

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00573

分光光度法快速检测细菌

李冬阳 茹柿平 吴坚* 应义斌

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310029)

摘要 采用分光光度法来检测完整细胞内 H_2O_2 酶的活性, 以实现细菌的快速检测。由于细菌(本研究以 *E. coli* DH5 α 为模型)内含有 H_2O_2 酶, 当往菌液中加入 H_2O_2 时, H_2O_2 会在胞内 H_2O_2 酶的作用下分解, 其分解过程遵循一级动力学反应。通过测量该反应中 H_2O_2 在 240 nm 处吸光度的变化, 可以得出该一级反应的速率常数, 从而获悉菌液的浓度。结果表明: 大肠杆菌单位细胞浓度酶活为 4.2×10^{-13} L/(s · cell), 其速率常数与浓度在 $5.7 \times 10^6 \sim 5.7 \times 10^7$ cfu/mL 范围内呈现良好的线性关系, 检出限为 5.7×10^6 cfu/mL。本方法是一种检测细菌总数的快速方法, 测试时间为 5 ~ 10 min。

关键词 细菌检测; 过氧化氢酶; 酶活性; 分光光度法; 生物传感器

1 引言

摄入含有细菌或细菌毒素的食品会引起细菌性食物中毒。美国疾控中心(CDC)估计, 美国每年食源性致病菌的病例约 7600 万, 其中 5200 例死亡^[1]。1999 ~ 2000 年, 在我国东部部分地区发生了较大规模的 *E. coli* O157:H7 爆发, 对我国经济造成了重大损失^[2]。解决由细菌性中毒引发的食品安全问题尤为紧迫。然而, 由于目前检测手段普遍存在耗时长、操作复杂和成本高等问题, 严重制约了食品安全监控技术和管理体系的完善及实际运行。因此, 建立和推广准确、快速和低成本的细菌检测技术很有必要。

目前, 快速检测细菌的技术主要包括聚合酶链式反应(PCR)、酶联免疫吸附(ELISA)和生物传感器^[3, 4]等。PCR 技术灵敏度高, 相对耗时短, 但对操作人员的技术要求较高^[5]。ELISA 技术较为成熟, 但成本较高, 用于显色的苯类有机试剂易对人和环境造成不利影响。生物传感器作为一种新兴技术, 以其检测快速而闻名, 但由于其构成涉及敏感的生物材料, 稳定性和重复性问题, 严重影响着这项技术投入量产。近年来, 通过检测样品中与细胞浓度成正比的细胞内含物(如 ATP^[6]和酶^[7])来快速监测细菌已引起了广泛关注。酶中以监测 H_2O_2 酶(Catalase)的活性来检测细菌的研究最多。由于 H_2O_2 酶会催化分解 H_2O_2 而产生氧气和水, 检测 H_2O_2 酶的活性需监测反应中产物(O_2)的增加或反应物(H_2O_2)的减少。目前, 通过监测 H_2O_2 来测过氧化酶活性的方法主要有滴定法^[8]、形成中间产物比色法^[9]、化学发光法^[10]、荧光法^[11]、电化学法^[12]和分光光度法^[13]。其中电化学法和分光光度法最为简便, 它们不仅可以实现实时监测, 也无需引入额外的试剂。电化学法因电极易受样品污染等因素导致其稳定性和重复性较差; 分光光度法灵敏度相对要低, 但稳定性好。分光光度法的应用多限于对纯酶的研究, 且通过间隔(Stop-watch)手动测吸光值来研究动力学过程, 尚未见将该法用于完整细胞 H_2O_2 酶活测试的报道。

本研究采用分光光度计法的动力学实时测量模式来监测与完整细胞作用时 H_2O_2 的变化, 并以此测定酶活性, 建立了定量测试细菌浓度的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

2550 紫外分光光度计(日本岛津公司); II 级生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); 高速冷冻离心机(德国 SOVALL 公司); SPX-250 智能生化培养箱(赛福公司); 全自动灭菌锅(台湾浩翰公司); SK3300HP 超声清洗器(科导公司); BS224 型电子天平(德国 Sartorius 公司); 数据分析采用 Origin 软件。

2009-08-10 收稿; 2009-12-02 接受

本文受教育部新世纪人才项目(No. NCET-07-0725)、浙江省重点科技项目(No. 2008C14077)和国家科技专项(No. 2009ZX08012-004B)资助

* E-mail: wujian69@zju.edu.cn

LB 培养基, 10 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4), 30% H_2O_2 溶液 (国药集团), 所用试剂均为分析级以上; 实验用水通过去离子水机 (法国 Millipore 公司) 制备。

2.2 实验方法

2.2.1 大肠杆菌的培养与计数 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 由浙江大学食品系提供。用 LB 培养基在 37 °C 条件下培养 24 h, 在 4 °C、8000 g 条件下离心 15 min, 取出上清液, 将菌泥再用 PBS 悬浮, 之后再离心 (5 min) 和悬浮两次以确保得到将培养基冲洗干净的细菌悬浮液。取 0.1 mL 所得菌液进行梯度稀释, 采用传统的平板计数法计数。将其余的菌液稀释得到不同浓度待测菌液样品。为方便表示, 将离心后所得到的 *E. coli* 菌原液浓度定义为 $E[0]$, 意为 0 倍稀释; 其逐步倍比稀释得到 $0.5E[0]$, $0.25E[0]$, $0.125E[0]$; 将菌原液进行 6 个梯度的稀释得 $E[-1]$, $E[-2]$, $E[-3]$, $E[-4]$, $E[-5]$ 和 $E[-6]$, 其倍比稀释后的表示方法与 $E[0]$ 类似。

2.2.2 H_2O_2 检测波长的选择 以去离子水为参比, 对不同浓度梯度 H_2O_2 (0.01 ~ 1 mol/L) 进行波长扫描 (200 ~ 350 nm), 确定最佳检测波长 240 nm; 在此波长下, 测试不同浓度的 H_2O_2 的吸光度。

2.2.3 不同浓度的细菌与 H_2O_2 作用的动力学实验 分别在不同浓度的菌液中加入 H_2O_2 (最终浓度为 10 mmol/L); 由于浓度超过 10^3 cfu/mL 的菌液都有较强的背景吸收, 需用合适的参比消除背景干扰, 其参比和样品配制见表 1。

表 1 不同浓度的细菌与 H_2O_2 作用时的空白和样品组成

Table 1 Composition of blank and sample when bacteria of different concentrations act with H_2O_2

连续移液至比色皿 Pipette successively into the cuvette	空白池 Blank	样品池 Sample	测试液中的浓度 Concentration in assay mixture	
PBS	1.00 mL	-	PBS	10 mmol/L
样品 (菌液) Sample (bacteria solution)	2.00 mL	2.00 mL		0.67 (V/V)
H_2O_2 (30 mmol/L)	-	1.00 mL	H_2O_2	10 mmol/L

加入 H_2O_2 反应即刻开始; 初始的吸光值应接近于 0.5; 记录吸光值下降过程 300 s (Start the reaction by addition of H_2O_2 ; follow the decrease in absorbance with a recorder for 300 s)。

3 结果与讨论

3.1 H_2O_2 的光谱特性

由于 H_2O_2 酶- H_2O_2 反应的产物为 O_2 和 H_2O , 这两者在紫外波段都没有光吸收, 因此, H_2O_2 的紫外吸收可以直接表征该酶反应体系中 H_2O_2 的浓度。0.01 ~ 1.0 mol/L H_2O_2 在 350 ~ 200 nm 的波长扫描光谱如图 1 所示, H_2O_2 的吸光度随波长的减小而增大。Beers 等选取了 240 nm 研究 H_2O_2 酶- H_2O_2 反应中不同浓度的 H_2O_2 酶的动力学曲线^[13]; 考虑到 Beers 法在测酶活性方面的广泛应用、紫外段仪器光源的稳定性和 200 nm 附近菌液的干扰吸收增大, 本研究选用 240 nm 为 H_2O_2 检测波长, 10 mmol/L 为起始 H_2O_2 浓度^[14]。在该波长下, H_2O_2 吸光度随浓度变化的曲线如图 1 中插图所示。

3.2 H_2O_2 和大肠杆菌在 240 nm 处的稳定性

分别记录 10 mmol/L H_2O_2 以及不同浓度的菌液在 240 nm 处的吸光值随时间变化的响应曲线, 发现 10 min 内吸光度变化小于 0.004, 相比于 0 ~ 1 吸光度范围内仪器自身测光准确度 ($\pm 0.002 \sim 0.004$) 可知, H_2O_2 和大肠杆菌在 240 nm 波长照射下非常稳定。

3.3 不同浓度的细菌与 H_2O_2 作用的动力学

对于一级反应有如下关系式:

$$-dc/dt = kc \quad (1)$$

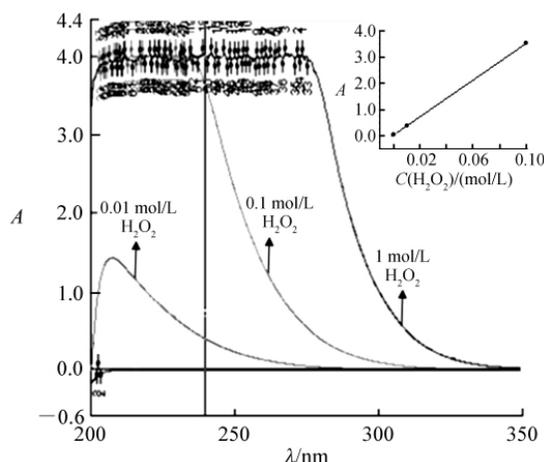


图 1 不同浓度的 H_2O_2 波长扫描图谱

Fig. 1 Wavelength-scan spectrogram of H_2O_2 with different concentrations

式(1)积分整理后得:

$$c = c_0 \exp(-kt) \quad (2)$$

式(2)表示了一级反应中的反应物浓度随时间变化的规律^[15]。若以 $\ln c$ 对时间 t 作图应得到一条直线,而直线斜率的负值就是反应速率常数 k 。由 Lambert-Beer 定律有 $A = \epsilon bc$,可知(2)式还可以表述为:

$$A = A_0 \exp(-kt) \quad (3)$$

H_2O_2 酶催化分解 H_2O_2 的反应为一级反应,其活性最佳 pH 范围为 6.8 ~ 7.5^[14]。本研究中采用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液为测试工作液。图 2 为 10 mmol/L H_2O_2 与不同浓度的细菌作用时的动力学曲线(菌原液的浓度 $E[0]$ 为 5.7×10^7 cfu/mL),将所得曲线用两种方法进行数据处理来计算酶活。

方法一:以速率常数 k 表示酶活性^[10]。用方程 $y = y_0 + A_0 \exp(-kx)$ ^[16] 进行拟合。图 2 以菌原液 $E[0]$ 为例,其拟合线与实测线的重合性良好,最终拟合出的方程为 $y = 0.0307 + 0.35781 \exp(-0.01629x)$, $R^2 = 0.97565$ 。这表明完整细胞(Intact cell)内 H_2O_2 酶与 H_2O_2 的作用仍遵循一级反应。按同样的拟合方法,得到各个菌液浓度下的速率常数 k 值和相关性 R^2 值(表 2),以 k 值对细菌浓度作图得到图 3,可见, k 与细菌浓度之间呈现良好的线性相关性, $R^2 = 0.98573$ 。另外,以单位细胞浓度酶活性 $K'(k/C)$ 表征不同完整细胞的酶活性,不同于传统的以转换数(Specific activity,单位纯酶重量或酶蛋白量的速率常数值)。在测得未知样品酶活的情况下,可以用 K' 计数细菌浓度量,在细菌检测中更有实际意义。不同种细胞之间的酶含量和活性不同,本研究中大肠肝菌的单位细胞浓度酶活 $K' = 4.2 \times 10^{-13}$ L/(s cell)。

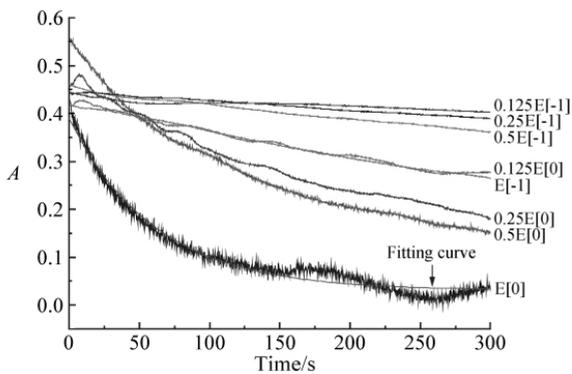


图 2 不同浓度的菌液与 10 mmol/L H_2O_2 作用的动力学曲线(240 nm)

Fig.2 Kinetic curves of *E. coli* with different concentration reacting with H_2O_2

表 2 细菌浓度和拟合所得的 H_2O_2 酶速率常数

Table 2 Bacteria concentration C values and corresponding catalase k values fitted

浓度 Concentration (5.7×10^7 cfu/mL)	k	R^2
1	0.01634	0.97565
0.5	0.00846	0.99775
0.25	0.00574	0.99663
0.125	0.00242	0.99348
0.1	0.00141	0.9980
0.05	0.00159	0.9947
0.025	0.000191	0.9961
0.0125	0.000496	0.8604

方法二:用单位时间内 H_2O_2 吸光值的变化表征酶的活性^[14]。本研究将各浓度菌液的 H_2O_2 酶活值按 0 ~ 5 min 内吸光度的变化 $\Delta A (A - A_0)$ 表示,以 ΔA 对浓度作图得到图 4。可见, ΔA 与细菌浓度之间呈现良好的线性关系, $R^2 = 0.95163$ 。方法二的优点在

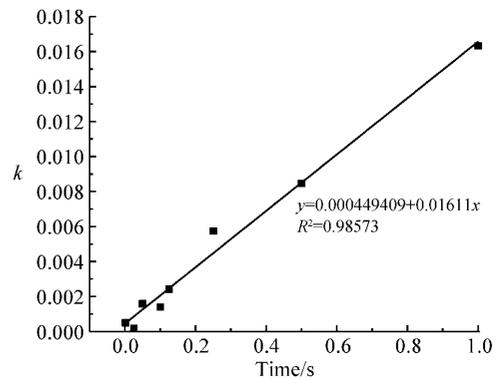


图 3 菌液浓度与速率常数 k 的关系

Fig.3 Relationship between *E. coli* concentrations and corresponding rate constant k

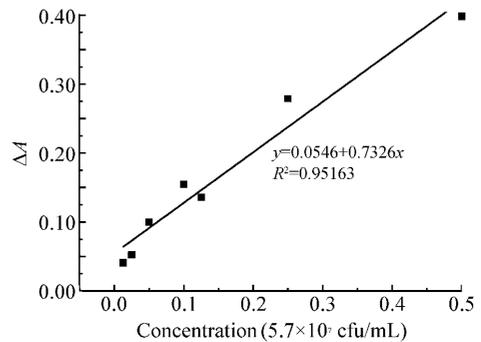


图 4 菌液浓度与吸光度变化值 ΔA 的关系

Fig.4 Relationship between *E. coli* concentrations and corresponding ΔA

于简便易操作,但无法得知该反应是否为一级反应,因为有可能有其它反应混入或混级反应发生,易造成误差。只有在反应确实为一级反应的情况下方法二才能准确,这也是方法一有更好的线性相关性的原因。本研究对象为完整细胞中的酶,而非提取物或纯化酶。由于完整细胞的有机体结构完好,对胞内酶有更好地保护,酶相对更难以失活,这也是本研究中测试时间为 5 min 时反应仍遵循一级反应动力学而未出现酶失活的原因。将监测时间延长到 10 min 时,所测的动力学曲线用方法一拟合后拟合度仍很高,说明 10 min 时完整细胞内的活性基本稳定,未钝化(数据未给出)。这为提高该法的灵敏度提供了可能,因为测试时间越长,反应越充分,信号响应的积累越大,方法的灵敏度更高。

References

- 1 Mead P S, Slutsker L. *Emerg Infect Dis*, **1999**, 5(5): 607 ~ 625
- 2 LI Du-Juan(李杜娟), WANG Jian-Ping(王剑平), YING Yi-Bin(应义斌), LI Yan-Bin(李延斌). *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), **2007**, 23(3): 194 ~ 199
- 3 LI Du-Juan(李杜娟), WANG Jian-Ping(王剑平), GE Lin(盖玲), YING Yi-Bin(应义斌). *Chinese Journal of Sensors and Actuators*(传感技术学报), **2008**, 21(5): 709 ~ 714
- 4 LUO Jin-Ping(罗金平), TIAN Qing(田青), YUE Wei-Wei(岳伟伟), HE Bao-Shan(何保山), CAI Xin-Xia(蔡新霞). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(2): 306 ~ 310
- 5 Lazcka O, Del Campo F J, Munoz F X. *Biosen. Bioelectron*, **2007**, 22(7): 1205 ~ 1217
- 6 Qiu J, Zhou Y, Chen H, Lin J M. *Talanta*, **2009**, 79(3): 787 ~ 795
- 7 Tomas L A L, Ordonez J A, de Fernando G G. *Meat. Sci.*, **2006**, 72(2): 222 ~ 228
- 8 Bonnichsen R K. *Methods Enzymol.*, **1955**, 2: 781
- 9 Cohen G, Dembiec D, Marcus J. *Anal. Biochem.*, **1970**, 34(1): 30 ~ 38
- 10 Mueller S, Riedel H D, Stremmel W. *Anal. Biochem.*, **1997**, 245(1): 55 ~ 60
- 11 Wu M, Lin Z, Wolfbeis O. *Anal. Biochem.*, **2003**, 320(1): 129 ~ 135
- 12 Liu X P, Zweier J L. *Free Radic. Biol. Med.*, **2001**, 31(7): 894 ~ 901
- 13 Beers R F, Sizer I W. *J. Biol. Chem.*, **1952**, 195(1): 133 ~ 140
- 14 Aebi H. *Methods Enzymol.*, **1984**, 105: 121 ~ 126
- 15 WANG Jing-Yan(王镜岩), ZHU Shen-Gen(朱圣庚), XU Chang-Fa(徐长法). *Biochemistry*(生物化学). 3rd Ed(第三版). Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社), **2002**: 353
- 16 Davison A J, Kettle A J, Fatur D J. *J. Biol. Chem.*, **1986**, 261(3): 1193 ~ 1200

Spectrophotometric Method for Rapid Detection of Bacteria

LI Dong-Yang, RU Shi-Ping, WU Jian*, YING Yi-Bin

(College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract The catalase activity of intact cells was investigated with the UV spectrophotometry to realize the rapid detection for bacteria (*E. coli* DH5 α as a model). With the addition of hydrogen peroxide to the bacteria solution, the catalase of the bacteria would decompose the hydrogen peroxide, which followed the first-order kinetic. The first-order rate constant that reflected the bacteria concentration was calculated according to the absorbance change of hydrogen peroxide at 240 nm. The results indicated that there was a linear relationship between the rate constant and the *E. coli* concentration in the range of $5.7 \times 10^6 - 5.7 \times 10^7$ cfu/mL; the catalase activity of intact *E. coli* was 4.2×10^{-13} L/(s • cell). This method could be used to detect the bacteria of 5.7×10^6 cfu/mL within 5 - 10 min.

Keywords Bacteria detection; Catalase; Enzyme activity; Spectrophotometry; Biosensor

(Received 10 August 2009; accepted 2 December 2009)