

## 细菌荧光素酶体外发光体系的建立及应用于 NADH 定量检测

梅册霞, 王静雪\*, 林洪, 王晶

(中国海洋大学食品科学与工程学院食品安全性实验室, 青岛 266003)

**摘要** 【目的】本研究旨在建立鳕发光杆菌(*Photobacterium leiognathi*) YL 荧光素酶:FMN-NADH 氧化还原酶体外发光双酶体系,并对荧光素酶:FMN-NADH 氧化还原酶体外发光双酶体系应用于 NADH 的定量检测进行初步探索。【方法】利用从鳕发光杆菌提取并经部分纯化的荧光素酶和 FMN-NADH 氧化还原酶,通过优化体系中各底物的添加量,实现荧光素酶的体外发光。【结果】荧光素酶:FMN-NADH 氧化还原酶体外发光双酶体系为:1 mL 酶液中添加 100  $\mu$ L 十二烷醛(27 mmol/L)、0.5  $\mu$ L FMN-Na(10 mmol/L)、300  $\mu$ L NADH(0.14 mmol/L)。NADH 与荧光素酶:FMN-NADH 氧化还原酶体系的发光强度呈良好的线性关系,其线性范围为  $1.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-8}$  mol/L。【结论】荧光素酶:FMN-NADH 氧化还原酶体外发光双酶体系可以简便、灵敏、快速的定量检测 NADH,为其进一步应用于环境检测、食品卫生与安全等领域活细菌数量的检测奠定了基础。

**关键词**: 鳕发光杆菌; 荧光素酶; FMN-NADH 氧化还原酶; NADH; 检测

**中图分类号**: Q93-3    **文献标识码**: A    **文章编号**: 0001-6209(2009)09-1223-06

还原型辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)广泛存在于一切动物、植物和微生物的活细胞中,是细胞能量代谢所必需的辅酶,可以作为具有代谢活性的细胞指示物<sup>[1]</sup>。在特定代谢时期的微生物细胞中 NADH 含量相对稳定,其含量与食品中微生物的数量存在正相关性,且不同活细菌胞内 NADH 含量基本一致,而细菌死亡后,在胞内酶作用下, NADH 将很快被分解。所以通过测定样品中的 NADH 含量,即可推算出活菌数,能够比较准确的反映食品微生物的污染程度。目前测定 NADH 的方法有分光光度法<sup>[2]</sup>,荧光分析法<sup>[3]</sup>及电化学分析法<sup>[4]</sup>等,但这些方法的灵敏度低,有的操作甚至比较繁琐。建立准确、灵敏、快速的 NADH 测定方法在细菌活细胞的检测及生物生理等方面具有重要意义。

生物发光(Bioluminescence)是自然界广泛存在

的、有生命的生物产生的一种发光现象。发光的生物种类很多,包括发光细菌、发光萤火虫、发光海星等。发光细菌是一类在正常的生理条件下能够发射蓝绿色可见光( $\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$ )的细菌。近年来,发光细菌以其独特的生理特性、与现代光电检测手段完美匹配等特点在环境污染物、生物毒性检测等方面的应用越来越广泛<sup>[5]</sup>。

荧光素酶是生物体内催化荧光素或脂肪醛氧化发光的一类酶的总称,是海洋发光细菌发光体系中最重要的一类酶。Miguel 等<sup>[6]</sup>从费氏发光细菌(*Photobacterium fischeri*)体内分离纯化得到荧光素酶,该酶的分离纯化目前国内尚未见报道。Hasting 等<sup>[7-9]</sup>提出发光细菌活细胞内的发光原理:胞内 FMN-NADH 氧化还原酶在还原型辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)存在的条件下,将氧化型黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)还原为还

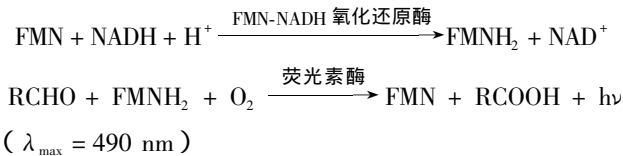
基金项目:国家自然科学基金(30500384);国家“863”计划(2006AA09Z431)

\* 通信作者。Tel: +86-532-82032389; E-mail: snow@ouc.edu.cn

作者简介:梅册霞(1984-)女,山东淄博人,硕士研究生,研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: mex\_106@163.com

收稿日期:2009-04-10;修回日期:2009-06-15

原型黄素单核苷酸(FMNH<sub>2</sub>) ;荧光素酶在分子氧作用下,分别催化 FMNH<sub>2</sub> 和长链脂肪醛(RCHO)的氧化反应而产生 FMN 和长链脂肪酸(RCOOH),同时释放出蓝绿色光( $\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$ )。其反应机理<sup>[10,11]</sup>如下所示:



根据反应机理可以得知,实现荧光素酶体外发光具有两种途径:一是荧光素酶在分子氧作用下,分别催化氧化 FMNH<sub>2</sub> 和 RCHO 产生 FMN 和 RCOOH,同时释放出蓝绿色光( $\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$ ),以下称为单酶体系。由于 FMNH<sub>2</sub> 在环境中极不稳定,在有氧存在时即被氧化为 FMN,所以单酶体系中需要添加还原剂 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 和 FMN-Na,Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 将 FMN-Na 还原为 FMNH<sub>2</sub> 而为反应提供重要底物;二是利用荧光素酶和 FMN-NADH 氧化还原酶的协同作用,即在 NADH 存在的条件下,FMN-NADH 氧化还原酶首先还原 FMN 为 FMNH<sub>2</sub>,为荧光素酶的进一步催化反应并释放蓝绿色光( $\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$ )提供重要底物,以下称为双酶体系。

NADH 是双酶体外发光体系的必需底物,在双酶及其他底物过量的情况下,NADH 的浓度与双酶体系的发光强度呈相关关系<sup>[12]</sup>,据此可建立一种新的测定 NADH 的方法。应用双酶体系检测 NADH 具有灵敏度高、干扰少、检测限低等优点<sup>[13]</sup>。利用双酶体外发光体系定量检测 NADH 在国内尚属首次。

本研究利用从鳕发光杆菌(*Photobacterium leiognathi*) YL 体内提取的荧光素酶和 FMN-NADH 氧化还原酶建立单酶和双酶体外发光体系,并对双酶体系应用于 NADH 的定量检测进行初步探索,建立了一种快速、便捷、准确测定 NADH 的方法,为双酶体系应用于食品、环境等领域活细菌数量的定量检测奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种**:中国海洋大学水生生物制品安全性重点实验室自行分离鉴定的鳕发光杆菌(*Photobacterium leiognathi*) YL 菌株。该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心(简称 CCTCC),保藏号为 M 206139。该菌株的 16S rDNA 基因序列已经提交

GenBank 核酸序列数据库,存取号为 EF017227。

**1.1.2 培养基**:2216E 液体培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司)。

**1.1.3 主要试剂和仪器**:FMN-Na,十二烷醛,连二亚硫酸钠(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>),NADH,乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA),二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)均购自美国 Sigma 公司。试验中各试剂均用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)配制。

BPCL 微弱发光仪(中科院生物物理研究所),HY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所)。

### 1.2 发光强度的测定

于 BPCL 微弱发光仪下进行发光强度的测定。

**1.2.1 酶液制备**:鳕发光杆菌 YL 300 mL,150 r/min、25℃ 恒温培养至发光值 320 万以上,离心收集菌体,菌体沉淀用 0.01 mol/L PBS(pH 7.0,内含 10 mmol/L EDTA,1 mmol/L DTT,下同)复溶,冰浴超声粉碎细胞至发光值在 10 万以下;4℃ 冷冻离心(14000 × g,30 min),上清液用 40% ~ 80% 的固体硫酸铵盐析,离心,沉淀用 20 mL PBS(即湿重为 1 g 的菌体制备约 4 mL 粗酶液)复溶,4℃ 于 PBS 中透析 24 h,即得实验用粗酶液。紫外分光光度计测得平均蛋白含量为 2.4 mg/mL。朱兰兰<sup>[14]</sup>对该粗酶进一步分离纯化,SDS-PAGE 凝胶电泳测得 FMN-NADH 氧化还原酶的分子量为 28 kDa,荧光素酶的两个亚基分子量分别为 41 kDa 和 36 kDa。

**1.2.2 单酶体外发光体系的测定**:1 mL 酶液中,快速加入底物 FMN-Na(10 mmol/L)0.5 μL,连二亚硫酸钠(34 mmol/L)75 μL,十二烷醛(27 mmol/L)500 μL,进行发光强度测定。

发光检测在微弱发光仪中进行,检测条件是:室温,加入各底物后,立刻进行定时跟踪测定,连续测定间隔时间为 1 s。

在上述条件下,反应开始 10 s 内,单酶体系平均每秒发光强度上升 1000 为一个酶活单位 U,单位为 U/mL。

**1.2.3 双酶体外发光体系的优化**:通过优化体系中十二烷醛,FMN-Na,NADH 三种底物的最适添加量,建立双酶体外发光体系。1 mL 酶液中,快速加入一定体积的底物十二烷醛(27 mmol/L),FMN-Na(10 mmol/L),NADH(0.14 mmol/L),进行发光强度测定,检测条件同单酶体系。

1 mL 酶液中,快速加入底物 100 μL 十二烷醛

(27 mmol/L) 0.5  $\mu\text{L}$  FMN-Na (10 mmol/L) 300  $\mu\text{L}$  NADH(0.14 mmol/L), 进行发光强度测定。反应开始 10 s 内, 双酶体系平均每秒发光强度上升 1000 为一个酶活单位 U, 单位为 U/mL。

**1.2.4 双酶体系应用于 NADH 的测定:** 一系列不同浓度的 NADH 标准液作为试样, 分别添加到双酶体系中, 进行发光强度的测定。双酶体系中加入 300  $\mu\text{L}$  PBS 作为空白对照。每个试样做 3 个平行, 取平均值。

NADH 标准液  $1.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-8}$  mol/L 浓度范围内, 进一步考察 NADH 浓度与双酶体系发光强度之间的相关性, 并绘制 NADH 浓度与双酶体系发光强度的标准曲线。

## 2 结果和分析

### 2.1 单酶体外发光体系发光趋势

对未添加任何底物的酶液、单酶体系各底物混合液分别进行发光强度的测定, 结果表明, 酶液、单酶体系各底物混合液的发光值仅为 200 左右, 相对非常低, 即酶液、单酶体系各底物混合液本身不发光。

单酶体外发光趋势如图 1 所示。在加入各底物后, 单酶体系的发光强度瞬间达到约 340 万, 平均酶活达到 310.8 U/mL, 比酶活为 129.5 U/mg。但随着反应时间的延长, 单酶体系的发光强度不断降低, 这可能是由于连二亚硫酸钠将 FMN-Na 瞬间还原产生 FMNH<sub>2</sub>, 而 FMNH<sub>2</sub> 在环境中极不稳定, 在有氧存在时又被氧化为 FMN, 致使单酶体系中底物 FMNH<sub>2</sub> 缺乏, 故发光强度不断下降。

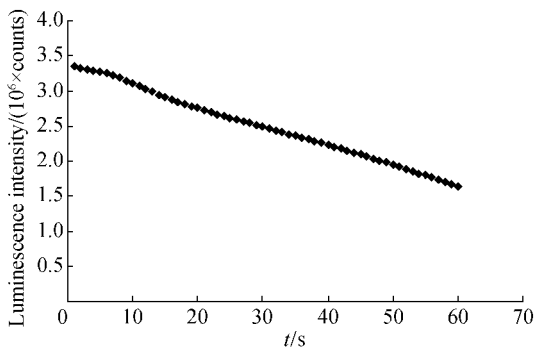


Fig. 1 单酶体系发光趋势图

The luminescence intensity trend of the the luciferase system *in vitro*.

单酶体系发光强度高, 但是发光不够持续稳定, 不适合检测方面的应用, 建立一个稳定的、可广泛应用于食品安全等领域的荧光素酶体外发光体系具有

重要意义。

### 2.2 双酶体外发光体系的优化

**2.2.1 NADH(0.14 mmol/L)添加量对双酶体系发光强度的影响:** NADH 是双酶体系的重要底物, FMN-NADH 氧化还原酶只有在 NADH 存在的情况下才能将 FMN-Na 盐还原为 FMNH<sub>2</sub>。双酶体系中分别添加 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{L}$  0.14 mmol/L 的 NADH, 测定双酶体系的发光强度。

由图 2 可以得出, 双酶体系中不添加 NADH 时, 由于体系缺乏关键底物, 发光强度极低。NADH 的添加量为 50  $\mu\text{L}$  时, 其发光强度迅速升至 250 万以上。NADH 的添加量由 50  $\mu\text{L}$  增加至 300  $\mu\text{L}$  时, 双酶体系的发光强度升至 300 万以上, 且随着 NADH 添加量的增加, 双酶体系的发光强度愈趋于稳定。NADH 的添加量继续增大, 双酶体系的发光强度变化不大。故选择双酶体系中 NADH(0.14 mmol/L) 的添加量为 300  $\mu\text{L}$ 。

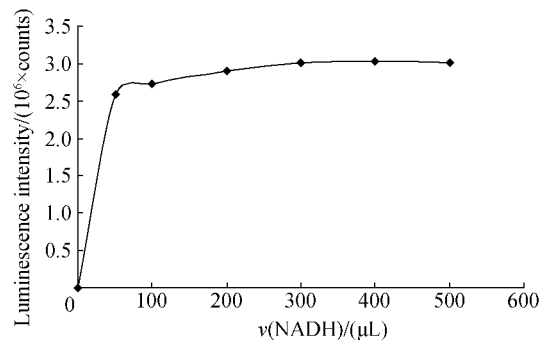


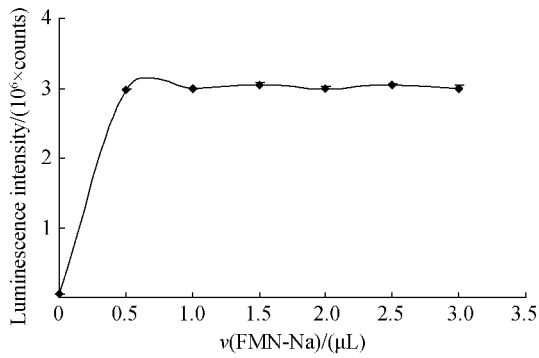
Fig. 2 NADH(0.14 mmol/L)添加量对双酶体系发光强度的影响

Effects of different volumes of 0.14 mmol/L NADH on the luminescence intensity of the coupled enzymes system *in vitro*.

**2.2.2 FMN-Na(10 mmol/L)添加量对双酶发光体系的影响:** 在确定双酶体系中 0.14 mmol/L 的 NADH 的添加量为 300  $\mu\text{L}$  的基础上, 双酶体系中分别添加 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0  $\mu\text{L}$  10 mmol/L 的 FMN-Na, 测定双酶体系的发光强度。

由图 3 可得出, 双酶体系中若不添加 FMN-Na, 双酶体系的发光强度极低。当 FMN-Na 的添加量为 0.5  $\mu\text{L}$  时, 双酶体系的发光强度即达到 300 万以上, 痕量的 FMN-Na 即可显著提高双酶体系的发光强度, 这与 Edward<sup>[13]</sup> 等人的报道结果一致。继续增加 FMN-Na 的添加量, 双酶体系的发光强度不再增加。故选择双酶体系中 FMN-Na(10 mmol/L) 的添加量为 0.5  $\mu\text{L}$ 。

**2.2.3 十二烷醛(27 mmol/L)添加量对双酶发光体系**

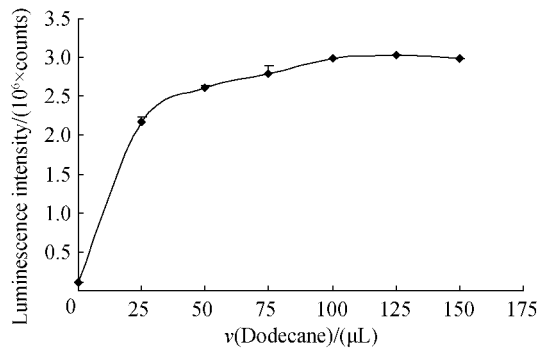


3 FMN-Na (10 mmol/L)添加量对双酶体系发光强度的影响

Fig.3 Effects of different volumes of 10 mmol/L FMN-Na on the luminescence intensity of the coupled enzymes system *in vitro*.

的影响:在确定 NADH 和 FMN-Na 适宜添加量的基础上,双酶体系中分别添加 25,50,75,100,125,150  $\mu\text{L}$  27 mmol/L 的十二烷醛,测定双酶体系的发光强度。

由图 4 可以得出,在不添加十二烷醛时,双酶体系的发光强度非常低,这是由于粗酶液中残留菌体细胞破碎时的酶活底物,双酶体系有微弱的发光反应。十二烷醛的添加量由 25  $\mu\text{L}$  增加到 100  $\mu\text{L}$ ,双酶的发光强度从 210 多万升至 300 万以上,且发光持续稳定。继续增加十二烷醛添加量,双酶体系的发光强度变化不大。故选择双酶体系中十二烷醛 (27 mmol/L) 的添加量为 100  $\mu\text{L}$ 。



4 十二烷醛(27 mmol/L)添加量对双酶体系发光强度的影响

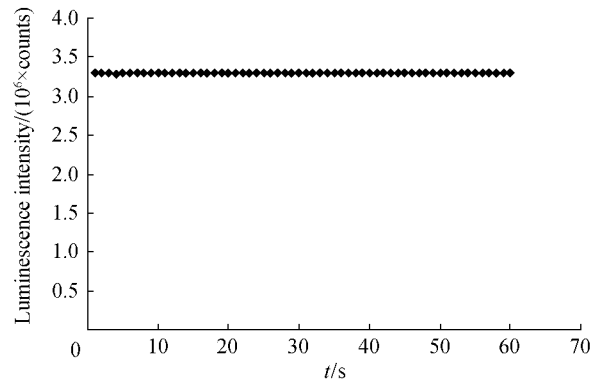
Fig.4 Effects of different volumes of 27 mmol/L Dodecane on the luminescence intensity of the coupled enzymes system *in vitro*.

### 2.3 单、双酶体外发光体系的比较

对双酶体系各底物混合液进行发光强度的测定,结果表明,双酶体系各底物混合液的发光值仅为 200 左右,相对非常低,即双酶体系各底物混合液本身亦不发光。

双酶体外发光趋势如图 5 所示。加入各底物后,双酶体系的发光强度迅速升至约 320 万,平均酶

活为 329.6 U/mL,比酶活为 137.3 U/mg。与单酶体外发光趋势(图 1)相比较,双酶体系的发光强度与单酶体系的峰值发光强度接近,但双酶体系发光强度相对持续、稳定。这可能归因于 FMN-NADH 氧化还原酶与荧光素酶的协同作用,FMN-NADH 氧化还原酶将 FMN-Na 还原产生 FMNH<sub>2</sub> 的过程是连续的,双酶体系中底物 FMNH<sub>2</sub> 不断得到补充,故其发光强度得以持续稳定。双酶体系稳定的发光可持续 2 min 左右,待各底物消耗不足时,其发光强度会缓慢下降。



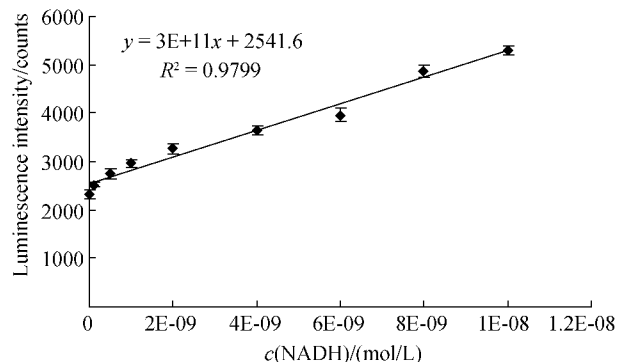
5 双酶体系发光趋势图

Fig.5 The luminescence intensity trend of the coupled enzymes system *in vitro*.

总之,双酶体系较单酶体系发光持续、稳定,更适于食品、环境等领域中污染物与致病菌的检测。

### 2.4 双酶体系应用于 NADH 的测定

双酶体系对 NADH 非常敏感。添加  $1.0 \times 10^{-10}$  mol/L 的 NADH 标准试样即可显著提高双酶体系的发光强度。但由于体系中 NADH 的浓度非常低及 FMN-NADH 氧化还原酶催化反应的消耗,体系的发光强度在达到一峰值发光强度后又缓慢下降。在应用双酶体系检测 NADH 时,记录双酶体系的初始发光强度,即峰值发光强度。



6 双酶体系检测 NADH 的标准曲线

Fig.6 Standard curve of NADH-determination by the coupled enzymes system *in vitro*.

在  $1.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-8}$  mol/L 浓度范围内, 绘制 NADH 浓度与双酶体系发光强度的线性曲线, 结果如图 8 所示。双酶体系的发光强度随 NADH 浓度的增加而增加, 且有明显梯度, 两者的线性相关系数达到 0.9799, 线性方程为  $y = 3.0 \times 10^{11} x + 2541.6$  ( $x$ : NADH 的浓度 / mol·L<sup>-1</sup>,  $y$ : 双酶体系的发光强度 / Counts)。此外, 研究中还发现, 按照湿重为 1 g 的菌体制备 1 mL 粗酶液, 即将体系中酶的浓度提高 4 倍, 可以检测  $1.0 \times 10^{-12}$  mol/L 浓度的 NADH (样品平均发光强度为 4128, 空白对照平均发光强度为 3687)。该结果表明提高体系中双酶的浓度可以降低方法的检出限。

### 3 讨论

首先是酶稳定性的控制。Thomas 等人<sup>[15]</sup> 研究发现 pH 7.0 的 PBS 可以有效保持荧光素酶和 FMN-NADH 氧化还原酶的稳定性。因此本试验中酶液用 0.01 mol/L, pH 7.0 的 PBS 复溶, 各底物均用 0.01 mol/L, pH 7.0 的 PBS 配制, 以保证酶活反应体系的 pH 值控制在 7.0。同时, 荧光素酶和 FMN-NADH 氧化还原酶的提取均是在 4℃ 低温条件下进行, 以保证较高的酶活。其次是双酶体系各底物的选择。在单酶体系的基础上, 确定双酶体系的各反应底物。双酶体系中因存在 FMN-NADH 氧化还原酶, 所以不需要添加还原剂连二亚硫酸钠。根据双酶体系反应机理, 只需再添加 NADH。试验结果证明 FMN-Na、十二烷醛及 NADH 在适宜添加配比时可以很好的实现双酶体外持续稳定的发光。

本研究应用双酶体系定量检测 NADH, NADH 浓度在  $1.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-8}$  mol/L 范围内与双酶体系的发光强度呈良好的线性关系, 通过提高体系中双酶的浓度, 可以将 NADH 的检出限降至  $1.0 \times 10^{-12}$  mol/L, 即增加酶的浓度可以提高双酶体系的灵敏度, 这与 Lovgren<sup>[16]</sup> 等人研究结果一致。利用双酶体外发光法定量检测 NADH 具有检测耗时短、易于操作、灵敏度高、成本低等优点, 为双酶体系进一步应用于活细菌数量的检测奠定了基础。

三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)是广泛存在于生物体内的一种能量物质, 是萤火虫荧光素酶催化生物发光的必需底物。在 FL 催化的发光反应中, ATP 在一定的浓度范围内与发光强度呈线性关系<sup>[17]</sup>, 据此建立的 ATP 生物发光法以操作简便、快速、灵敏度高、成本低等优点在微生物检验和食品生产环境清洁度等方面得到广泛应用<sup>[18]</sup>。NADH 与

ATP 具有相似的生物发光反应机理。今后, 荧光素酶、FMN-NADH 氧化还原酶的分离纯化及共固定化, 提高双酶体系检测的灵敏度, 双酶体系应用于定量检测活细菌数量等技术将成为研究的重点内容。总之, 随着研究的不断深入, 双酶体外发光法会变得更加成熟, 在环境检测、食品卫生与安全等领域必然会有广阔的应用前景。

### 参考文献

- [1] Olek RA, Autosiewicz J, Caulini GC, et al. Effect of NADH on the redox state of human hemoglobin. *Clinica Chimica Acta*, 2002, 324: 129-134.
- [2] Ghous T, Tiwshend A. Flow injection method for the determination of thyroxine by inhibition of glutamate dehydrogenase. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 411: 45-49.
- [3] 郑琦, 刘志洪, 蔡汝秀. 肌红蛋白作催化剂荧光分析法高灵敏检测 NADH. 武汉大学学报(Engineering Journal of Wuhan University), 2004, 50(2): 137-140.
- [4] Alvarez MI, Saidman SB, Lobo-castanon MJ, et al. Electrocatalytic detection of NADH and glycerol by NAD<sup>+</sup>-modified carbon electrodes. *Analytical Chemistry*, 2000, 72: 520-527.
- [5] 施玮, 牛军峰, 余刚. 水中五氯酚钠对发光细菌毒性测定的影响因素. 环境科学(Environmental Sciences), 2004, 25(3): 44-47.
- [6] Miguel AG, Meighen EA, Nicoli MZ, et al. Purification and properties of bacterial luciferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 1972, 247(2): 398-404.
- [7] Hastings JW, Neelson KH. Bacterial bioluminescence: Its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*, 1979, 43: 496-518.
- [8] Hajime K, Taku K. In vitro bacterial bioluminescence coupled with a mediated electrochemical process of flavin on a viologen polymer electrode. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1998, 46: 227-235.
- [9] Inouye S. NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio jischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. *FEBS Letters*, 1994, 347: 163-168.
- [10] Vetrova EV, Kudryasheva NS, Kratasyuk VA. Redox compounds influence on the NAD(P)H: FMN-oxidoreductase-luciferase bioluminescent system. *Photochem Photobiol Sci*, 2007, 6: 35-40.
- [11] John L, Charles LM. Bacterial bioluminescence: absorption and fluorescence characteristics and composition of reaction products of reduced flavin mononucleotide with luciferase and oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1973, 53(1): 157-163.

- [ 12 ] Edward J , Marlene D. Immobilization of bacterial luciferase and FMN reductase on glass rods. *Biochemistry* , 1976 , 73 ( 11 ) : 3848 – 3851 .
- [ 13 ] Roda A , Guardigli M , Michelini E , et al. Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging. *Trends in Analytical Chemistry* , 2009 , 28( 3 ) : 307 – 322 .
- [ 14 ] 朱兰兰. 海洋细菌 *P. leiognathi* 的发光性能研究及其在食品安全检测中的应用探索. 中国海洋大学学位论文( *Dissertation of Ocean University of China* ) , 2008 .
- [ 15 ] Thomas FH , Thomas OB. The effect of phosphate on the structure and stability of the luciferase from *beneckeae* , *harvyi* , *photobacterium* , *fischeri* , and *photobacterium phosphoreum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 1980 , 94( 4 ) : 1199 – 1206 .
- [ 16 ] Lovgren T , Lavi J. Bioluminescence method for determining NADH or NADPH. US patent : 4501813 , 1985 – 02 – 26 .
- [ 17 ] 岳伟伟 , 周爱玉 , 何保山 , 等. 基于生物发光技术的细菌总数快速检测仪. *微纳电子技术 ( Micronanoelectronic Technology )* , 2007 , 7 : 387 – 390 .
- [ 18 ] 唐浅浅 , 叶尊忠 , 王剑平. ATP 生物发光法在微生物检验中的应用. *食品科学 ( Food Science )* , 2008 , 29 ( 6 ) : 460 – 465 .

## Quantitative detection of NADH by *in vitro* bacterial luciferase bioluminescent

Cexia Mei , Jingxue Wang\* , Hong Lin , Jing Wang

( Food safety Laboratory , Food Science and Engineering Department , Ocean University of China , Qingdao 266003 )

**Abstract** [ Objective ] The study aimed at establishing the bacterial luciferase : FMN-NADH oxidoreductase bioluminescent system *in vitro* and evaluating its potential for quantitative detection of NADH. [ Methods ] By optimizing the amount of substrates , we set up the coupled luciferase : FMN-NADH oxidoreductase bioluminescent system *in vitro* , based on the crude extract from *Photobacterium leiognathi* YL. [ Results ] The *in vitro* coupled bacterial luciferase : FMN-NADH oxidoreductase bioluminescent system was : 1 mL crude extract , 27 mmol/L Dodecane 100  $\mu\text{L}$  , 10 mmol/L FMN-Na 0.5  $\mu\text{L}$  and 0.14 mmol/L NADH 300  $\mu\text{L}$ . Furthermore , we developed a method for quantitative detection of NADH according to the bioluminescence of NADH catalyzed of bacterial luciferase : FMN-NADH oxidoreductase system *in vitro*. A good linear relationship of NADH concentration was in a range of  $1.0 \times 10^{-10}$  to  $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L. [ Conclusion ] The bacterial luciferase : FMN-NADH oxidoreductase system used to measure NADH concentration was a good attempt to detect living bacterial cells in the fields of environment , food sanitation and other related.

**Keywords** : *Photobacterium leiognathi* ; Bacterial luciferase ; FMN-NADH oxidoreductase ; NADH ; Detection

( 本文责编 : 张晓丽 )