

Bioluminex™: 一种简便高效的检测混合物中三聚氰胺等活性成分的生物筛选技术



▲ 产品研发团队(由左至右): Larissa Ikenouye, Sarah Hickey, Dr. Sheryl Verbitski, Gerald Gourdin

位于美国科罗拉多州Boulder市的ChromaDex公司(www.chromadex.com)产品研发部经理Verbitski博士和她的研发团队,借助色谱分离技术对食品添加剂、天然提取物、药物、食物和饮料进行生物活性研究。该团队主要的任务就是提高Bioluminex-生物自发光显影-这种最近才推向国际市场的新分析技术的实用水平。

简介

ChromaDex开发出了一种快速筛选试剂盒,用来鉴别复杂组分体系中每个成分的生物活性。并且该技术还可以作为以生物测定为导向的分离工具。对于复杂的混合物,譬如食品、食品添加剂和食品补充剂而言,常规的活性测定实验仅能够获得整体的活性信息。通常要在这类样品中鉴别单个的活性成分需要繁冗的分离纯化步骤和活性测试实验。

现在有了新的替代方法, Bioluminex™分析将生物自发光技术和高效薄层色谱技术(HPTLC)直接联合起来,提供了一种独一无二的,快速高效地监控混合物中毒性或活性物质成分的技术。具体实现原理为,色谱展开后的HPTLC薄层板采用简便的浸渍设备以生物发光细菌溶液进行表面涂布。有抑菌活性的单个成分就选择性的在冷光的亮背景下显示为一个暗斑。结果可在数秒钟内呈现,并可进行数字成像。这一快速筛选分析技术非常适合于检测食物、饮料、

食品添加剂以及天然提取物等复杂物质系统中可能含有的特殊化合物及掺杂的有害化学物质等。对于潜在的生物活性成分鉴别而言同样是一种非常有用的工具。该技术与试剂盒兼容,同样是一种快速分析大量样品的经济方式。采用该技术可大规模筛选食品中的三聚氰胺的含量,检测限达ppm($\mu\text{g/g}$)级别。

该试剂盒采用生物自发的海洋细菌费氏弧菌 *Vibrio fischeri*。呼吸中的 *V. fischeri* 细胞会将多余的自由能释放出来,当达到临界细胞密度时即可检测到蓝绿色的荧光。所观察到的生物自发光现象反映了细菌的代谢状态,当细胞处于有害环境时,新陈代谢以及发光就会降低。因此发光的减少就可以用来测定毒性的强度,并可为HPTLC图谱选择性的检测和定量。

薄层板

Merck或Bioluminex™ HPTLC 硅胶60 F₂₅₄ 高效预制薄层色谱板(10 x 10 cm)。用色谱甲醇预洗,并于100 °C干燥活化15 min。

点样

采用CAMAG ATS4全自动薄层色谱点样设备进行条带状点样,条带宽6 mm,点样体积1 - 10 μL (取决于样品浓度)。

色谱条件

在10 x 10 cm双槽展开缸中,以下述的不同展开剂饱和30 min(加滤纸)。展开距离自底边算起60 mm。展开后的薄层板于40 °C 干燥2 h备用。

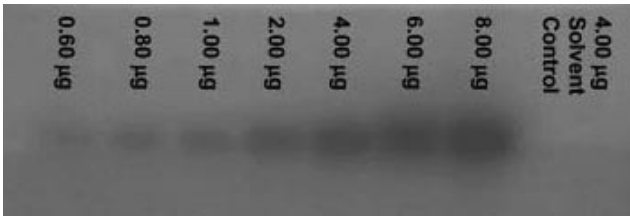
Bioluminex™ 检测

Bioluminex细菌在200 mL Bioluminex™混合介质中以分批培养的方式在恒温箱中生长过夜(大气压下30 h, 120 rpm, 28 °C)。在使用前,将Bioluminex™缓冲液加入发光完全的细菌溶液中(大气压下, 120 rpm, 28 °C)。展开后的薄层板利用CAMAG 薄层

板浸渍设备涂布发光细菌缓冲液。为了提高数据质量，将表面的多余细菌溶液用刮板清楚，并立即置于暗室中10 min拍摄反应图像。

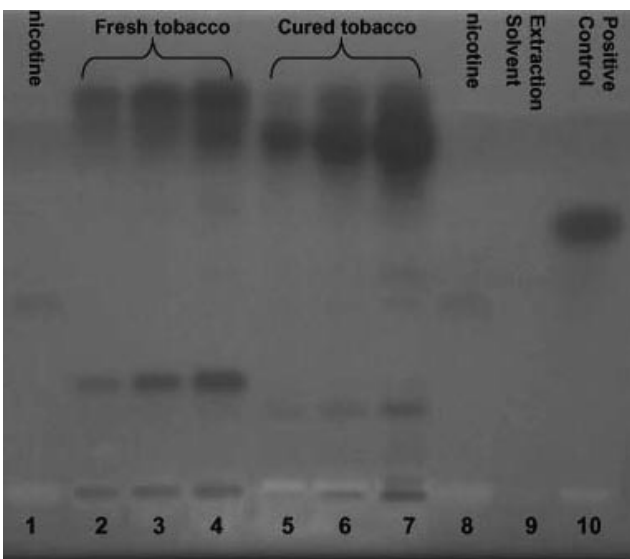
结果和讨论

Bioluminex分析可用于快速鉴别成分的活性。例如，将不同浓度的三聚氰胺样品点样于HPTLC薄层板上，进行针对 *Vibrio fischeri* 细菌的活性评价。在美国，三聚氰胺作为非法的食品膨胀剂被发现存在于宠物食品中，导致猫狗的死亡。三聚氰胺的生物活性可被费氏弧菌检测。



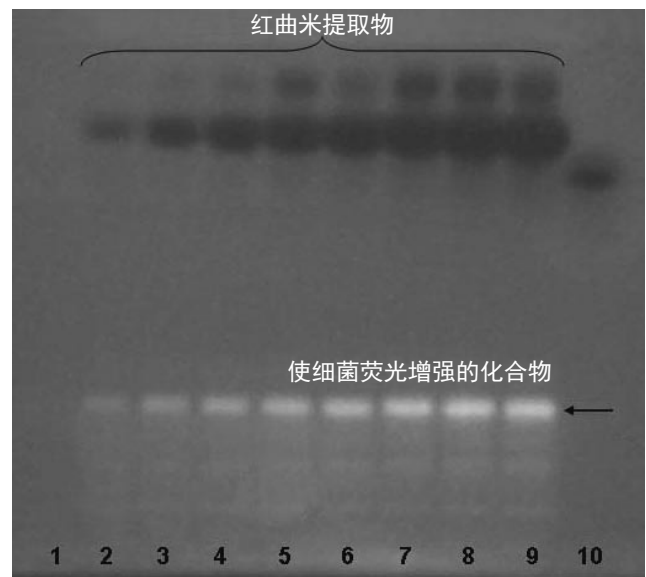
▲ 检测含不同浓度三聚氰胺的样品

该分析方法还提供特征的指纹图谱用于比较不同的产品，例如区分新鲜和加工后的烟草。在下面的例子中，新鲜和加工过的烟草产品样本用甲醇进行提取，以氯仿-甲醇-氨水（9:1:0.05）进行薄层层析，并采用Bioluminex技术进行分析。2个提取物显示出截然不同的色谱和生物活性指纹图谱。

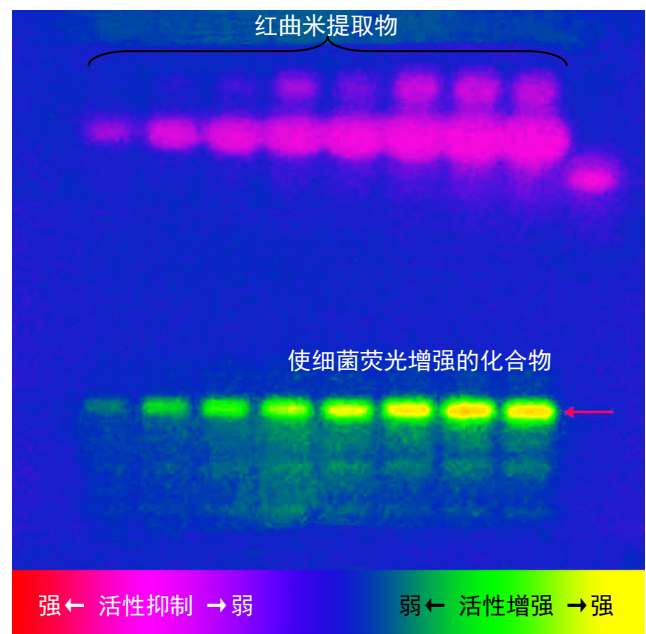


▲ 检测新鲜和加工过的烟叶的提取物

复杂的成分体系又譬如红曲米，这是一种天然的抑菌剂和降低胆固醇制剂，在亚洲的替代疗法中作为抗感染的药物，可用来对其中的感兴趣的生物活性成分进行筛选研究。例如将红曲米的甲醇提取物以氯仿-甲酸乙酯-甲酸-甲醇（5:5:2:2）进行薄层色谱展开在进行Bioluminex分析。结果发现2个 R_f 值为0.82和0.91的 *V. fischeri* 生物发光抑制成分和1个 R_f 值为0.25的发光增强成分。

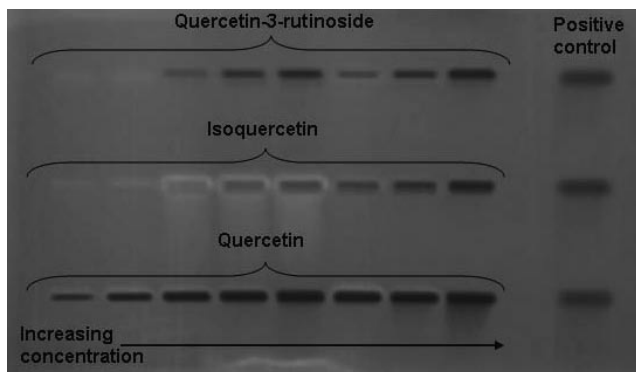


▲ 检测红曲米提取物（轨道2-9）



▲ 检测红曲米提取物（伪色图谱）

Bioluminex是一种用来研究构效关系（SAR）的快速方便的工具。本文展示了对3个相似结构化合物的构效关系分析，分别是点样于HPTLC薄层板上的槲皮素，异槲皮素和槲皮素-3-芸香糖苷（无色谱展开）。



▲3种相似化合物的构效关系研究

截至目前这种新颖的以生物活性为基础的检测技术主要应用于食品、法医学和环保等领域的样品检测。譬如 *V. Fischeri* 可用于检测罐装玉米中的赭曲霉毒素，蜂蜜中的曲霉毒素B1，牛奶中的地高辛，芹菜籽中的苯并芘，辣椒中的辣椒碱，各种饮料中的马钱子碱或单氟乙酸，苏打水中的软骨藻酸，以及苹果汁中的棒曲霉素等。

该技术最激动人心之处还在于对新的未知高活性成分的结构探索和推断提供捷径。因此进一步借助在线质谱联用技术对于获得该未知活性物质的结构信息非常有帮助。

进一步资料可向作者联系获取：

*Dr. Sheryl Verbitski, New Developments Department,
ChromaDex Analytics, 2830 Wilderness Place, Boulder, CO
80301, USA, SherylV@chromadex.com



CAMAG BioLuminizer

将薄层色谱的分离能力与生物发光检测相结合，使得鉴别单个生物活性成分成为可能。在复杂混合物体系中的能产生这种独特效果的所有组分均能够以皮摩尔的级别得到指认，例如在废水或法医样本内。

这种对样品中生物活性成分的全面检测使得其可检测到未知的活性代谢产物，使得该技术与传统的借助于对照物质的目标分析方法截然不同。

BioLuminizer是一款紧凑、易用的生物自发光显影图谱检测系统，可获得超乎想象的高质量图像质量和短曝光时间下的高空间分辨率，使得任何潜在活性成分所引起的微弱荧光变化均可得到识别。

开展该项检测所需的所有实验耗材均由瑞士CAMAG以BioLuminex标准试剂盒（货号 No. 022. 9765）的形式提供。

CAMAG
平面色谱的全球领导者