

一种生物素快速测定方法及其结果运算的计算机程序

鄂超苏 卢运玉

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

生物素是一种小分子化合物, 它以羧化酶辅酶形式微量存在于一切活细胞中, 为生命不可缺少的物质。近年来, 我们致力于微生物生物素高产菌株的筛选工作, 对这一工作来说, 一种快速简便且有效的生物素测定方法是至关重要的。已有的测定生物素方法很多, 有化学法和微生物法^[1-3]。化学法易受样品中杂质的干扰, 一般只适合于较纯生物素样品的测定。微生物法有较高的专一性, 不受杂质干扰, 但常用的微生物法系用比浊测定, 操作繁琐, 条件不易控制, 结果往往不稳定, 不适合工作需要。经过逐步摸索, 我们建立了一套生物素快速平板测定法, 并利用计算机处理结果。这一方法省时简便而又准确, 现报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 测定菌株

BIT39 菌株, 系生物素缺陷型酵母菌。

(二) 培养基

1. 测定培养基 (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, NaCl 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, K_2HPO_4 0.125, KH_2PO_4 0.87, 葡萄糖 20, $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01, 琼脂粉 8, 加冷开水至 1000ml, pH6.5。

2. 测定菌生长培养基 (g/L): 酵母粉 5, 葡萄糖 10, 琼脂粉 12, 加蒸馏水至 1000ml, pH7.0。

(三) 测定菌悬液

将测定菌接于铺有生长培养基的茄子瓶内, 28℃ 培养 24 小时。用玻璃珠和无菌水将菌体洗下, 离心收集菌体, 用无菌水洗两次后, 用生理盐水做成悬液。调整其浓度为稀释 120 倍后在 600nm 处的光吸收 OD1cm 值为 0.65。

(四) 标准生物素溶液

1. 母液: 精确称取生物素 5mg, 加无水乙醇 25ml, 搅拌使之溶解。将溶液倒入 50ml 容量瓶中, 加蒸馏水定容至 50ml。此溶液生物素浓度为 100μg/ml, 在 4℃ 可保存一年。

2. 标准溶液: 用无菌水将母液稀释配成浓度分别为 5.0、2.0、1.0、0.5、0.4、0.3μg/ml 的生物素标准溶液。

(五) 样品

将从土壤中分离得到的 B1960、B1325、B2576、B1540 菌株接入发酵培养基中, 28℃ 培养 24 小时, 离心除去菌体后, 发酵液直接用于生物素测定。

(六) 其他材料

1. 测定用平板: 规格为 18 × 32cm, 四边为木框架, 底面为玻璃, 上为玻璃或木板盖。

2. 点样用圆纸片: 用普通打孔器在双层 3 号滤纸上打孔即得, 纸片直径为 0.55cm。

(七) 方法

本文于 1991 年 11 月 1 日收到。

本工作为国家自然科学基金和轻工业部科技发展基金资助项目研究内容之一。

实验是在徐浩研究员的指导下进行; 周坚同志提供测定菌种, 在此一并致谢。

1. 铺平板: 将无菌的大平板置于水平平面上, 铺双层培养基, 下层为 150ml 测定培养基, 上层为 100ml 含 3% 测定菌悬液的测定培养基。

2. 点样: 将双层圆纸片排列在铺好测定培养基的平板上, 吸取不同浓度的标准液和样品点于纸片上, 点样量为 20 μ l。

3. 培养: 将点好样的平板置于 28 $^{\circ}$ C 培养 24 小时后, 纸片的周围会产生圆形生长圈。用游标卡尺测量生长圈的直径。

结果和讨论

各标准生物素溶液的生长圈直径测量结果见表 1。

表 1 生物素标准液生长圈直径的测定

标准样号	生物素浓度 C(μ g/ml)	生长圈直径(均值) D(cm)
1	5.00	3.525
2	2.00	3.185
3	1.00	2.900
4	0.50	2.560
5	0.40	2.485
6	0.30	2.350

表 2 样品生物素浓度的测定

菌 种	生长圈直径(均值) D(cm)	产生物素浓度 C(μ g/ml)
B1960	2.650	0.59
B1325	2.610	0.54
B2576	2.935	1.12
B1540	3.115	1.70

以标准生物素浓度的对数 ($\lg C$) 为纵座标, 相应的生长圈直径 (D) 为横座标画图, 可得到一条较为理想的直线(图 1)。为了检验 D 与 $\lg C$ 之间线性关系的可靠性, 对数据作统计学处理, 结果如下。

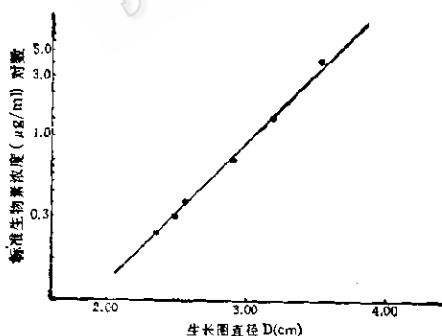


图 1 生物素测定标准曲线

D 和 $\lg C$ 的线性相关方程为:

$$\lg C = 1.0270D - 2.4977$$

线性相关系数 $r = 0.9994$

这组数据的自由度为 4, 取置信水平 $\alpha = 0.01$ 时, 临界相关系数 $r_{0.01} = 0.917$, $r > r_{0.01}$

以上结果说明 $\lg C$ 和 D 之间有非常好的线性关系, 统计学处理表明这种关系是可靠的。利用这条标准曲线, 在同样条件下, 可测

定出样品中未知的生物素浓度(表 2)。

这一方法的生物素测定范围是 0.3—5.0 μ g/ml。实验结果说明在这一范围内, $\lg C$ 和 D 之间的线性关系最好, 也最稳定。因此, 也就利用这一范围做生物素标准曲线。

测定菌株 BIT39 的最低生物素检出浓度为 0.01 μ g/ml。为了保证条件的一致性, 标准曲线和样

品的测定必须在同一块板上进行。结果的计算是一套固定的方法, 所以我们将此方法编成一简单的 BASIC 计算程序, 利用计算机进行结果运算, 其程序如下:

```

10 Y1 = .699:Y2 = .301:Y3 = 0:Y4 = -.301:Y5 = -.398:Y6 = -.523
20 READ X1,X2,X3,X4,X5,X6
30 AX = (X1 + X2 + X3 + X4 + X5 + X6)/6:AY = (Y1 + Y2 + Y3 + Y4 + Y5 + Y6)/6
40 XY = (X1 - AX)*(Y1 - AY) + (X2 - AX)*(Y2 - AY) + (X3 - AX)*(Y3 - AY) + (X4 - AX)
    *(Y4 - AY) + (X5 - AX)*(Y5 - AY) + (X6 - AX)*(Y6 - AY)
50 X = (X1 - AX)^2 + (X2 - AX)^2 + (X3 - AX)^2 + (X4 - AX)^2 + (X5 - AX)^2 + (X6 - AX)^2
60 Y = (Y1 - AY)^2 + (Y2 - AY)^2 + (Y3 - AY)^2 + (Y4 - AY)^2 + (Y5 - AY)^2 + (Y6 - AY)^2
70 B = XY/X
80 A = AY - B*AX
90 PRINT "生物素浓度 C 与生长直径 D 的直线相关方程为: "
100 PRINT "lgC = ";B;"D + ";A
110 R = XY/(X*Y)^(1/2): PRINT "线性相关系数 R = ";R
120 IF R>.917 THEN 160
130 IF R>.811 THEN 180
140 PRINT"此曲线无意义"
150 GOTO 160
160 PRINT "取置信水平  $\alpha = 0.01$  时, lgC 与 D 有显著相关性": PRINT
170 GOTO 190
180 PRINT"取置信水平  $\alpha = 0.05$  时, lgC 与 D 有显著相关性": PRINT
190 INPUT"m = ";M
200 FOR N=1 TO M STEP 1
210 READ D: LGC = B*D + A: C = 10^LGC
220 PRINT "D"; N; " = "; D; TAB(19)"C"; N; " = "; INT ((C + .0005)*1000)/1000
230 NEXT N
240 PRINT:PRINT:PRINT
250 DATA 3.525,3.185,2.90,2.56,2.485,2.35,2.65,2.61,2.935,3.115,
260 END

```

此程序包括数据的统计学处理和最终结果计算。应用时先将实验得到的标准生物素溶液生长圈直径和样品生长圈直径数据按顺序输入程序。运行程序后, 计算机将先给出标准曲线的线性方程及其相关系数, 并判断方程有无意义。在线性方程有意义的情况下, 计算机将会算出每个样品中的生物素浓度。用计算机进行结果运算, 大大省时省力, 所得结果也更加准确。

参 考 文 献

- [1] Plinton, C. et al.: *J. Pharm. Sci.*, 58: 875, 1969.
- [2] Tsuda, T. et al.: *Ann. Sankyo Res. Lab.*, 20: 65, 1968.
- [3] Lin, H. J. et al.: *Anal. Biochem.*, 81: 422, 1977.
- [4] Viswanathan, V. et al.: *J. Pharm. Sci.*, 59: 400, 1970.
- [5] Augustin, J. et al.: *Methods of Vitamin Assay*, 4th, p. 535, Wiley, New York, 1985.
- [6] Genghef, D. S. et al.: *Arch. Biochem.*, 17: 413, 1948.
- [7] Jones, A. et al.: *Analyst*, 79: 586, 1954.

A RAPID ASSAYING METHOD FOR BIOTIN DETERMINATION AND THE COMPUTER PROGRAM FOR DATA CALCULATION

E Chaosu Lu Yunyu

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

A rapid auxanographic method for biotin determination was established by means of a biotin auxotrophic yeast strain, and a computer program was designed to calculate the data obtained. Its determination concentration ranges from 0.3 to 5.0 $\mu\text{g/ml}$. The time-tested routine work in our laboratory proved that it is rapid, precise and reliable.

Key words Biotin; Determination method

JOURNALS.IM.AC.CN