

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(6): 826–830; 4 June 2009
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

利用 ATP 扩增反应与生物发光法结合检测微量微生物

陈颖¹, 邹秉杰^{1,2}, 朱术会¹, 马寅姣¹, 周国华^{1,2,3*}

(¹ 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

(² 华东医学生物技术研究所, 南京 210002)

(³ 南京大学医学院, 南京 210093)

摘要:【目的】腺苷酸激酶(adenylate kinase, ADK)和多聚磷酸盐激酶(polyphosphate kinase, PPK)偶联催化的 ATP 扩增反应结合生物发光检测法能够对微量微生物进行检测。但是 PPK 当中结合的内源性的 ADP 会产生背景干扰,影响测定。本文旨在融合表达 ADK 和 PPK,并建立一种方便有效的内源性 ADP 的去除方法,降低背景,使之与传统生物发光法结合,实现高灵敏生物发光法检测微量 ATP 及微生物。【方法】PCR 扩增得到 PPK、ADK 基因,插入表达载体 pET28a(+)中构建重组表达质粒 pET28a(+)-PPKADK,表达 PPK-ADK 融合蛋白。利用表面包裹聚胺醇(Polyurethane)的磁珠(magnetic beads),通过化学反应将腺苷酸双磷酸酶(apyrase)固定于磁珠表面,制备固相腺苷酸双磷酸酶(Beads-apyrase),用于除去与融合蛋白结合的内源性 ADP,降低 ATP 扩增反应的背景,从而使之与生物发光反应相结合,测定微量外源 ATP 及细菌菌落数。【结果】表达的融合蛋白具有 PPK 和 ADK 的活性,利用 Beads-apyrase 可以方便而有效的去除内源性 ADP,显著地降低反应背景,从而实现了利用 ATP 扩增反应与传统生物发光反应结合,测定了小于 1 fmol 的外源微量 ATP,使生物发光法检测 ATP 及微生物的灵敏度提高至少 100 倍。【结论】利用 Beads-apyrase 能够方便、有效地降低 PPK-ADK 中的 ADP 背景,从而使 PPK-ADK 催化的 ATP 扩增反应能够与传统生物发光法相结合,极大地提高了生物发光法的灵敏度。

关键词: ATP 扩增反应;腺苷酸激酶;多聚磷酸盐激酶;生物发光检测

中图分类号: Q93.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)06-0826-05

目前,利用生物发光法检测 ATP^[1]已应用于许多方面,尤其在食品卫生监控中,利用生物发光法进行微生物菌落计数已被认为是一种快速而有效的方法^[2]。但是传统的生物发光法不能检测低于 10^{-14} mol 的 ATP,这种灵敏度有时达不到卫生学要求,所以需要寻求一种有效的方法,使低于 10^{-14} mol 的微量的 ATP 也能够被生物发光法所检测,从而提高生物发光法的检测限和灵敏度。

腺苷酸激酶(ADK)^[3]和多聚磷酸盐激酶(PPK)^[4-6]共同作用可以对 ATP 进行扩增,其原理

如图 1 所示。1 分子的 ATP 被 ADK 催化生成两分子的 ADP,再通过 PPK 利用 polyP 将两分子 ADP 转化成两分子 ATP,两分子 ATP 可经过相同的反应生成 4 分子 ATP,连续的循环反应后,即可像 PCR 一样完成对 ATP 的指数扩增^[7-9]。将该反应与传统的生物发光反应相结合,就能够实现原本利用生物发光法无法测定的微量 ATP 的检测。

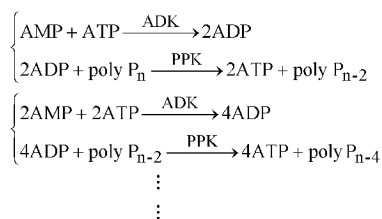
但是,制备的 PPK 往往会紧密结合少量的底物 ADP,当 polyP 存在时,不加外源 ATP,这些内源性的 ADP 也会引发 ATP 扩增反应,从而带来很高的背

基金项目:国家自然科学基金(30470454);日本日立中央研究所资助

* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-84514223; E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

作者简介:陈颖(1983-),女,湖北省钟祥人,硕士,主要从事功能蛋白质的表达及应用研究。E-mail: chensiyu1123@163.com

收稿日期:2008-11-22; **修回日期:**2009-02-19



ATP 扩增原理图

Fig.1 The principle of ATP Amplification.

景,限制了该反应的实际应用。为了应用此方法结合生物发光反应检测微量的外源 ATP,就必需除去与 PPK 结合的 ADP。Sato 等采用大量的腺苷酸双磷酸酶(apyrase)处理带有 His 标签的融合蛋白 PPK-ADK,利用 apyrase 来降解去除内源性 ADP,再通过镍亲和层析除去加入的 apyrase^[7]。这种降低背景的方法不但操作十分繁琐,而且处理过程消耗的大量 apyrase 也难以再利用,使得制备 PPK-ADK 的成本很高。

本文以 pET28a (+) 作为表达载体,构建重组质粒 pET28a (+)-PPKADK,并在大肠杆菌中表达融合蛋白 PPK-ADK。为去除内源性 ADP,将 apyrase 与磁性微球(magnetic beads)相结合,制备固相腺苷酸双磷酸酶(Beads-apyrase),利用 Beads-apyrase 处理制备的 PPK-ADK 后,无需复杂的层析过程,只要用磁铁

吸引,就能将 apyrase 与 PPK-ADK 分离,并且 Beads-apyrase 可以回收利用,极大地降低了实验成本。经过 Beads-apyrase 处理的融合蛋白可以有效扩增微量的外源 ATP,与生物发光测定法结合,将生物发光法测定大肠杆菌菌落数的灵敏度提高了 100 倍。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株: 宿主菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 及原核表达质粒 pET28a (+) 购自 Novagen 公司。大肠杆菌标准株 CMCC (B) 44102 为本实验室保存。

1.1.2 试剂: 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、蛋白 Marker、PCR 产物纯化试剂盒购自 Takara 公司; d-虫荧光素, 荧光素酶购自 Promega 公司; AMP、polyP (average chain-length: 65)、Apyrase 购自 Sigma 公司; Dynabeads M-280 Tosylactivated 购自 Invitrogen 公司; His·Bind Resin 和 His·Bind Columns 购自 Novagen 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物: 根据文献报道的大肠杆菌 PPK、ADK 基因序列和载体 pET28a (+) 多克隆位点, 设计引物, 如表 1 所示:

表 1 引物
Table 1 Primer

Primer	Sequence(5'→3')	Size/bp	Restriction site
PPK-P1	GTGTGTCATATGATGGGTCAGGAAAAGCTATA	32	Nde I
PPK-P2	GTGTGTGGATCCTTCAGGTGTCGAGTGATT	32	BamH I
ADK-P1	GTGTGTGGATCCATG CGTATCATTTCTGCTTGG	32	BamH I
ADK-P2	GTGTGTAAGCTTTTAGCCGAGGATTTTTTCCA	32	Hind III

1.2 融合蛋白 PPK-ADK 的制备

以大肠杆菌基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 扩增 PPK、ADK 基因, 插入质粒 pET28a (+) 中, 构建重组质粒 pET28a (+)-ADK。PPK 扩增产物插入重组质粒 pET28a (+)-ADK 中, 构建重组表达质粒 pET28a (+)-PPKADK。

将重组菌进行诱导表达, 分别于 0 h、1 h、3 h、5 h 收集 1 mL 菌液, 离心收集菌体, SDS-PAGE(12%) 分析外源蛋白表达情况。收集诱导表达 5 h 的菌体, 超声破碎后, 收集上清, 进行 SDS-PAGE(12%) 电泳。采用镍亲和层析系统进行纯化, 具体操作步骤参照 Novagen 公司操作手册进行。将洗脱液用截留分子量为 10000 的超滤膜进行超滤除盐, 所得产品进行 SDS-PAGE(12%) 分析其纯度。

1.3 融合蛋白内源性 ADP 的去除

首先制备 Beads-apyrase(磁珠固定的双磷酸酶, 能够降解 ATP 并能通过磁铁吸引从溶液中去掉), 制备方法参见 Dynabeads M-280 Tosylactivated (Invitrogen) 说明书。取 3 μg 融合蛋白与 1 μmol polyP 在 37 °C 条件下孵育 10 min 后, 加入 1 μL Beads-apyrase 继续孵育 10 min, 在磁铁的作用下, Beads-apyrase 可以从溶液中回收并重复利用, 经过 Beads-apyrase 处理的酶去掉了内源性的 ADP 可以用来检测外源微量的 ATP。

1.4 外源微量 ATP 的扩增反应

微量 ATP 扩增反应使用的反应液组成为: 10 μmol/L AMP, 400 μmol/L PolyP, 8 mmol/L MgCl₂, 60mmol/L Tris-HCl, 0.3 μg PPK-ADK, pH 7.4。反应时向 49 μL 反应液中加入 1 μL ATP 终浓度分别为

2×10^{-10} mol/L, 2×10^{-9} mol/L, 2×10^{-8} mol/L), 37 °C 温浴, 每反应一段时间从中取出 1 μ L 加入到 10 μ L 生物发光反应液中测定荧光信号, 同时以不加 ATP 的反应液作为对照, 以发光信号对时间作图得到微量 ATP 的放大曲线。生物发光反应液组成: 0.1 mol/L Tris-Ac (pH 7.75), 0.5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L Mg (Ac)₂, 0.4 mg/mL PVP, 0.02% BSA, 1 mmol/L DTT, 0.4 mmol/L d-虫荧光素, 1.46 μ g/mL 荧光素酶。

1.5 融合蛋白 PPK-ADK 用于检测大肠杆菌菌落数

将培养 24 h 的大肠杆菌标准株用灭菌 0.9% 的生理盐水梯度稀释, 取 50 μ L 稀释菌液加入 50 μ L 细胞裂解液, 100 °C 加热 2 min 让细胞内 ATP 充分释放, 取 2 μ L 处理的样品加入到 48 μ L ATP 扩增体系中反应, 每隔 10 min 测定荧光信号, 与不经过扩增反应所产生的荧光信号做对比。样品中的菌落数通过平板计数法获得。

2 结果

2.1 融合蛋白 PPK-ADK 的制备

SDS-PAGE 分析诱导表达 0、1、3、5 h 的菌体总蛋白及表达 5 h 的上清, 从图 2 中可以看出, 重组菌表达了分子量约为 101 kDa 的融合蛋白 PPK-ADK, 且部分是以可溶形式表达的。将细胞破碎液上清采用镍亲和层析纯化, 首先用 60 mmol/L 咪唑的洗脱

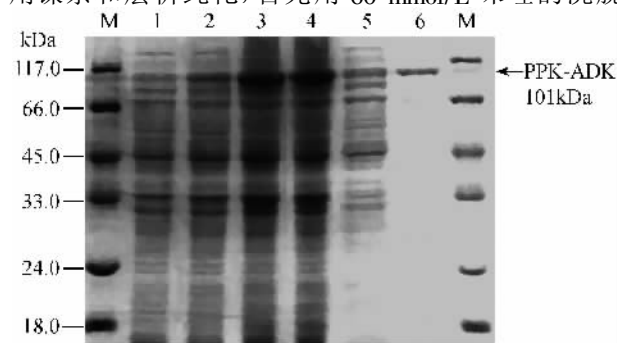


图2 融合蛋白 PPKADK 的表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the PPK-ADK expression and purification M: Protein marker; Lane 1: Total protein of *E. coli* BL (DE3) transformed with pET28a (+)-PPKADK without IPTG induction; Lane 2 ~ 4: Total protein of *E. coli* BL (DE3) transformed with pET28a (+)-PPKADK after being induced with IPTG of 1 h, 3 h, and 5 h, respectively; Lane 5: Supernatant of the lysate of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET28a (+)-PPKADK; Lane 6: Purified recombinant PPK-ADK.

缓冲液洗脱杂蛋白, 再用 300 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白, 洗脱液用超滤膜进行超滤除盐, SDS-PAGE 分析纯化的融合蛋白, 结果显示, 纯化得到的融合蛋白基本达到电泳纯。

2.2 融合蛋白内源性 ADP 的去除

由于内源性 ADP 与 PPK 紧密结合在一起, 在处理 PPK-ADK 时必须加入 polyP, 使内源性的 ADP 转化为 ATP 后从蛋白上释放出来, 释放出来的 ATP 被 Beads-apyrase 所降解, 转化为 AMP, 从而降低背景干扰。从图 3 可以看出, 没有经过 Beads-apyrase 处理的 PPK-ADK, 在不加入外源 ATP 的情况下, 由于 PPK 含有内源性的 ADP 污染, 在 polyP 存在条件下, 内源性的 ADP 被转化成为 ATP, 进而能够发生 ATP 扩增反应, 产生较强的背景信号 (图中的一○—所示)。但经过 Beads-apyrase 处理的 PPK-ADK, 由于内源性的 ADP 已经被降解, 在不加入外源 ATP 的情况下, 就不会产生渐渐增强的背景信号 (图中的一●—所示), 从而使测定微量外源 ATP 成为可能。

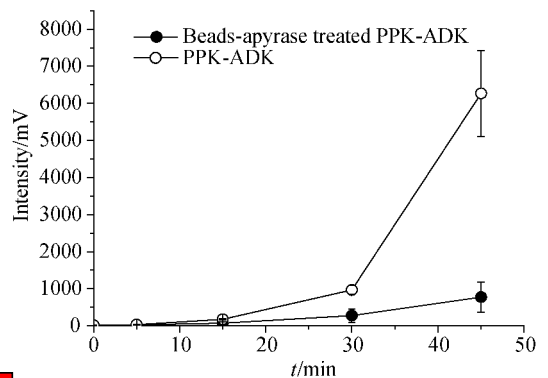


图3 融合蛋白内源性 ADP 的去除

Fig.3 Removal of endogenous ADP from PPK-ADK by Beads-apyrase treatment. Before and after Beads-apyrase treatment, 0.3 μ g of PPK-ADK was added to a reaction mixture containing 10 μ mol/L AMP, 400 μ mol/L PolyP, 8 mmol/L MgCl₂, 60mmol/L Tris-HCl (pH 7.4). 1 μ L of the reaction mixture was sampled and detected by BPCL luminometer.

2.3 微量外源性 ATP 的扩增反应

为了验证本文表达的并经 Beads-apyrase 处理的 PPK-ADK 对微量外源性 ATP 扩增反应的效果, 在 PPK-ADK 扩增反应体系中分别加入不同量的 ATP, 在反应前及反应进行到不同时间点取出 1 μ L 反应液, 加入到荧光素酶生物发光反应体系中测定发光强度, 结果如图 4 所示。不同量的外源 ATP 均能够得到不同程度的扩增, 在反应的初始阶段, 由于 ATP 的量低于生物发光法的检测限, 测不到 ATP 的荧光信号, 随着 ATP 放大反应的进行, ATP 不断被扩增, 使得荧光信号逐渐增强, 表明经 Beads-apyrase 处理

的 PPK-ADK 催化的 ATP 扩增反应,可以有效地对不同起始浓度的微量外源性 ATP 进行扩增。

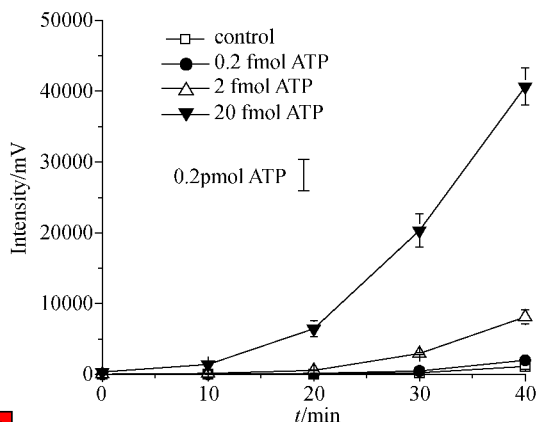


图4 微量外源性 ATP 的扩增反应时间曲线

Fig.4 Bioluminescence time courses of ATP amplification at different amounts of exogenous ATP. The reaction mixture containing $10 \mu\text{mol/L}$ AMP, $400 \mu\text{mol/L}$ PolyP, 8 mmol/L MgCl_2 , 60 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) and $0.3 \mu\text{g}$ Beads-apyrase treated PPK-ADK. The amount of ATP was initially present in the $1 \mu\text{L}$ reaction mixture indicated.

2.4 融合蛋白 PPK-ADK 用于检测大肠杆菌菌落数

传统微生物限度检测需要通过平板计数法,该方法需要过夜培养,耗时太多。生物发光法检测微生物具有快速、方便、灵敏的优点。但是一般的生物发光法难以检测低于 10^{-14} mol 的 ATP,这种灵敏度有时达不到卫生学要求。利用 ATP 扩增反应,能够测定一般的生物发光法难以检测到的 ATP,使得基于生物发光的微生物限度检测法的灵敏度也能得到很大提高。在本实验中,大肠杆菌破菌释放出的 ATP 经过扩增反应后,能够利用生物发光法检测到

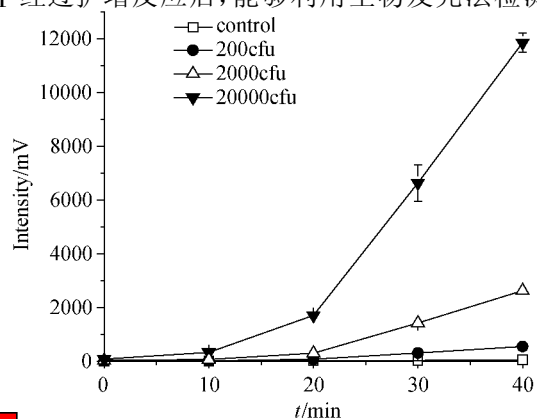


图5 大肠杆菌 ATP 的扩增反应

Fig.5 Bioluminescence Time Courses during ATP Amplification of *E. coli* cells. *E. coli* cells were appropriately diluted. The cell suspensions ($50 \mu\text{L}$) were mixed with $50 \mu\text{L}$ lysis buffer and then incubated at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 2 min. Heated samples ($2 \mu\text{L}$) were subjected to ATP Amplification. The number of *E. coli* CFU that were present in the $1 \mu\text{L}$ reaction mixture indicated.

很高的信号,如图 5 所示。与不经过扩增反应相比较而言,生物发光法测定菌落数产生的 ATP 信号至少提高了 100 倍,即更少的菌落数可以通过扩增反应后被检测到,结果如表 2 所示。

表 2 生物发光法检测大肠杆菌菌落数经过 ATP 扩增反应与不经过扩增反应的比较

Table 2 Detection of *E. coli* cells by Bioluminescence Assay with and without ATP Amplification

<i>E. coli</i> cells(CFU)	Luminescence/(Intensity/mV)	
	Without ATP amplification	With ATP amplification
Control(none)	3 ± 2	48 ± 16
200	5 ± 4	550 ± 21
2000	26 ± 9	2627 ± 59
20000	82 ± 11	11864 ± 356

The *E. coli* culture was appropriately diluted with sterile 0.9% isotonic Na chloride and heated to $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 2 min to release ATP from the cells. ATP amplification was performed for 40 min to the bioluminescence assay. The luminescence values are the means \pm standard deviations of separate measurements.

2.5 数据分析

本文在测定外源 ATP 时发现低于 20 fmol 的 ATP 用传统的生物发光法不能检测(如图 4 中 0 时刻所示),而经过 ATP 放大反应后, 0.2 fmol 的 ATP 也能得到检测。实验测定 0.2 pmol ATP 所产生的荧光信号的高度约 3000,将放大后各点的荧光信号换算出各点所对应的 ATP 的量,可以计算出 ATP 的放大倍数至少约 100 倍。在进行微生物菌落测定时,仅通过 40 分钟的放大,就能使原本利用普通生物发光法无法测定的细菌得以测定。

3 讨论

本研究成功构建了原核表达载体 pET28a (+)-PPKADK,将该载体转化菌株 BL21(DE3)中,在 IPTG 的诱导下高效表达了融合蛋白 PPK-ADK。重组蛋白带有 His-Tag,经镍亲和和层析和超滤离心后,蛋白纯度可达电泳纯级别。在经过 Beads-apyrase 处理后,消除了内源性 ADP 对 ATP 扩增产生的背景干扰,这种处理方法方便、有效并且成本低,对外源微量 ATP 的放大试验结果表明,原本利用生物发光法无法测定的微量 ATP 通过放大反应可以实现测定,这极大地提高了生物发光法测定 ATP 的灵敏度,从而拓宽了生物发光法在微生物检测中的应用范围。应用该放大系统检测大肠杆菌菌落数的实验结果表明,采用 ATP 扩增法可以检测到传统生物发光法所检测不到的菌落数,这对提高环境、食品卫生微生物检测的灵敏度和准确度有重要意义,能有效防止假阴性结果的出现,也为单细胞甚至单分子的检测奠定了基础。

参考文献

- [1] DeLuca M, McElroy WD. Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions. *Biochemistry*, 1974, 13(5): 921 – 925.
- [2] Bautista DA, Vaillancourt JP, Clarke RA, et al. Adenosine triphosphate bioluminescence as a method to determine microbial levels in scald and chill tanks at a poultry abattoir. *Poultry Science*, 1994, 73(11): 1673 – 1678.
- [3] Brune M, Schumann R, Wittinghofer F. Cloning and sequencing of the adenylate kinase gene (adk) of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13(19): 7139 – 7151.
- [4] Akiyama M, Crooke E, Kornberg A. The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the ppk gene and membrane location of the protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(31): 22556 – 22561.
- [5] Kumble KD, Ahn K, Kornberg A. Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(25): 14391 – 14395.
- [6] Ahn K, Kornberg A. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(20): 11734 – 11739.
- [7] Satoh T, Kato J, Takiguchi N, et al. ATP amplification for ultrasensitive bioluminescence assay: detection of a single bacterial cell. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(6): 1216 – 1220.
- [8] Kuroda A, Nomura K, Ohtomo R, et al. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science*, 2001, 293(5530): 705 – 708.
- [9] Ishige K, Noguchi T. Inorganic polyphosphate kinase and adenylate kinase participate in the polyphosphate: AMP phosphotransferase activity of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26): 14168 – 14171.

Detection of low-level microorganism by concomitant use of ATP amplification and bioluminescence assay

Ying Chen¹, Bingjie Zou^{1, 2}, Shuhui Zhu¹, Yinjiao Ma¹, Guohua Zhou^{1,2,3*}

(¹School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

(²Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanjing 210002, China)

(³Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: [**Objective**] To detect low levels of microorganism by bioluminescence assay, the reaction of ATP amplification catalyzed by ADK (adenylate kinase) combined with PPK (polyphosphate kinase) can be employed. However, the endogenous ADP bound to PPK is a background source and interfere the effective detection of low levels of exogenous ATP. We expressed a fusion protein of PPK and ADK and established a new method to decrease the background signal. [**Methods**] The genes of PPK and ADK were amplified by PCR and cloned into vector pET28a (+) to provide a recombinant expression plasmid pET28a (+)-PPKADK to prepare the fusion protein. Apyrase was immobilized on the surface of magnetic beads coated with polyurethane to provide Beads-apyrase to eliminate background caused by ADP bound to PPK-ADK. The exogenous ATP and microorganism were also detected by using ATP amplification reaction coupled with bioluminescence assay. [**Results**] The purified fusion protein showed both ADK and PPK activities. Beads-apyrase could eliminate ADP contamination conveniently and effectively, thus less than 1 fmol of ATP was detected by ATP amplification reaction coupled with bioluminescence assay. Using ATP amplification reaction, the sensitivity of bioluminescence assay was 100-fold than that of normal bioluminescence assay without ATP amplification. [**Conclusions**] Beads-apyrase is an effective tool to eliminate the background of the reaction of ATP amplification. The sensitivity of bioluminescence assay was increased significantly with concomitant use of ATP amplification and bioluminescence assay.

Keywords: ATP amplification; adenylate kinase (ADK); polyphosphate kinase (PPK); bioluminescence assay

(本文责编 :王晋芳)