0.05% Triton X-100	8.0
F	100 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L NaCl, 10% Glycerol, 60 mmol/L imidazole, 0.1% Tween20, 1 mmol/L PMSF, 10 mmol/L β-mercaptoethanol	8.0

上超声破碎, 每个样本超声时间 10 s, 间隔 10 s, 超声 30 min, 功率 400 W。

1.5.3 反复冻融法提取: 3 mL 无菌 PBS (10 mmol/L, pH 8.0) 复溶收集的菌体细胞, 轻轻吹打混匀, -20℃ 冷冻 30 min, 室温放置解冻 10 min, 反复 3 次。

1.5.4 热 Tris-HCl 法提取: 3 mL 无菌 Tris-HCl (20 mmol/L, pH 7.75)复溶收集的菌体细胞, 80℃ 下处理 30 min, 样品冷却至室温充分振荡。

1.5.5 四种提取方法的 NADH 稳定性: 4 种提取方法提取液立即测定(0 h), 4℃ 冰箱保存 24 h、48 h 测定。对 4 种方法各自随时间变化的稳定性进行单因素方差分析。

1.6 NADH 荧光法检测细菌总数的应用

取培养 12 h 大肠杆菌菌体细胞, 用无菌 PBS (10 mmol/L, pH 8.0)复溶。

1.6.1 NADH 荧光法检测不同 OD 值下的大肠杆菌: 稀释为不同 OD 值菌悬液, 按 1.5 选择的最佳提取方法提取菌体胞内 NADH, 按 1.3 进行荧光检测。建立不同 OD 值菌悬液与荧光强度的关系曲线。

1.6.2 NADH 荧光法检测不同菌量的细菌总数: 稀释为 10⁷ CFU/mL、10⁶ CFU/mL、5×10⁵ CFU/mL、10⁵ CFU/mL、5×10⁴ CFU/mL、10⁴ CFU/mL 菌悬液(平板计数法获得), 按 1.5 选择的最佳提取方法提取菌体胞内 NADH, 按 1.3 进行荧光检测。建立不同菌量菌悬液与荧光强度的关系曲线, 确定荧光法检测细菌总数的检测限。

2 结果与讨论

2.1 NADH 荧光特性

310 nm~390 nm 激发波长范围内, 扫描

220 nm~800 nm 范围有单一发射峰出现。随着激发波长改变, 发射图谱中的峰位置几乎无位移, 波长范围在 460 nm~462 nm, 仅是峰高与峰面积随着激发波长改变发生明显变化。其中当激发波长 340 nm, 发射波长为 461 nm 时, 此时达到最大峰高值 2279 荧光强度单位, 见图 1。据此, 设定发射波长为 460 nm~462 nm, 扫描 220 nm~550 nm 范围内的激发波长, 分别在 232 nm、273 nm 和 342 nm 处出现荧光峰, 分析 3 个荧光峰, 见图 2。以 232 nm 作激发波长, 在 460 nm~462 nm 处无荧光峰。其中 273 nm

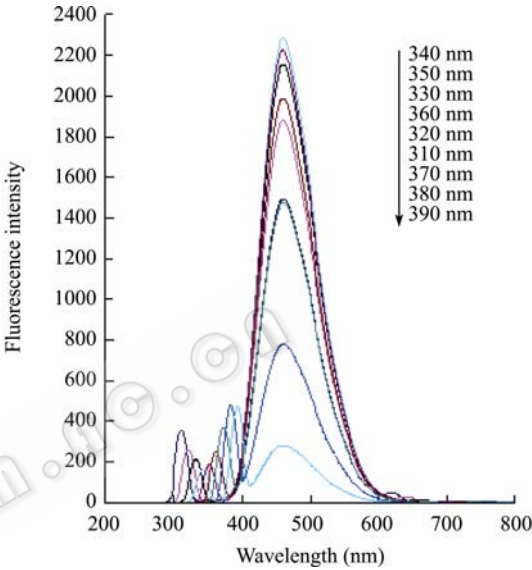


图 1 NADH 发射波长荧光谱图
Fig. 1 The emission fluorescence spectrum of NADH

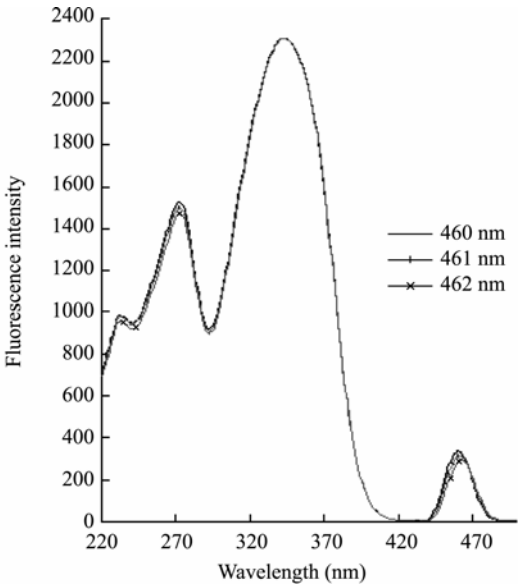


图 2 NADH 的激发波长荧光谱图
Fig. 2 The excitation fluorescence spectrum of NADH

和 342 nm 为我们得到的 NADH 激发波长, 而 342 nm 为 NADH 区别于 NAD^+ 独有的荧光峰^[17]。最终确定了激发波长为 342 nm, 发射波长为 461 nm。

Grossie 等曾有报道^[18], 342 nm 为 NADH 激发波长, 459 nm 为发射波长。Liang J 等^[19]研究的 NADH 激发波长为 382 nm, 发射波长为 460 nm。Perlin MH 等^[20]用荧光法测得 NADH 激发波长为 340 nm, 发射波长为 450 nm。Klemm 等^[21]的研究表明 NADH 在 348 nm 处有激发峰, 453 nm 处有发射峰。刘昆元^[12]的研究中指出激发或发射波长不同可能与 NADH 产品厂家、纯度、合成物等不同有关, 另外荧光分光光度计不同型号也可能带来少许的差异, 有待进一步验证。

2.2 NADH 的标准曲线

固定激发波长 342 nm, 发射波长 461 nm, 据 1.3 得 NADH 与荧光强度的标准曲线(图 3)。NADH 含量在 20 nmol/L~6 $\mu\text{mol/L}$ 间呈良好线性关系 ($R^2=0.9966$), 其回归方程为: $y=14.223x+1.9681$ 。进一步扩大检测范围, 在 10 nmol/L~0.2 mmol/L 间, NADH 的浓度与荧光强度仍呈良好线性关系 ($R^2=0.9905$), NADH 检测限为 1 nmol/L。

2.3 胞内 NADH 提取方法的选择和优化

NADH 为胞内物质, 测定其含量必需先破碎细胞并避免破碎过程中 NADH 含量损失, 因此测定前最大程度提取 NADH 非常重要。

2.3.1 裂解液法与裂解液结合超声法提取 NADH 的效果: 表面活性剂作为细胞裂解液可通过改变细胞膜通透性使细胞溶解, 此法作用温和, 是常见提取胞内物质的方法之一。超声是利用空化方式破碎

细胞壁^[13,14], 将胞内 NADH 释放出来, 裂解液与超声结合可能会使更多 NADH 释放。Gunsalus-Miguel A^[15]等曾用细胞裂解液 F 提取发光细菌胞内的荧光素酶。通常裂解液处理时间为 16 h~24 h, 为满足快速检测要求, 比较了短时间(30 min)裂解处理和 16 h~24 h 裂解处理的效果。通过 6 种裂解液裂解效果对比(图 4)发现: 4°C 30 min 与过夜裂解提取效果相差不大, 综合考虑裂解效果和快速检测要求, 确定 30 min 为裂解时间。从荧光强度增长量和增长率两方面比较, 成分为 100 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L EDTA、0.05% Triton X-100、pH 8.0 的 E 裂解液获得最佳提取效果。利用裂解液作超声介质时, 除 D 裂解液, 荧光强度明显增大, 说明应用此法提取的 NADH 量高于单独使用裂解液法提取得率(图 4)。如图 4 所示, 裂解液 E 结合超声可取得最好的提取 NADH 效果。

2.3.2 四种方法的提取效果比较: 冻融法提取 NADH 量最少。获得 NADH 过程复杂以及需要一个预冻过程可能是冻融法不总能裂解细菌细胞的原因, 同时所费时间久, 操作不简便, 不选作提取方法。热 Tris-HCl 提取(20 mmol/L, pH 7.75, 80°C)是提取活性污泥中 ATP 最理想的方法^[16]。此法的优势还体现在可从一个样品同时提取多个代谢产物, 如 ATP 和 NADH。因此, 将其引用到 NADH 的提取中。从荧光强度增长量角度比较, 裂解液 E 结合超声提取

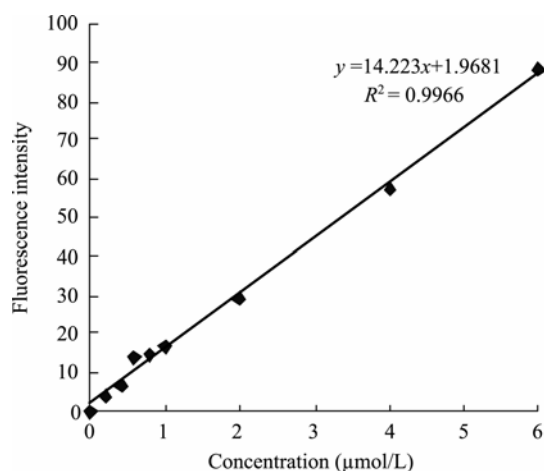


图 3 NADH 的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of NADH

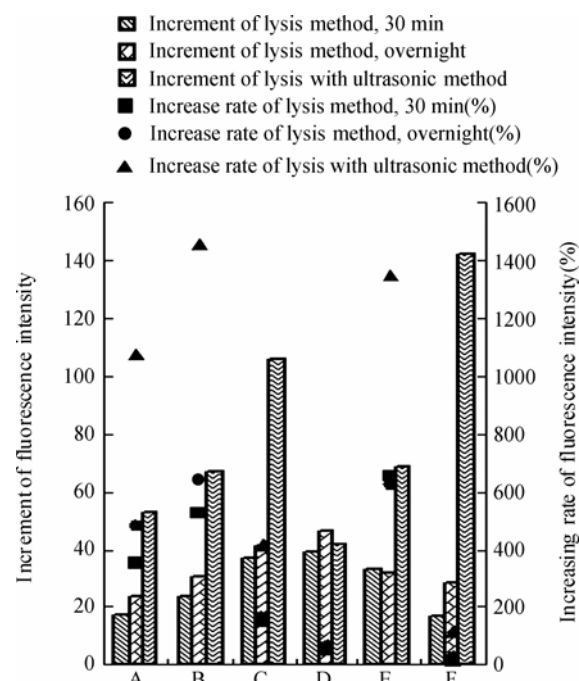


图 4 裂解液法与裂解液结合超声波法的提取效果

Fig. 4 Effects of NADH extraction by lysis and lysis combined with ultrasonic method

NADH 获得的结果最佳, 分别是冻融法提取的 3 倍, 裂解液法的 2 倍, 热 Tris-HCl 法处理的 1.5 倍(图 5)。而从荧光强度增长率比较 4 种方法, 热 Tris-HCl 法最优。综合考虑提取方法简易性原则和实际检测, 热 Tris-HCl 法适合大量样品同时处理, 重复性好, NADH 提取量高, 且不需其他昂贵仪器辅助, 简便易操作, 确定热 Tris-HCl 法作为提取方法。

2.3.3 不同提取方法的 NADH 稳定性: 4 种方法获得提取液 0 h、24 h、48 h 测定结果(图 6, 表 2)。

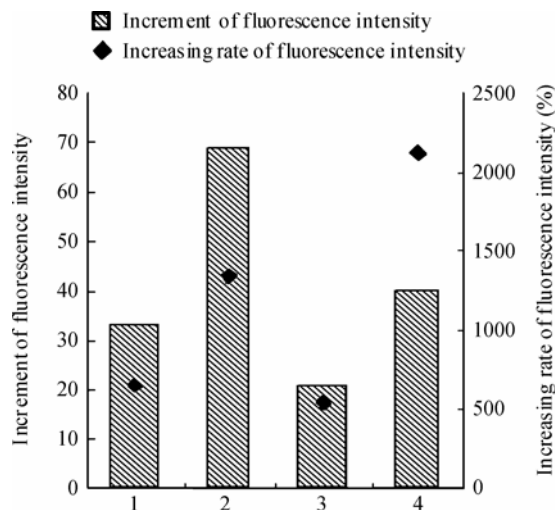


图 5 不同方法提取效果

Fig. 5 Effects of different extraction methods

注: 1: 裂解液法; 2: 裂解超声结合法; 3: 冻融法; 4: 热 Tris-HCl 法。
Note: 1: Lysis method; 2: Lysis combined with ultrasonic method; 3: Freeze-thaw method; 4: Hot Tris-HCl method.

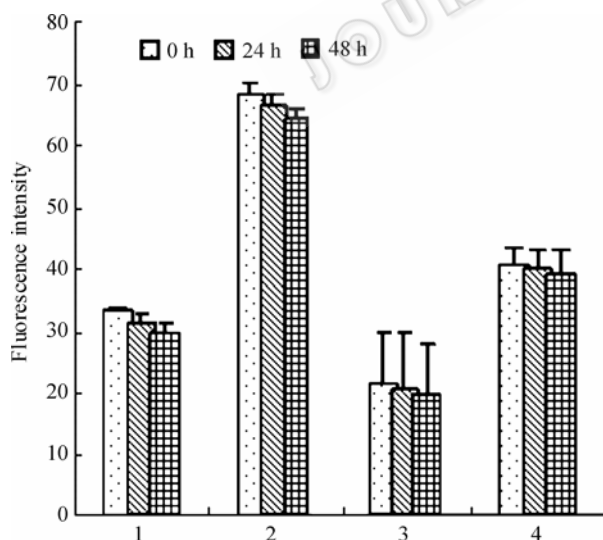


图 6 不同方法提取 NADH 稳定性

Fig. 6 Stability of NADH by different method

注: 1: 裂解液法; 2: 裂解超声结合法; 3: 冻融法; 4: 热 Tris-HCl 法。
Note: 1: Lysis method; 2: Lysis combined with ultrasonic method; 3: Freeze-thaw method; 4: Hot Tris-HCl method.

表 2 NADH 稳定性的单因素方差分析结果
Table 2 ANOVA results for the stability of NADH

Method	<i>n</i>	<i>P</i>
Lysis method	3	0.078003
Lysis with ultrasonic method	3	0.068772
Freeze-thaw method	3	0.965379
Hot Tris-HCl method	3	0.872504

Note: *n* is the number of sample; *P*<0.05 indicate a significant difference.

4 种方法提取的 NADH 在 0 h、24 h、48 h 三次测定无显著的差异, 其中冻融法和热 Tris-HCl 法的 *P* 值均大于 0.1, 稳定性比裂解液法和结合超声法更佳。

2.4 样品的荧光检测

2.4.1 NADH 荧光法检测不同 OD 值大肠杆菌结果: OD 值分别为 0.1、0.2、0.4 和 0.8 的 4 个梯度菌悬液。图 7 为以热 Tris-HCl 为空白, OD 值与荧光强度的关系曲线图。荧光强度与菌悬液 OD 值呈良好线性关系, 两者的相关系数 R^2 达到了 0.9975。由于 OD 值与细菌菌数也呈线性关系, 据此可以推断荧光强度与细菌菌数呈良好线性关系, 且和比浊法有很好的相关性。

2.4.2 NADH 荧光法检测不同菌数结果: 活菌菌体内 NADH 的理论含量是恒定的, 菌数越多, 对体系的荧光影响越大。选择 10^3 CFU/mL~ 10^7 CFU/mL 菌浓度验证此方法的最低检测限。通过梯度稀释, 得到菌浓度分别为 10^7 CFU/mL、 5×10^6 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 5×10^5 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 5×10^4 CFU/mL、 10^4 CFU/mL、 10^3 CFU/mL 菌悬液, 即

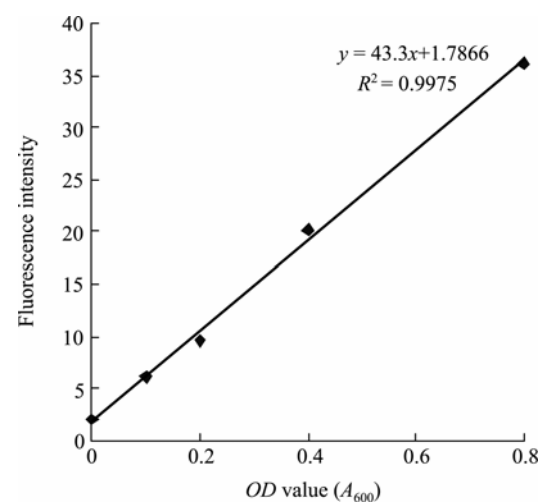


图 7 OD 值-荧光强度曲线图

Fig. 7 Effects of OD value on fluorescence intensity

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

7 log CFU/mL、6.699 log CFU/mL、6 log CFU/mL、5.699 log CFU/mL、5 log CFU/mL、4.699 log CFU/mL、4 log CFU/mL、3 log CFU/mL (平板计数得菌数)。以 Tris-HCl 为空白, 细菌总数与荧光强度的关系曲线图如图 8 所示: 荧光法可以识别 10^4 CFU/mL 的细菌。菌浓度在 10^4 CFU/mL~ 10^7 CFU/mL 的范围内与荧光强度呈一定的线性相关。

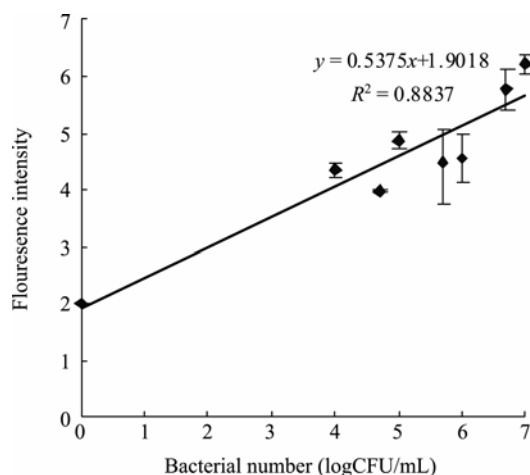


图 8 菌数-荧光强度曲线图

Fig. 8 Effects of bacterial number on fluorescence intensity

3 讨论

利用 NADH 作为体现活菌体数量指标, 应用 NADH 荧光法检测细菌总数在国内尚属首次。本文基于细菌胞内 NADH 荧光特性及其在胞内含量稳定的特性, 建立了一种快速检测细菌总数的新方法—NADH 荧光法。该法原理新颖, 操作简便快速, 稳定性和重复性好, 在检测过程中不需要增菌过程, 大大缩短了检测时间, 且不需要复杂的设备, 检测成本低。本方法细菌总数检测限为 10^4 CFU/mL, 可满足我国国家标准中对不同食品细菌总数最大不得超过 10^6 CFU/mL(g) 的数量化规定。

选择去除食品大分子、非细菌细胞等食品样品前处理方法(如过滤法、差速离心法、非细菌细胞萃取剂等), 可将 NADH 荧光法应用于食品细菌总数快速检测中。

单位菌体胞内 NADH 得率的确定可验证 NADH 荧光法检测细菌总数的准确性。根据 NADH 与荧光强度的关系曲线(图 3)和细菌菌数与荧光强度的关系曲线(图 8)换算出单位细菌菌体胞内 NADH 提取

得率。菌量在 10^4 CFU/mL~ 5×10^9 CFU/mL 单位菌体胞内 NADH 提取得率为 2.82×10^{-12} mol/cell~ 1.07×10^{-14} mol/cell。由于 NADH 是胞内物质, 其含量测定与其提取量有很大关系, 本实验对胞内 NADH 提取方法和条件进行了探讨和优化, 因此单位菌体胞内 NADH 得率高于文献报道^[22]中报道的单位菌体胞内 NADH 的得率 1.66×10^{-18} mol/cell~ 1.66×10^{-16} mol/cell。除此之外, 本实验与文献使用的菌株不同以及培养条件的不同均可能引起 NADH 得率的差异。London J 等^[23]测定了相同培养条件下 *Bacillus megaterium*、*E. coli*、*Pseudomonas fluorescens* 3 种细菌胞内 NADH 含量, 分别为 1.14 nmol/mg、2.44 nmol/mg、0.27 nmol/mg 细菌干重; Setlow B 等^[24]的研究结果中同一条件测得 *B. subtilis*、*B. megaterium* 休眠孢子 NADH 含量分别为 0.108 nmol/mg、0.072 nmol/mg 细菌干重, 说明不同菌种间胞内 NADH 含量有不显著差异, 今后将对不同菌种胞内 NADH 含量作系统研究。近年来 ATP 生物发光法^[25]作为一种简便、快速的微生物检验方法和食品生产环境清洁度的检测方法, 在国内外倍受瞩目, 并得以广泛应用。NADH 与 ATP 具有相似的利用荧光素酶的生物发光反应机理。NADH 是荧光素酶和 FMN:NADH 氧化还原酶双酶体系的重要底物^[26], 在一定条件下发射光强度与 NADH 浓度成正比, 可将单位细菌胞内 NADH 含量的结果应用到双酶体系快速检测致病菌的研究中, 随着荧光素酶提取和纯化技术的成熟, 分子生化技术的不断发展, NADH 的生物发光法的必然会得到深入的发展和广泛的应用。

总的来说 NADH 荧光法是一种简单、易操作、灵敏度高、动态范围好的检测细菌总数的方法。

参 考 文 献

- [1] 食品卫生微生物学检验-菌落总数测定. GB/T 4789.2-2003. 中华人民共和国国家标准.
- [2] 李铁牛, 蒋作明, 廖洪波. 细菌总数快速检测研究进展. 粮油食品科技, 2003, 11(3): 31-32.
- [3] 徐晓可, 吴清平, 周艳红, 等. 肉类中大肠杆菌 O157:H7 多重 PCR 检测方法的建立. 微生物学通报, 2008, 35(4): 619-622.
- [4] Caruso G, Crisafi E, Mancuso M, et al. Development of an enzyme assay for rapid assessment of *Escherichia coli* in

- seawaters. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, **93**(9): 548–556.
- [5] 何 洋, 周黎黎, 刘红露, 等. 基因芯片技术在食品致病菌检测中的应用. *微生物学杂志*, 2005, **25**(4): 92–94.
- [6] 葛 晶. 使用 SPR 生物传感器快速检测大肠杆菌的研究. 吉林大学博士学位论文, 2006.
- [7] Olek RA, Autosiewicz J, Caulini GC, *et al.* Effect of NADH on the redox state of human hemoglobin. *Clinica Chimica Acta*, 2002, **324**: 129–134.
- [8] Renault G, Raynal E, Sinet M, *et al.* A laser fluorimeter for direct cardiac metabolism investigation. *Optics and Laser Technology*, 1982, **14**(3): 143–148.
- [9] Piston DW, Knobel SM. Real-time analysis of glucose metabolism by microscopy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 1999, **10**(10): 413–417.
- [10] Wimpenny JW, Firth A. Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *J Bacteriol*, 1972, **111**(1): 24–32.
- [11] Kasimova MR, Grigienė J, Krab K, *et al.* The free NADH concentration is kept constant in plant mitochondria under different metabolic conditions. *Plant Cell*, 2006, **18**(3): 688–698.
- [12] 刘昆元, 周佐平, 王 璞, 等. NADH 荧光传感器研究-I 综述. *化学传感器*, 1992, **12**(1): 1–8.
- [13] 宋 宇, 王文栋, 张 瑾. 出血性大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ 破碎方法的比较. *辽东学院学报*, 2006, **16**(2): 49–52.
- [14] 孙 健, 杨志建, 许国旺, 等. 粪产碱杆菌青霉素 G 酰化酶的分离提取. *工业微生物*, 2006, **36** (1): 11–15.
- [15] Gunsalus-Miguel A, Meighen EA, Nicoli MZ, *et al.* Purification and properties of Bacterial Luciferase. *Journal of Biological chemistry*, 1972, **247**(2): 398–404.
- [16] Karl DM. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiological Reviews*, 1980, **44**(4): 739–796.
- [17] Andersson, Baechi, Hoechl, *et al.* Autofluorescence of living cells. *Microscopy*, 1998, **191**(1): 1–7.
- [18] Grossie VB, Yick J, Alpeter M, *et al.* Glutamine stability in biological tissues evaluated by fluorometric analysis. *Clinical Chemistry*, 1993, **39**(6): 1059–1063.
- [19] Liang J, Wu WL, Liu ZH, *et al.* Study the oxidative injury of yeast cells by NADH autofluorescence. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2006, **67**(2): 355–359.
- [20] Perlin MH, Mccarty SC, Greer JP, *et al.* Coupled spectrofluorometric assay for aminoglycoside phosphotransferases. *Analytical Biochemistry*, 1988, **171**(1): 145–149.
- [21] Klemm A, Steiner T, Cumme GA, *et al.* Determination, purification, and characterization of α -NADH. *Analytical Biochemistry*, 1993, **212**(2): 375–380.
- [22] Wos ML. Methods for understanding bacterial metabolic activity in activated sludge. Doctoral Dissertation of Griffith University, 2005.
- [23] London J, Knight M. Concentrations of nicotinamide nucleotide coenzymes in microorganisms. *Journal of General Microbiology*, 1966, **44**: 241–254.
- [24] Setlow B, Setlow P. Levels of oxidized and reduced pyridine nucleotides in dormant spores and during growth, sporulation, and spore germination of *Bacillus megaterium*. *The Journal of Bacteriology*, 1977, **129**(2): 857–865.
- [25] 周延秀, 朱果逸, 张文艳. 荧光素酶及荧光素体系在临床检验中的应用. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 1997, **18**(6): 249–252.
- [26] Min DJ, Andrade JD, Stewart RJ. Specific immobilization of *in vivo* biotinylated bacterial luciferase and FMN: NAD(P)H oxidoreductase. *Analytical Biochemistry*, 1999, **270**(1): 133–139.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} , 不用大写 X , 也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s , 不用 SD 。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 SE 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希腊小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>