

分光光度法与酶标仪微量法 测量菌液浓度的比较

杨帆^① 李淑梅^a 杨晓 牛杰

(新乡医学院微生物学教研室 河南省新乡市华兰大道东段 453003)

^a(河南科技学院化学化工学院 河南省新乡市华兰大道东段 453003)

摘要 分别采用分光光度法和酶标仪微量法测量发酵菌液浓度,对两种方法测量结果进行比较。结果表明,两种方法测量的结果无显著性差异($t=0.02$),但酶标仪微量法比分光光度法测量的准确度和精密度高。

关键词 分光光度法;酶标仪微量法;菌液浓度

中图分类号:O657.32

文献标识码:A

文章编号:1004-8138(2011)04-1752-03

1 引言

微生物发酵过程中,需要及时监测发酵菌液浓度来控制发酵工艺。传统测定菌液浓度的方法有稀释平板计数法、重量法、比浊法、血球计数板计数法、电导率法等^[1]。这些方法工作繁琐,误差较大,难以满足实时监测的要求。分光光度法是利用物质在紫外、可见光区的分子吸收光谱,对物质进行定性、定量分析的方法^[2],该法已被广泛的应用于医学、环境、材料、食品等科学领域。前期利用本法对发酵菌液的浓度进行了实时监测,发现该法准确度高、精密度好,所需设备简单^[3];但该方法存在工作量大,操作繁琐,测定时间比较长等缺点。酶标仪是测定酶联免疫的常规仪器,其测定的原理与分光光度法相似,酶标仪具有检测快速、样品微量、一次检测多个样品等优点。本研究分别采用分光光度法和酶标仪微量法对大肠杆菌发酵时的菌液浓度进行检测,对比了两种方法在检测菌液浓度时的优劣。

2 实验部分

2.1 材料与仪器

菌种为大肠杆菌(*E. coli*) JM 109,本实验室保藏。

UV-2100 型双光束紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);TGL-16M 台式高速离心机(长沙市湘仪离心机仪器有限公司);Bio-Rad680 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。实验用水为灭菌双蒸水。

2.2 实验方法

2.2.1 校准曲线的绘制

根据参考文献[3]采用重量法绘制校准曲线。

① 联系人,电话:(0373)3029130;E-mail:yangf77@163.com

作者简介:杨帆(1977—),男,山西省宁武县人,讲师,硕士,主要从事微生物学教学研究工作。

收稿日期:2010-10-21;接受日期:2010-11-11

2.2.2 紫外分光光度法测定菌液浓度

准确取样 5mL, 煮沸 10min, 按 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64 倍比用水稀释成不同浓度, 在 625nm 处用紫外-可见分光光度计测定吸光度 A 。在 $A-C$ 校准曲线上查 A 的对应浓度 C , 将 C 乘以稀释倍数即得样品的菌液浓度。

2.2.3 酶标仪微量法测定菌液浓度

准确取样 5mL, 煮沸 10min, 按 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64 倍比用水稀释成不同浓度, 分别加入未做处理的酶标板微孔内, 每孔 250 μ L, 放入酶标仪中在 625nm 处测定吸光度 A , 并在校准曲线上求得菌液浓度。

2.2.4 两种方法测定菌液浓度的准确度和精密度比较

以重量法测得的菌体浓度为标准, 与分光光度法及酶标仪微量法测得的菌体浓度比较得出两种方法的准确度。平行取 4 个不同的样品分别用两种方法进行测试, 确定二者的精密度。

3 结果与讨论

3.1 校准曲线的绘制

由重量法测定的菌液浓度为基准数据, 作系列稀释后测得吸光度 A , 绘制得校准曲线, 见图 1。回归方程为 $y = 0.7115x + 0.0095$, $r^2 = 0.9982$, 由此可见线性关系良好。在作校准曲线时, 要对发酵液热处理杀死细菌, 因活菌在发酵液中不稳定, 常堆积成团, 均匀性差, 易造成光度分析的误差; 同时菌液浓度较低时制作的校准曲线相关性较差, 相关系数 r 不甚理想。

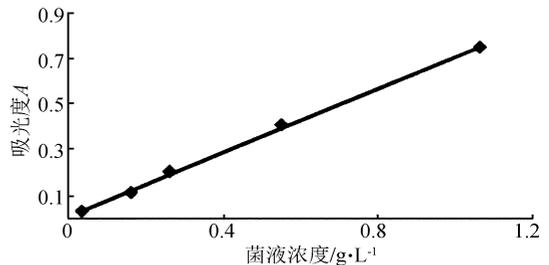


图 1 校准曲线

3.2 紫外分光光度法与酶标仪微量法测定菌液浓度的比较

随机采集 5 份样品, 分别采用分光光度法与酶标仪微量法进行检测, 每个样品作 3 个平行, 取其平均值。结果显示, 分光光度法与酶标仪微量法测定的菌液浓度, 经方差分析差异不显著, 见表 1。

表 1 两种方法测定菌液浓度比较

(g · L⁻¹)

样品	分光光度法		酶标仪微量法	
	菌液浓度	标准差	菌液浓度	标准差
1	0.2403	0.003091	0.2387	0.001247
2	1.3513	0.023795	1.3447	0.021061
3	1.9657	0.033089	1.9140	0.024860
4	2.5770	0.012675	2.5957	0.009463
5	3.3517	0.092687	3.3573	0.028964

注: $t = 0.02$ 。

3.3 两种方法测定菌液浓度的准确度试验

不同的发酵时间段取 3 个样品, 每个样品平行取 5 份, 分别使用两种方法测定其吸光度, 计算出菌液浓度, 取其平均值; 同时按重量法测定其真实浓度, 计算出相对误差, 见表 2。

由表 2 可见, 两种方法测量的相对误差均小于 $\pm 3\%$, 两种方法测量时准确度都较高, 但酶标仪微量法的相对误差较小, 表明酶标仪微量法比分光光度法的准确度高。

表 2 两种方法的准确度试验结果

样品	实际浓度 ($g \cdot L^{-1}$)	分光光度法			酶标仪微量法		
		测量值	误差	相对误差	测量值	误差	相对误差
		($g \cdot L^{-1}$)	($g \cdot L^{-1}$)	(%)	($g \cdot L^{-1}$)	($g \cdot L^{-1}$)	(%)
1	0.617	0.599	- 0.018	- 2.92	0.625	0.008	1.30
2	1.523	1.550	0.027	1.77	1.538	0.015	0.98
3	2.465	2.412	- 0.053	- 2.15	2.439	- 0.026	- 1.05

3.4 两种方法测定菌液浓度的精密度试验

取 4 个不同的样品分别采用两种方法进行测试, 每个样品测量 3 次, 计算出相对标准偏差, 比较两种方法测试的精密度。结果见表 3。

表 3 两种方法的精密度试验结果

样品	分光光度法					酶标仪微量法				
	测量值		平均值	相对标准偏差		测量值		平均值	相对标准偏差	
	($g \cdot L^{-1}$)	($g \cdot L^{-1}$)	($g \cdot L^{-1}$)	(%)		($g \cdot L^{-1}$)	($g \cdot L^{-1}$)	(%)		
1	0.085	0.084	0.082	0.084	1.83	0.081	0.079	0.080	0.080	1.25
2	1.262	1.276	1.302	1.280	1.59	1.264	1.269	1.278	1.270	0.56
3	2.372	2.394	2.423	2.396	1.07	2.368	2.372	2.401	2.380	0.76
4	4.214	4.105	4.025	4.110	2.30	4.184	4.126	4.108	4.139	0.96

由表 3 可见, 采用两种方法测量的相对标准偏差均小于 3%, 酶标仪微量法的相对标准偏差比分光光度法测量的相对标准偏差小, 这是由于酶标仪使用的是垂直光路, 分光光度计使用的是水平光路。垂直光路的优点是标本吸光度受液体浓缩或稀释度的影响较小^[4]。使用酶标仪测量可减少稀释时的误差, 故酶标仪微量法比分光光度法更精密。

4 结论

分光光度法和酶标仪微量法在测量发酵菌液浓度时无显著性差异, 测量的准确度高, 精密度好, 但后者一次可测量多个样本, 操作简单, 能大大减少工作量, 节约时间, 有条件的地方可以使用酶标仪微量法代替分光光度法测定菌液浓度。

参考文献

- [1] 严益民. 比浊法在测定发酵液菌体浓度中的应用[J]. 抚顺石油学院学报, 2001, 21(1): 23—26.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [3] 杨帆, 李淑梅, 陈萍等. 发酵过程中菌液浓度的检测[J]. 光谱实验室, 2009, 26(6): 1643—1645.
- [4] 杨志俊. 酶标仪单、双波长比色测定 OD 值在卫检实验中的应用探讨[J]. 口岸卫生控制, 2004, 9(4): 5—6.

Comparison of Measure of Cell Concentration by Spectrophotometry and Microplate Reader Microtitration

YANG Fan LI Shu-Mei^a YANG Xiao NIU Jie

(Department of Microbiology, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453003, P. R. China)

^aSchool of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, P. R. China)

Abstract The cell concentration in fermentation liquid was measured by microplate reader microtitration and spectrophotometry, and the results were compared. There were no remarkable differences between two methods in measurement results ($t = 0.02$). But microplate reader microtitration has the better accuracy and precision than Spectrophotometry.

Key words Spectrophotometry; Microplate Reader Microtitration; Cell Concentration