CTAB 提取 ATP 的生物荧光法快速检测细菌总数准确性研究

黄彬[1,2]，余元善[1]，唐道邦[1]，徐玉娟[1]，刘忠义[2]，吴继军[1]

（1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所，广东广州 510610）（2. 湘潭大学化工学院，湖南湘潭 411105）

摘要：为降低 ATP 生物荧光法检测费用，本研究采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)为细菌细胞 ATP 的提取剂，β-环糊精为中和剂，优化不同食品体系中细菌 ATP 的提取方法，同时检验 CTAB 提取 ATP 的生物荧光法快速检测细菌总数的准确性。结果表明：大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、乳酸菌和枯草芽孢杆菌细胞采用 CTAB 提取出的细菌 ATP 的发光强度与细菌总数的线性相关性良好，相关系数均在 0.92 以上。对代表性的果汁、面、肉和奶制品经 CTAB 处理提取出细菌 ATP 后，对于细菌总数在 10^3~10^7 CFU /mL 的产品，根据 ATP 的荧光强度，能准确的判断出细菌总数，且生物荧光法与平板计数法两者检测结果的相关系数达到 0.9895。但在原料肉的测定时，提取出的 ATP 的荧光强度与其细菌总数之间的相关性较差，为提高检测准确性，需要预先采用相关去除体细胞 ATP 干扰的配套试剂进行处理。

关键词：ATP 生物荧光法；CTAB 提取；快速检测；细菌总数；准确性

文章篇号：1673-9078(2014)2-269-273

The Accuracy of Rapid Detection of Bacterial Count by Bioluminescence Assay with CTAB-Extracted ATP

HUANG Bin[1,2], YU Yuan-shan[1], TANG Dao-bang[1], XU Yu-juan[1], LIU Zhong-yi[2], WU Ji-jun[1]

(1.Sericulture and Agri-product Processing Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510610, China) (2.College of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, China)

Abstract: The extraction of ATP was optimized using cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) and β-cyclodextrin in order to save ATP bioluminescence detection cost, and its accuracy to estimate the total bacteria counts (TBC) in food was investigated by ATP bioluminescence. Results showed the counts of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, lactic acid bacteria, *Bacillus subtilis* were positively associated with the bioluminescence intensity of ATP extracted by CTAB, and the correlation coefficient was more than 0.92. Moreover, the TBC of some products (such as fruit juices, wheat, milk and meat) detected by plate count method were within 10^3~10^7 CFU/mL, CTAB extracted ATP bioluminescence was consistently according to bioluminescence intensity. And the correlation coefficient of the two methods reached to 0.9895, but a poor relativity was observed in fresh meat. Therefore, the elimination of somatic cell ATP in fresh meat was essential to estimate the TBC when using CTAB method.

Key words: ATP bioluminescence assay; cetyltrimethyl ammonium bromide extraction; rapid detection; bacterial count; accuracy

随着生活水平的提高，食品的安全性越来越被人们所重视。我国的食品安全问题主要包括以下几个方面：微生物性危害、生物毒素、化学性危害、食品掺假和基因工程食品的安全性问题[1]。食品中存在的微生物数量和种类能够反映出食品的新鲜程度、是否变质以及生产过程的一般卫生状况等，也可用来预测食品贮藏的期限，它是判断食品卫生质量的重要依据之一。对微生物菌落总数进行检测的国家标准是平板计数法，需要将样品用营养琼脂在 37 ℃恒温培养箱中培养 48 h 记数，测试时间长，操作繁琐，不适合现场检测。现在国内外广泛研究与应用各种微生物快速检测技术，如 PCR 技术[2]、酶联免疫吸附(ELISA)法[3]、基因芯片技术[4]、电阻抗法[5]、快速测试片技术[6]、ATP 生物荧光法[7~8]等，用来实现细菌总数的快速检测。

三磷酸腺苷(ATP)一种是广泛存在于生物体内的能量物质，每个活菌细胞中 ATP 的含量大致相同[9]，约为 10^{-18} mol，生物体死亡后，ATP 迅速分解，不会

收稿日期：2013-09-29

基金项目：广东省科技计划项目(2010A020104002，2011A080803011，2012B040500058)

作者简介：黄彬(1988-)，女，在读硕士研究生，研究方向为食品科学

通信作者：唐道邦(1973-)，男，副研究员，研究方向为农产品贮藏与加工

对活体微生物的测定产生影响。荧光素酶是一种能够将化学能转化为光能的活性蛋白质，即生物催化剂[10]。ATP 在荧光素酶的催化作用下，在有氧气及镁离子的条件下与荧光素反应释放出荧光，当荧光素及荧光素酶过量时，释放的荧光与 ATP 在一定的浓度范围内成线性关系，因此可以通过生物荧光法检测样品中的 ATP 含量来间接获得其细菌总数[11]。

目前，国外研发出许多商品化的 ATP 检测仪，但其仪器与配套试剂盒价格昂贵，导致推广难度增大，且试剂盒中试剂的组成成分是未知的。本实验研究利用 CTAB 提取细菌 ATP，以期降低检测费用，同时结合食品细菌快速测定仪实现对样品细菌总数的快速检测并分析在不同系统中的准确性。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

LRH 系列生化培养箱，上海一恒科技有限公司；ZHWY-211B 型恒温培养振荡器，上海智城分析仪器制造有限公司；PROFILE®-1 3560 (1X)型食品细菌快速测定仪，New Horizons Diagnostics；XW-80A 型旋涡混合器，上海精科实业有限公司；BILON-08 型无菌均质器，上海比朗仪器有限公司。

1.2 实验材料

甲虫荧光素和荧光素酶（13.75 mg/mL）购于美国 Promega 公司；三羟甲基氨基甲烷（Tris）购于美国 DOW 公司；Profile-1 系统配套试剂盒(Luciferin-Luciferase3, L-L Reconstitution Fluid, Somatic Cell Releasing, Bacterial Cell Releasing, Filtravettes™) 购于美国 New Horizons Diagnostics Corp.；ATP 标准品、β-环糊精（β-CD）、二巯基苏糖醇（DTT）、乙酸镁、氯化钠、十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、乙二胺四乙酸二钠（EDTA·2Na、牛血清白蛋白（BSA）等均为国产分析纯。营养肉汤、MRS 肉汤、平板计数琼脂（PCA）培养基、孟加拉红培养基、MRS 培养基均购于广州环凯微生物科技有限公司。盐水鸡肉自制，康师傅饮品(冰红茶、水蜜桃汁、酸梅汤、经典奶茶)、牛奶（内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司）、果粒橙（可口可乐公司）、加多宝（加多宝（中国)饮料有限公司）、面包（广州市焙之乐食品有限公司），叉烧、白切鸡、卤肉等均购于广州世纪联华超市。

Tris 缓冲液（25 mmol/L Tris，2.5 mmol/L EDTA·2Na，25 mmol/L 乙酸镁，2.5 mmol/L DTT，1 mg/mL BSA，pH 7.4)；荧光素酶用 luciferase buffer（25 mmol/L Tris，1 mmol/L EDTA，0.2 mol/L 硫酸铵，1 mmol/L DTT，15%甘油，30%乙二醇）保存于-80 ℃。

1.3 菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC8739)、金黄色葡萄球菌(*Staphyococcus aureus*, ATCC6538)、乳酸菌(*Lactobacillus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtillis*, ATCC6633)均来于广东省微生物菌种保藏中心。

1.4 方法的建立

将荧光素用 pH 为 7.4 的 Tris 缓冲液配制成 100 mg/mL，荧光素酶用 Tris 缓冲液配制成 80 mg/mL，临用前将两者等体积混合。

1.4.1 ATP 标准曲线的绘制

ATP 标准溶液的配制：称 ATP 标准品 0.0051 g，加入 1 mL pH 为 7.4 的 Tris 缓冲液，得到 10^{-5} mol/mL 的母液，再用 Tris 缓冲液按 10 倍梯度稀释，得到不同浓度的 ATP 标准品。移取 50 μL 混合好的荧光素-荧光素酶加入食品细菌快速测定仪配套的过滤比色杯中，快速加入 50 μL 一定浓度（10^{-10}、10^{-11}、10^{-12}、10^{-13}、10^{-14}、10^{-15} mol/mL）的 ATP 标准品，用移液枪快速吸吹 3 次合上抽屉；记录发光强度 I（RLU 值）；空白值用 Tris 缓冲液代替 ATP 标准品进行测定。所有检测重复 3 次取平均值。

1.4.2 发光强度与细菌总数标准曲线的绘制

将培养好的 4 种菌体用灭菌生理盐水进行 10 倍梯度稀释，形成不同浓度菌液；移取 50 μL 菌液，加入 150 μL 5 mmol/L 的提取剂 CTAB，摇匀放置 2 min，让细菌 ATP 释放出来；再加入 150 μL 7.5 mmol/L 的中和剂 β-CD，中和过量的 CTAB[12]，以免影响酶的活性；移取 50 μL 荧光素-荧光素酶加入过滤比色杯中，快速加入 50 μL 已释放出 ATP 的细菌液，用移液枪快速吸、排 2~3 次合上抽屉，10 s 后记录发光强度 I（RLU 值)；空白样用 Tris 缓冲液代替菌体进行测定。同一样品分别平行、重复测定 3 次，同时进行平板计数对照实验。

1.4.3 实际样品的检测

样品预处理：将样品在室温条件下放置 1~48 h 不等的时间，以期达到不同浓度微生物量。对固体样品以无菌操作称取 25 g 样品，加入灭菌蒸馏水 225 mL，用无菌均质器均质 5 min，混合制成 1:10 的稀释混悬液；将混悬液用无菌滤纸过滤掉悬浮颗粒物。

样品发光强度值测定：对预处理的样品检测同 1.4.2。

配套试剂盒测定发光强度值：移取 50 μL 经预处理的样品加入过滤比色杯中，加入 4 滴体细胞裂解液，用压力器将液体压出，直到吸水纸上无明显液体渗出，再重复一次；将过滤比色杯放入食品细菌快速测定仪拉动抽屉中，加入 2 滴细菌细胞释放液；加 50 μL LL 液，并将杯中溶液快速吸、排 2~3 次，立即关闭抽屉，10 秒钟后记录样品发光强度值。

1.4.4 平板计数

参照 GB/T4789.2-2010《食品微生物学检验 菌落总数测定》

1.4.5 统计分析

用 SPSS17.0 软件对检测结果进行统计分析，采用 Excel 作图。

2 结果与讨论

2.1 ATP 浓度与发光强度的标准曲线

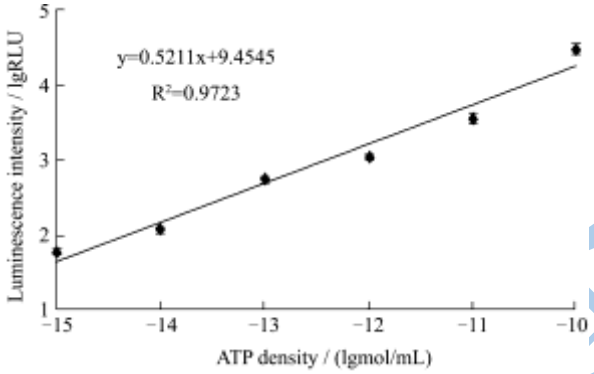

图 1 ATP 浓度与发光强度的关系

Fig.1 The relationship between ATP density and luminescence intensity

以 ATP 浓度的对数值为横坐标，发光强度 RLU 的对数值为纵坐标，绘制 ATP 浓度与发光强度的标准曲线，如图 1 所示。线性方程为 y=0.5211x+9.4545，相关系数 R^2 值为 0.9723，说明 ATP 浓度与 RLU 值之间相关性密切程度较高。由图 1 可以看出，当 ATP 浓度范围在 10^{-10}~10^{-15} mol/mL 时，ATP 浓度与发光强度值呈正相关。因此，发光强度值可以较好地反应 ATP 浓度。

2.2 纯培养细菌总数与发光强度的标准曲线

检测大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、乳酸菌、枯草芽孢杆菌这四种纯培养菌体，分别对四种菌体的各个生长时期进行检测，记录发光强度，同时进行平板计数测定。以细菌总数对数值为横坐标，发光强度对数值为纵坐标，绘制细菌总数与发光强度的标准曲线，四种纯培养菌体的检测结果如图 2 所示。

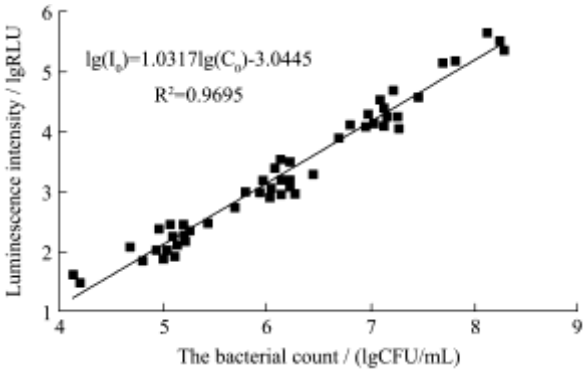

图 2 纯培养细菌总数与发光强度的标准曲线

Fig.2 Calibration curves of pure culture bacterial count and luminescence intensity

由图 2 可以看出，大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、乳酸菌、枯草芽孢杆菌这四种纯培养菌体的细菌总数与发光强度呈明显的正相关性，菌液浓度在 10^4~10^9 CFU/mL 的范围内，测定仪的发光强度 I 随菌液浓度 C 增大而增加，其线性关系为：$lg(I_0)=1.0317\ lg(C_0)-3.0455$，相关系数 R^2 值为 0.9695。因此，纯培养细菌总数可以由生物发光强度值反映，建立这一标准曲线后，就可以通过检测菌体的发光强度推测出样品的细菌总数。

2.3 食品中细菌总数与发光强度标准曲线

快速检测室温放置不同时间的牛奶、果汁、面包、叉烧、白切鸡、盐水鸡等食品中细菌总数的发光强度，同时用平板计数法检测细菌总数，以细菌总数对数值为横坐标，发光强度对数值为纵坐标，绘制食品体系中细菌总数与发光强度的标准曲线，如图 3 所示。

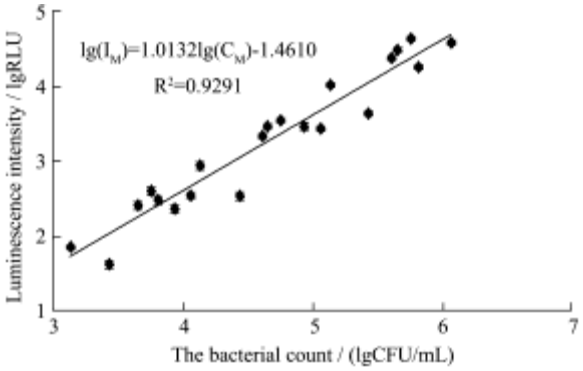

图 3 食品中细菌总数与发光强度的标准曲线

Fig.3 Calibration curves between the bacterial count of food and luminescence intensity

由图 3 可知，食品体系中细菌总数与发光强度呈明显的正相关性，菌液浓度在 10^3~10^7 CFU/mL 的范围内，测定仪的发光强度 I 随菌液浓度 C 增大而增加，其线性关系为：$lg(I_M)=1.0132\ lg(C_M)-1.4610$，相关系数 R^2 值为 0.9291。因此，建立这一标准曲线后，食品

体系的细菌总数可以由食品细菌快速测定仪测得的发光强度值通过换算而快速得到，从而实现食品细菌总数的快速检测。

由图 2 和图 3 可知，检测纯菌体细菌总数与食品体系中细菌总数的线性关系还是有很大的差异，这是因为真正的食品体系是复杂的，它们通常包括革兰氏阴性和革兰氏阳性菌，并不是一个单一菌落的检测结果，食品中各种细菌 ATP 含量存在差异[13]，快速检测食品细菌总数时可以采取 2.3 中标准曲线进行换算。

2.4 标准曲线检测食品中细菌总数的准确性验证

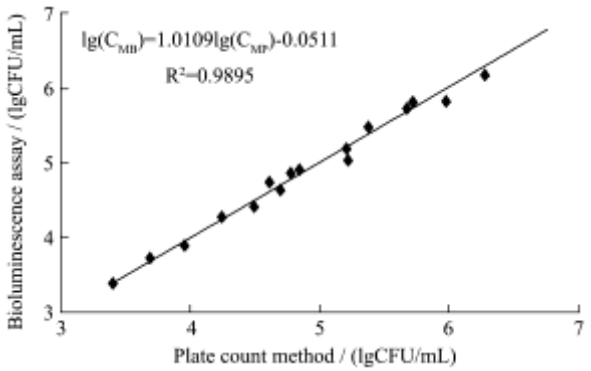

图 4 ATP 生物荧光法与平板计数法检测食品中细菌总数的相关性曲线

Fig.4 Correlation curve between the bacterial count of real food samples detected by the ATP bioluminescence assay and that detected by the plate count method

为验证食品细菌测定仪对食物样本细菌总数快速检测的准确性，选取一系列常规的饮料、面包、熟肉制品等作为实验测试样品，样品用 ATP 生物荧光法测定的同时进行平板计数法检测。图 4 为上述两种方法实验结果的相关性曲线。

通过线性回归，在细菌计数检测之中，两种方法得到了良好的线性关系。描述的其对数关系等式如下：

$$\lg(C_{MB})=1.0109\ \lg(C_{MP})-0.0511$$

C_{MB}、C_{MP} 分别为用生物荧光法和平板计数法得到的细菌数，它显示出两种方法得到的数据良好的相关性，线性标定的范围从 10^3~10^8 CFU/mL，相关系数为 0.9895。结果表明，生物荧光法具备快速检测食物中的细菌总数的能力。

2.5 原料肉体系中细菌总数的测定

以 CTAB 为 ATP 提取剂的生物荧光法检测原料肉的细菌总数，得到的细菌总数对数值与平板计数法对数值比较如表 1 所示。由表 1 可知，用 2 种方法检测得到的细菌总数有很大的差距，而且细菌数越少检测结果的相对误差越大，这是因为用 CTAB 提取细菌细胞的 ATP 时，会将原料肉中的体细胞也裂解，体细胞 ATP 的含量与细菌细胞 ATP 含量相差很大，使得用生物荧光法检测得到的细菌数比实际要多，从而导致检测的准确度降低。用配制的荧光素-荧光素酶结合 CTAB、β-CD 降低了检测成本，但对原料肉中细菌总数检测时，不能排除体细胞 ATP 的影响，使得其应用具有局限性，需要预先采用相关的去除体细胞 ATP 干扰的配套试剂进行处理。用 SPSS17.0 对其进行配对样本 T 检验，分析 2 种方法检测结果的相关性。统计结果显示，Sig(双侧)值为 0，表明用配制的荧光素-荧光素酶检测结果的准确性与平板计数法测得的细菌总数的准确性不一致，此方法不可以用于原料肉中细菌总数的检测。

表 1 CTAB 提取 ATP 的生物荧光法和平板计数法测定原料肉中的细菌总数对数值比较

Table 1 Comparison logarithm value of bacterial counts in fresh meat of bioluminescence assay of ATP extraction by CTAB and the plate count method

方法	样品编号											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ATP 生物荧光法	3.43	3.82	4.28	4.83	5.32	5.49	5.68	6.08	6.68	7.22	7.68	8.27
平板计数法	2.08	2.43	2.96	3.67	4.25	4.37	4.56	5.11	5.79	6.48	6.82	7.72

表 2 试剂盒提取 ATP 的生物荧光法和平板计数法测定原料肉中的细菌总数对数值比较

Table 2 Comparison logarithm value of bacterial counts in fresh meat of bioluminescence assay of ATP extraction by kit and the plate count method

方法	样品编号												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ATP 生物荧光法	2.86	3.51	3.79	4.55	4.79	5.46	5.78	6.42	6.03	6.46	6.63	7.29	7.49
平板计数法	2.59	3.26	3.58	4.43	4.66	5.27	5.62	6.25	6.41	6.50	6.55	7.32	7.55

表 2 为用去除体细胞 ATP 干扰的配套试剂盒检测原料肉中细菌总数与平板计数法对数值的比较。由表

2 可知，这 2 种检测方法检测得到的细菌总数对数级一致，但存在一定差异，这是由于用平板计数法测定细菌总数有一定的局限，因为 PCA 提供的营养基质并不能满足所有细菌的生长需求，这就可能使得平板计数得到的细菌总数偏少，从而导致 ATP 生物荧光法得到的细菌总数会比实际存在的偏多。对配对样本进行 T 检验，分析 2 种方法检测结果的相关性。统计结果显示，Sig（双侧）值为 0.117，2 种检测结果无显著性差异（P>0.05），表明用试剂盒检测的结果与平板计数法准确性一致。

3 结论

3.1 以 CTAB 为细菌 ATP 提取剂的生物荧光法在检测纯菌体时，菌液浓度在 10^4~10^9 CFU/mL 范围内呈现良好的线性关系，相关系数 R^2 值为 0.9695，且具有快速、简便的特点。

3.2 以 CTAB 为细菌 ATP 提取剂的生物荧光法在检测食品中细菌总数时，食品中菌液浓度在 10^3~10^7 CFU/mL 的范围内，测定仪的发光强度对数值与平板计数结果对数值线性关系良好，R^2 值为 0.9291，在实际检测中具有良好的准确性，而且从待测样品的预处理到检测的完成，其整个过程可以控制在 10 min 内。当细菌数在 10^3 CFU/mL 以下时，可采用适当的富集技术，使样品的菌落总数达到有效检测范围。

3.3 用 CTAB 提取细菌 ATP 的生物荧光法对纯培养菌体和食品细菌总数快速检测能代替配套试剂盒，降低检测费用。但在原料肉细菌总数检测中不能排除体细胞 ATP 的影响，需要预先采用相关的去除体细胞 ATP 干扰的配套试剂进行处理，因而存在一定的局限性。

参考文献

[1] 周钧,尹建军,侯玉柱,等.食品中细菌总数快速检测技术的研究进展[J].食品研究与开发,2010,31(12):276-28
ZHOU Jun, YIN Jian-jun, HOU Yu-zhu, et al. Development of Methods for Rapid Detection Technology of Total Bacterial in Food [J]. Food Research and Developent, 2010, 31(12): 276-280

[2] Florence Postollec, Stéphane Bonilla, Florence Baron, et al. A multiparametric PCR-based tool for fast detection and identification of spore-forming bacteria in food [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 142(1-2): 78-88

[3] 陈爱华,杨坚.酶联免疫吸附(ELISA)法在食品微生物检测中的应用[J].中国食品添加剂,2004,4:109-111
YANG Ai hua, YANG Jian. The Technology of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) [J]. China Food Additives, 2004, 4: 109-111

[4] Monica K Borucki, Melissa J Krug, Wayne T Muraoka, et a1. Discrimination among *Listeria monocytogenes* isolates using a mixed genome DNA microarray [J]. Veterinary Microbiology, 2003, 92(4): 351-362

[5] 唐佳妮,吕元,张爱萍,等.阻抗法的研究进展及其在食品微生物检测中的应用[J].中国食品学报,2010,10(3):186-192
TANG Jia ni, LV Yuan, ZHANG Ai ping, et al. Research Progress on Impedance Method and the Applications in Food Microbial Detection [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 10(3): 186-192

[6] 纪淑娟,曹杨.牛奶中菌落总数检测纸片研制及检测效果研究[J]. 中国酿造,2009,2:144-147
JI Shu-juan, CAO Yang. Preparation of Petrifilm for Total Count of Microbr in Milk and Evaluation of its Performance [J]. China Brewing, 2009, 2: 144-147

[7] Min Cho, Jeyong Yoon. The application of bioluminescence assay with culturing for evaluating quantitative disinfection performance [J]. Water Research, 2007, 41(4): 741-746

[8] 唐倩倩,叶尊忠,王剑平,等.ATP 生物发光法在微生物检验中的应用[J].食品科学,2009,29(6):460-465
TANG Qian qian, YE Zun zhong, WANG Jian-ping, et al. Application of ATP Bioluminescence in Microbial Detection [J]. Food Science, 2009, 29(6): 460-465

[9] Jane-Marie Hawronskyj, John Holah. ATP: A universal hygiene monitor [J]. Trends in Food Science&Technology, 1997, 8(3): 79-84

[10] Thérèse Wilson, J Woodland Hastings. Bioluminescence [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1998, 14: 197-230

[11] 罗金平,田青,岳伟伟,等.快速检测细菌总数的便携式生物荧光传感器[J].分析化学,2009,37(2):306-310
LUO Jin-ping, TIAN Qing, YUE Wei-wei, et al. Rapid Detection of Microbial Count Using Portable Bioluminescence-based Biosensor [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2009, 37(2): 306-310

[12] Jin ping Luo, Xiao hong Liu, Qing Tian, et al. Disposable bioluminescence-based biosensor for detection of bacterial count in food [J]. Analytical Biochemistry, 2009, 394(1): 1-6

[13] Noriaki Hattori, Tatsuya Sakakibara, Naoki Kajiyama, et al. Enhanced microbial biomass assay using mutant luciferase resistant to benzalkonium chloride [J] Analytical Biochemistry, 2003, 319(2): 287-295

现代食品科技