

# 微生物发酵液中生物素含量的 ELISA 测定\*

徐幼平<sup>1</sup> 陈正贤<sup>2</sup> 吴建祥<sup>2</sup> 马志超<sup>1</sup>

(浙江大学华家池校区中心实验室 杭州 310029)<sup>1</sup>

(浙江大学华家池校区生物技术研究所 杭州 310029)<sup>2</sup>

**摘要:**生物素与亲和素具有很强的亲和力,本文利用这一特性建立了一种直接竞争抑制的酶联免疫法(ELISA),用于检测微生物发酵液中生物素含量。当标准品生物素含量在 0.5~20 $\mu$ mol/L 范围内,它与抑制率(I)负对数呈线性关系,因此发酵液样品中生物素含量可从标准曲线上查得。该法简便、准确,而且不需对样品作任何预处理。

**关键词:**生物素,亲和素,ELISA,发酵液

**中图分类号:** TQ924-33    **文献标识码:** B    **文章编号:** 0253-2654(2000)-01-047-04

---

\* 浙江省分析测试基金资助项目

收稿日期: 1998-11-09 修回日期: 1999-05-12

## ELISA DETERMINATION OF BIOTIN IN FERMENTATION LIQUID

XU You-Ping<sup>1</sup> CHEN Zheng-Xian<sup>2</sup> WU Jian-Xiang<sup>2</sup> MA Zhi-Chao<sup>1</sup>(Central Laboratory, Zhejiang University, Huajiachi campus, Hangzhou 310029)<sup>1</sup>(Biotechnology Institute, Zhejiang University, Huajiachi campus, Hangzhou 310029)<sup>2</sup>

**Abstract:** Based on the strong affinity between biotin and avidin, direct competitive inhibitory ELISA, which was applied to the determination of biotin in fermentation liquid was proposed. A linear response between the concentration of biotin and  $-lgI$  was obtained in the range of  $0.5 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ . So the level of biotin in fermentation liquid could be calculated from the standard curve. The method was simple, rapid and accurate. Any pretreatment was not necessary for samples.

**Key words:** Biotin, Avidin, ELISA, Fermentation liquid

生物素,即维生素H,它在整个生物界不可缺少的  
重要营养素,尽管其需要量很低,但它作为羧化酶的辅  
酶<sup>[1]</sup>,参与蛋白质、脂肪和碳水化合物的代谢,从而影响  
动、植物的生长和发育。对于生物素的测定方法,国内  
外均有报道,主要有:荧光测定法、比色测定法、微生物  
测定法、高效液相色谱法等<sup>[2]</sup>。目前,ELISA已广泛应  
用于各种生物大分子(如细菌、病毒及蛋白质等)、小分  
子(半抗原)物质等的检测。本实验利用生物素——亲  
和素酶免疫法,测定组份比较复杂的微生物发酵液  
中生物素含量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂:生物素、亲和素均购自Sigma公司;  
辣根过氧化物酶(HRP)、牛血清白蛋白(BSA)购自上海  
华美生物工程公司。

1.1.2 菌株:B975,本实验室从牧场土壤中分离所得。  
初步鉴定为革兰氏阳性(短)杆菌。

1.1.3 发酵液样品:将菌株B975接于发酵培养基中,  
30℃培养3d。

发酵培养基:蛋白胨1g,大豆粉10g,葡萄糖5g,甘  
油2g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05g, 庚二酸0.1g,  
pH7.2,定容至100mL。

1.1.4 仪器:BIO-RAD550型酶标仪

### 1.2 方法

1.2.1 生物素活化:采用脱水缩合法制备活化生物素,

即生物素酰羟基丁二酰亚胺(BNHS),方法参见文献<sup>[3]</sup>。

1.2.2 HRP与BSA交联:按照郭春祥等过碘酸钠法<sup>[4]</sup>。

1.2.3 HRP-BSA与BNHS进一步交联:将HRP-BSA  
的  $\text{NaHCO}_3$  (0.1mol/L, pH8.4)溶液2mL与1mg BNHS  
的二甲基乙酰胺(DMF)溶液20 $\mu\text{L}$ 混匀后,置22℃4h,  
再在4℃中对PBS(0.05mol/L, pH7.2)透析24h,继加等  
体积甘油,贮于-30℃备用。

1.2.4 ELISA法:亲和素(2ng/ $\mu\text{L}$ )包被于聚苯乙烯微  
孔板,100 $\mu\text{L}$ /孔,37℃2h或4℃过夜,用PBST洗涤3  
次,每次3min(下同)。每孔加入100 $\mu\text{L}$  10%牛血清封  
闭液,37℃30min, PBST洗涤。然后加100 $\mu\text{L}$ 经适当稀  
释的生物素标准品或发酵液样品,37℃反应30min,  
PBST洗涤。每孔加入100 $\mu\text{L}$ 一定浓度的HRP-BSA-  
BNHS交联物,37℃30min, PBST洗涤。最后加邻苯二  
胺底物液100 $\mu\text{L}$ ,37℃显色20min,用50 $\mu\text{L}$  2mol/L硫  
酸终止反应。测  $OD_{490\text{nm}}$  值。

## 2 结果

### 2.1 标准曲线制作

生物素标准溶液配制为:0.25~25 $\mu\text{mol/L}$ 系列浓  
度。酶交联物HRP-BSA-BNHS工作浓度为1:500。图  
1结果表明,当生物素浓度在0.5~20 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,它  
与抑制率(I)负对数呈线性相关,其直线回归方程为:  
 $y = 0.3560 + 0.0763x$ , 相关系数  $r = 0.9989$ 。

### 2.2 发酵液样品中生物素含量测定

从表1可见,当发酵液稀释倍数为40、80和160

时,相应 $-\lg I$ 值均位于标准曲线直线段,故可分别查得其生物素含量。经计算得,原发酵液中生物素含量分别为 $353.20\mu\text{mol/L}$ 、 $350.40\mu\text{mol/L}$ 、 $344.00\mu\text{mol/L}$ ,三者结果非常接近,取其平均值 $349.20\mu\text{mol/L}$ 即为该发酵液样品中生物素含量。

2.3 酶交联物 HRP-BSA-BNHS 经饱和硫酸铵沉淀的影响

试验中 HRP-BSA-BNHS 需要经过饱和硫酸铵沉淀处理。表 2 为不经饱和硫酸铵沉淀时的测定结果。在 HRP-BSA-BNHS 浓度较高情况下(1:100 稀释),随生物素含量增加, $OD_{490\text{nm}}$ 基本不变,即其抑制率基本无

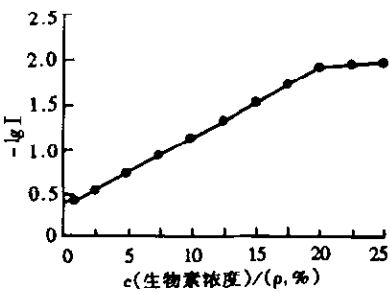


图 1 生物素浓度和  $-\lg I$  的关系

A. 加生物素抑制孔的  $OD_{490\text{nm}}$  值,  $A_0$ . 无生物素抑制孔的  $OD_{490\text{nm}}$  值, 即不抑制孔对照  $I = A/A_0$

表1 发酵液中生物素含量测定结果

稀释倍数	20	40	80	160	320
$OD_{490\text{nm}}$	0.02	0.19	0.42	0.62	0.92
$-\lg I$	2.01	1.03	0.69	0.52	0.35
生物素含量 ( $\mu\text{mol/L}$ )		8.83	4.38	2.15	

表2 HRP-BSA-BNHS不经饱和硫酸铵沉淀测得的 $OD_{490\text{nm}}$ 值

HRP-BSA-BNHS	生物素标准品含量 ( $\mu\text{mol/L}$ )				
稀释倍数	2.5	5	10	20	40
1:100	0.423	0.417	0.402	0.395	0.381
1:800	0.412	0.378	0.227	0.165	0.108

变化,推测这是因为 HRP-BSA-BNHS 若不经饱和硫酸铵沉淀,其中含有大量游离生物素,它与反应板上包被的亲合素优先结合,导致 HRP-BSA-BNHS 很难再结合上去。只有当它以 1:800 倍稀释时, $OD_{490\text{nm}}$  值随生物素含量增加而减小。这主要因为当 HRP-BSA-BNHS 进

一步稀释,其中游离生物素也将减少,因此对结果影响相对减小。而当 HRP-BSA-BNHS 用饱和硫酸铵沉淀处理后,其中的游离生物素已经去除,因此即使在酶交联物浓度较高(1:100 稀释)的情况下, $OD_{490\text{nm}}$  值随生物素含量增加而减小,仍表现较好趋势(见表 3)。

表3 HRP-BSA-BNHS经过饱和硫酸铵沉淀测得的 $OD_{490\text{nm}}$ 值

HRP-BSA-BNHS	生物素标准品含量 ( $\mu\text{mol/L}$ )				
稀释倍数	2.5	5	10	20	40
1:100	0.764	0.681	0.520	0.208	0.153
1:800	0.482	0.396	0.258	0.169	0.112

表4 方法添加回收率

实验次数	添加量 ( $\mu\text{g}$ )	测得量 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	15.25	14.28	93.64	
2	15.25	14.36	94.16	
3	30.50	29.02	95.15	93.67
4	30.50	28.37	93.02	
5	45.75	42.63	93.18	
6	45.75	42.48	92.85	

## 2.4 方法的添加回收率

在 10mL 发酵液样品中添加已知量的标准生物素,按文中所述方法测定其含量,结果如表 4 所示。方法回收率基本保持在 93.67% 左右。

## 3 讨论

生物素和亲和素的结合反应快而专一,由此建立的 ELISA 法具有高度的特异性和准确度。由于微生物发酵液中组份非常复杂,若用其它方法(如 HPLC),样品必须经过冗长而繁琐的前处理过程。采用 ELISA 法测定发酵液中生物素含量,对样品不需要作任何预处理,结果不受其他成份的干扰。因此该法操作简便,结果准确,且重复性好,特别适合于样品量多,比如微生物生物素高产菌株的筛选以及发酵条件优化工作。为了提高酶交联物的效价,HRP 应先与 BSA 结合,再与

BNHS 交联;另一方面,HRP-BSA 与 BNHS 交联反应首先要求有合适的摩尔比,然后对 PBS 透析,最后经饱和硫酸铵沉淀,尽量使游离生物素减少到最低程度,这是该法的关键,否则将严重影响实验结果。

## 参 考 文 献

- [1] Izumi Y, Yamada H. *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factor*, 1989, 10:231~251.
- [2] Mohammad H.H. Al-Hakim. *Analytical Biochemistry*, 1981, 116:264~267.
- [3] 章谷生,李绍康,顾克家等. *生物工程学报*, 1985, 1(1): 75~80.
- [4] 郭春祥. *上海免疫学杂志*, 1983, 3(2):97~100.