

基于磁免疫/生物发光的病原体快速检测研究

岳伟伟¹ 姜利英² 王春兴¹

(¹ 山东师范大学物理与电子科学学院, 山东 济南 250014)
(² 郑州轻工业学院电气信息工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要 针对病原体快速且高灵敏度和特异性检测的需求,将磁免疫技术与三磷酸腺苷(ATP)生物发光原理结合,提出一种新的致病菌检测方法。首先,采用磁性纳米粒子与特异性抗体结合制备免疫磁性纳米探针,特异性捕获目标物。然后,采用ATP生物发光技术对捕获的病原体裂解并检测,根据光强测量目标物浓度。以大肠杆菌(O157:H7)作为检测对象,在细菌浓度为 $10\sim 10^8$ CFU/mL(CFU为菌落形成单位)范围内,该方法与传统培养法线性相关系数为0.943,总测试时间为2 h。对样品重复测量12次,精密度达到4.88%,具有较好的重复性。

关键词 生物传感器;病原体;磁免疫分离;生物发光;纳米探针

中图分类号 TP212

OCIS 120.1880 170.6280 170.6280

文献标识码 A

Pathogen Rapid Detection Based on Immunomagnetic Separation and Bioluminescence

Yue Weiwei¹ Jiang Liying² Wang Chunxing¹

(¹ Department of Physics and Electronics, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014, China)
(² Department of Electric Information Engineering, Institute of Zhengzhou Light Industry, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract Focus on the requirement of pathogen detection with high speed, high sensitivity and specificity, a novel method integrated with immunomagnetic separation and adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence was developed. Firstly, an immunomagnetic nano probe was prepared by conjugating nano magnetic particles with antibody to capture the aim pathogen. Secondly, the pathogen captured by the nano probe was lysed and the ATP was detected by bioluminescence. Escherichia coli(O157:H7) samples with concentration of $10\sim 10^8$ CFU/mL(CFU: colony-forming units) were detected. The results show a linear response to the traditional plate count method with a correlation coefficient of 0.934 within 2 h. The reproducibility was also tested by 12 samples with the same concentration of 10^3 CFU/mL and the coefficient of variability is 4.88%.

Key words biosensor; pathogen; immunomagnetic separation; bioluminescence; nano probe

1 引言

对病原体进行快速简便、特异且高灵敏度检测一直是人们研究的热点,在食品安全、环境、医疗检测等领域具有重要意义。目前对病原体的检测技术从原理方面包括以下几种技术:培养计数法,分子生物学方法,酶联免疫学方法、生物芯片方法。

培养计数法是目前实际中普遍采用的方法,最大特点是检测结果准确,具有特异性;缺陷是检测速度慢,难以满足快速检测的需求^[1]。分子生物学方法的典型是聚合链式反应(PCR)^[2],优点是检测速度快,特异性、灵敏度高,易于实现自动化测量^[3,4];不足是容易造成检测结果的假阳性。酶联免疫技术基于抗原抗体反应,包括直接酶联免疫、三明治夹心酶联免疫和竞争型酶联免疫^[5],其优点是检测速度快,有特异性;缺点是灵敏度低,细菌浓度为 $10^3\sim 10^5$ CFU/mL(CFU:菌落形成单位)^[6]。生物芯片是近期发展的热门技术,其

收稿日期: 2010-04-27; 收到修改稿日期: 2010-07-22

基金项目: 河南省科技攻关项目(092102310027),河南省信息化电器重点实验室开放研究项目(IEA2009-0205)和济南市科技计划专项(201004033)资助课题。

作者简介: 岳伟伟(1980—),男,博士,讲师,主要从事生物传感器方面的研究。E-mail: yuewei@sdnu.edu.cn

理论基础为核酸杂交理论,往往以阵列的形式出现,优点是实现多通道测量^[7],但同样存在测量结果假阳性的不足。

对目前已有病原体检测技术及需求进行分析,病原体检测有两个重要技术环节需要兼顾解决:1)对目标检测物的有效捕获。包括特异性,快速以及减小干扰物的影响。2)高灵敏度检测。前提是尽量减少检测时间,因此应避免培养和扩增等前期处理过程,而寻求更高灵敏度的后期检测技术,解决检测时间和灵敏度的矛盾。

免疫磁分离技术 1999 年 Pyle B. H. 等^[8]用于食品检测,该技术与其他检测手段联用,成为研究热点。2009 年, M. Fisher 等^[9]将免疫磁分离技术与层析技术结合,测量炭疽杆菌孢子, Shu. I. Tu. 等^[10]将磁分离技术与时间分辨荧光光谱技术结合测量沙门氏菌, Yu Zhao 等^[11]采用磁分离技术和荧光量子点结合测量沙门氏菌,贺氏菌以及大肠杆菌(O157:H7)。2009 年, N. D. Ayaz 等^[12]采用磁分离技术与 PCR 技术结合,实现测量火鸡中的李斯特菌。磁免疫分离已成为细菌特异性富集的有效手段。

三磷酸腺苷(ATP)是细胞内的能量物质,ATP 生物发光技术的原理是:当反应系统中存在 ATP, Mg^{2+} 和 O_2 时,荧光素酶(E)催化荧光素(LH_2)发生氧化将其激发到激发态。当氧化荧光素由激发态跃迁到基态时,释放出荧光,当 ATP 的摩尔浓度小于 10^{-6} mol/L,其他反应物过量时,反应释放的荧光与 ATP 摩尔浓度成线性关系,因此可根据检测的荧光光强检测 ATP 含量。同时,由于不同种类的细菌所含的 ATP 摩尔浓度大致相同,研究证明平均每个细菌里的 ATP 质量为 0.1~4.0 fg,酵母菌里的 ATP 质量为 10~100 fg/CFU。而在死细胞中,ATP 会在几分钟内自动降解,即细菌细胞内的 ATP 摩尔浓度与细菌总数是成线性关系的,因此通过测量体系中的 ATP 摩尔浓度即可测量体系中的细菌总数^[13,14]。ATP 生物发光技术由于无需激发光,因此具有极高的检测灵敏度,理论可达到单个细菌水平。另外该技术测量微生物不需培养,检测时间小于 30 min。2002 年, Riof A. Deininger 等^[15]报道了利用 ATP 生物发光技术测量水中细菌总数,结果显示可以测量 200 个细菌。2005 年, Arjang Hassibi 等^[16]用生物发光技术对 DNA 进行测量,结果显示可以测量 10^{-18} mol 的 DNA,具有很高的检测灵敏度。

本文在研究基础上,将免疫磁分离技术与生物发光技术结合,实现大肠杆菌(O157:H7)的快速测量。首先,大肠杆菌抗体作生物素化处理(biotinylated),与修饰链酶亲和素(streptavidin)的磁性纳米颗粒通过亲和素-生物素链接反应制备为磁性纳米粒子探针(抗体 A-生物素-亲和素-纳米粒子),探针用于捕获目标病原体。对捕获的目标病原体采用细胞裂解剂裂解,释放其中的 ATP,根据 ATP 生物发光原理,通过测量光强测量致病菌含量。免疫磁分离技术用于特异性捕获,生物发光技术用于高灵敏度检测。

2 实 验

2.1 设备及试剂

实验设备包括, Pi-102 ATP 荧光检测仪(英国 Hygiena 公司)用于检测 ATP 生物发光;紫外分光光度计(UV-3010,日本日立)用于检测抗体及纳米探针的耦合效率;酶标仪(Bio-Rad Model 680 美国伯乐)用于检测磁性纳米探针对目标致病菌的捕获。实验使用试剂包括,磁性纳米粒子(fluidMAG-DEAE, 50 nm, 购自 Chemicell);利用 Tris 缓冲液调节 pH 值到 7.8 的 ATP 钠盐(购自上海生物科技有限公司);ATP 生物发光细菌检测试剂组(266-112,包括体细胞裂解剂,ATP 消除剂和荧光素及虫光素酶发光试剂,购自英国 Hygiena 公司);Tris-acetate 缓冲液(物质的量浓度为 25 mmol/L, pH 7.8, 实验室配制)。实验中其他所有试剂皆为分析纯,实验环境温度为室温 25 °C。

大肠杆菌(*Escherichia coli*, O157:H7)是一种典型的革兰氏阴性菌,标准菌株于麦康凯平皿(天津金章科技发展公司)上经划线、培养(37 °C, 24 h)活化后,分散于 200 μ L 灭菌生理盐水中,4000 r/min 离心 15 min,弃去上清,沉淀加灭菌生理盐水重新悬浮,得到细菌浓度约 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL(平板培养法计数)的原始菌液。对原始菌液进行 10 倍稀释,得到细菌浓度为 $10 \sim 10^6$ CFU/mL 范围的样品以备检测。将该样品分作两份,一份采用传统培养方法测量,作为参考结果,另一份由生物发光测量。

2.2 免疫磁性纳米探针制备

通过生物素-链酶亲和素反应,将生物素化的大肠杆菌抗体与链酶亲和素包被的磁性纳米颗粒结合制备免疫磁性纳米探针。首先,将 100 μ L 链酶亲和素包被的磁性纳米粒子(质量浓度为 10 mg/mL)放入 2 mL

离心管中并用缓冲液(物质的量浓度为 10 m mol/L PBS, pH 7.4, 0.05% Tween-20)清洗 3 次,用小磁铁富集并用 100 μ L PBS 缓冲液稀释。然后,加入 25 μ L 生物素化的大肠杆菌抗体,并在室温下以 120 r/min 的速度孵化 30 min,制备出免疫磁性纳米探针。探针的制备及对目标病原体的捕获示意图如图 1 所示。

2.3 目标病原体捕获及富集

分别取制备的细菌浓度为 $10 \sim 10^6$ CFU/mL 的大肠杆菌溶液 50 μ L 加入离心管中,后取 50 μ L 制备的免疫磁性纳米探针溶液分别放入不同浓度大肠杆菌溶液中,在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵化 30 min。通过抗原抗体反应,免疫磁性探针捕获目标病原体。将捕获用离心管放入磁场中 2 min,富集全部磁性纳米粒子,由于采用 ATP 生物发光技术,测量对象不是磁性纳米粒子,所以无需使用二抗以消除未与细菌结合的磁性粒子。最后,对富集的样品采用 150 μ L 清洗液(物质的量浓度为 10 m mol/L PBS, 0.05% Tween-20)进行清洗两次获得捕获的病原体待 ATP 生物发光检测。

2.4 ATP 生物发光测量

在对实际细菌样品测试之前,首先对不同浓度的标准 ATP 进行测试,具体方法为加入 ATP 及生物发光试剂的同时,开始采集并记录荧光信号。采用实时测量的方法,从而了解 ATP 生物发光的动力学特性。

对捕获的目标病原体采用 ATP 生物发光技术进行测量,所用试剂组购自 Hygiena 公司,包括细菌裂解剂及生物发光试剂。首先,取 100 μ L 细菌裂解剂加入放有目标致病菌的离心管中,裂解时间为 1 min,释放细菌中的 ATP;然后将离心管放入 PI-102 荧光检测仪中,加入 400 μ L 生物发光试剂,检测时间为 30 s,获得生物发光光强 U_L 或细菌总数 U_C 。

3 结果及讨论

3.1 抗体与磁性纳米粒子的结合效率

抗体与磁性纳米粒子的结合效率是制备免疫磁性纳米探针关键,通过紫外分光光度计对抗体溶液结合前后的吸光度进行测量,以确定两者的结合效率。通过测量,选择 295 nm 作为大肠杆菌抗体的吸收峰。假定原始抗体溶液的吸光度为 A_{b0} ,与磁性纳米粒子结合后,磁性纳米粒子探针被磁场富集,剩余抗体溶液的吸光度为 A_{b1} ,则抗体与纳米粒子结合的效率为

$$R_b = [(A_{b0} - A_{b1}) / A_{b0}] \times 100\% \quad (1)$$

表 1 为测量 5 次结合效率的结果,由结果可知,平均结合效率为 85.2%,说明两者可以较好地结合。

表 1 磁性纳米粒子与检测抗体结合效率测试

Table 1 Conjugation efficiency between nano magnetic particles and antibody

A_{b0}	A_{b1}	R_b	Average / %
34.6	5.3	0.847	85.2
33.7	6.2	0.816	
35.4	4.9	0.861	
37.8	4.6	0.878	
36.4	5.2	0.857	

3.2 免疫磁性纳米探针的捕获效率

将细菌浓度 $10 \sim 10^6$ CFU/mL 各梯度待测大肠杆菌样品分为两组,一组按国标培养法进行培养计数,另一组经过纳米探针耦合富集后剩余的样品同样进行培养计数,由两组计数结果测量磁性纳米探针针对目标致病菌的捕获效率,如表 2 所示。其中, C_0 为直接培养计数的结果, C_1 为经过磁性探针富集后剩余样品的

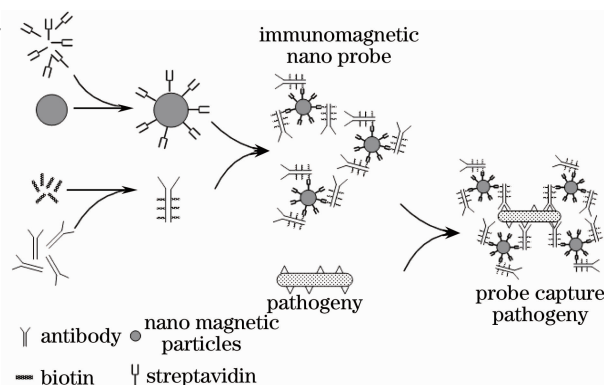


图 1 免疫磁性纳米探针制备及病原体捕获

Fig. 1 Procedure of immunomagnetic nano probe preparation and pathogen capture

细菌浓度。由表 2 可以得出,免疫磁性探针对目标致病菌的耦合效率 R_C ,平均可达 99.8%。

表 2 免疫磁性纳米探针的捕获效率测试

Table 2 Capture efficiency of immunomagnetic nano probe

C_0 /(CFU/mL)	C_1 /(CFU/mL)	R_C	Average /%
2.3×10^1	0	1.000	
2.3×10^2	1	0.996	
2.3×10^3	3	0.997	99.8
2.3×10^4	19	0.999	
2.3×10^5	32	0.999	
2.3×10^6	87	0.999	

3.3 ATP 荧光检测

在对实际细菌样品测试之前,首先对不同浓度的标准 ATP 进行测试以了解 ATP 生物发光的动力学特性。所采用的 ATP 样品的物质的量浓度分别为 10^{-15} , 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} 以及 10^{-6} mol/L,反应动力学测试结果如图 2 所示,分别对应曲线 1~6。

由图 2 可以看出,当样品物质的量浓度高于 10^{-14} mol/L 时,超出测量量程。这是因为在生物发光反应初期,由于反应物浓度较高,输出信号较高,达到了仪表的最大量程。以物质的量浓度为 10^{-14} mol/L 的样品为例,对在量程以内的结果进行数据拟合,如图 3 所示。

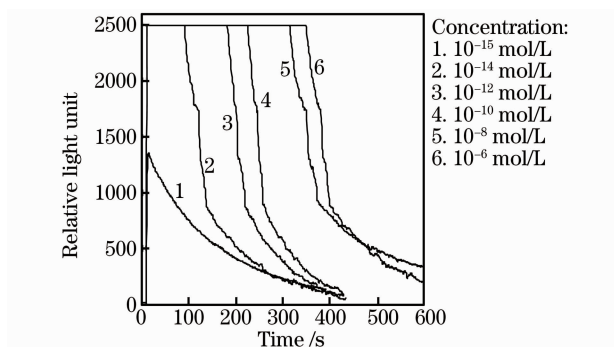


图 2 不同浓度 ATP 样品的生物发光反应动力学曲线

Fig. 2 Bioluminescence reaction kinetics of ATP samples with different concentrations

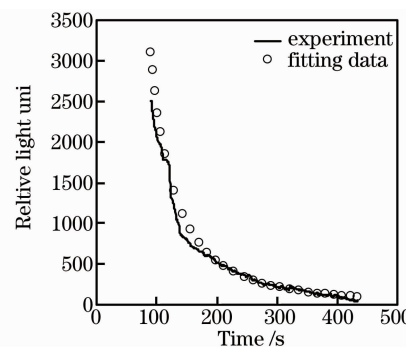


图 3 ATP 生物发光反应动力学拟合结果

Fig. 3 Fitting data of ATP bioluminescence reaction kinetics

拟合结果表明,在反应初期,发光强度达到最大值,随后逐渐衰减,并符合动力学方程^[17]

$$A = A_0 \exp(-kt), \quad (2)$$

式中 A 为 t 时刻的发光强度, A_0 为零时刻的发光强度, t 为反应时刻, k 为衰减常数,与反应物的浓度有关。实验与拟合结果线性相关性为 0.986。在后面的实验中,对所采集的数据进行拟合得到初期的光强值。

3.4 应用实验

ATP 荧光检测仪测量结果为 U_L , 而实际细菌浓度为 U_C , 因此需要建立两者的经验方程。以细菌浓度为 $(23 \sim 2.3) \times 10^6$ CFU/mL 的大肠杆菌样品作为检测对象,以培养法测量结果作为参考,测量结果如图 4 所示,在细菌浓度为 $(23 \sim 2.3) \times 10^6$ CFU/mL 范围内,发光强度与培养测量细菌总数之间的线性相关系数为 0.926,校正方程为

$$\log(U_L) = 0.548 \log(U_C) + 0.512. \quad (3)$$

将测量结果代入(3)式,即可测量未知浓度的大肠杆菌溶液浓度。

在培养的大肠杆菌平皿中再次挑取样品,加入灭菌

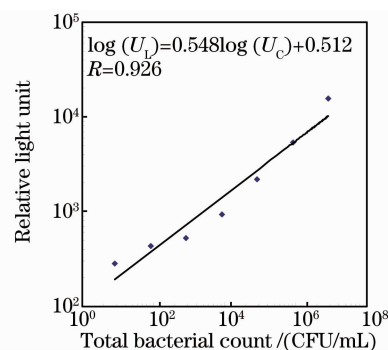


图 4 生物发光强度与细菌总数关系曲线

Fig. 4 Relation between bioluminescence and total bacterial number

生理盐水悬浮,制备成未知浓度的检测样品母液。将此母液按 10 倍及 5 倍各稀释 8 次,后分为两组。一组按国际标准进行培养计数,另一组采用磁免疫生物发光测量,并按(3)式计数。经培养计数,测量的大肠杆菌样品的细菌浓度范围为 $(8\sim 8.3)\times 10^8$ CFU/mL。两种测量方法的对比结果如图 5 所示,其中 C_b 代表利用磁免疫生物发光技术测量的细菌浓度, C_p 代表传统平板计数法的测量。由图可以看出,磁免疫生物发光技术与传统培养方法在所测量的浓度范围内线性相关系数 $R=0.943$,有明显的相关性。

选取细菌浓度为 8.3×10^2 CFU/mL 的样品进行重复性实验,对相同样品测量 12 次,测量结果如图 6 所示。利用磁免疫生物发光测量细菌浓度平均值为 501 CFU/mL,12 次测量的精密密度为 4.88%,具有较好的重复性。

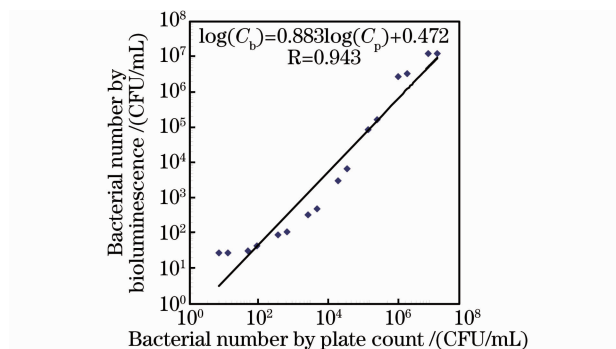


图 5 磁免疫生物发光与平板计数法测量对比曲线

Fig. 5 Detection results of immunomagnetic bioluminescence and plate count method

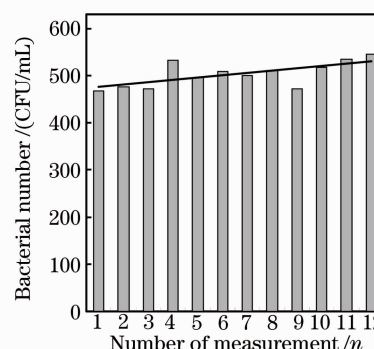


图 6 磁免疫生物发光重复性测试

Fig. 6 Reproduction results of immunomagnetic bioluminescence

4 结 论

针对致病菌快速简便,特异灵敏检测的需求,提出一种基于磁免疫技术与 ATP 生物发光原理结合的致病菌检测方法。其中,磁免疫技术采用磁性纳米粒子与特异性抗体结合制备免疫磁性纳米探针,用于目标物的快速特异性捕获与富集,对磁免疫纳米探针的制备条件,对目标物的捕获效率进行了研究,表明制备的磁免疫纳米探针可有效捕获目标病原体,平均捕获效率达 99.8%。采用 ATP 生物发光技术测量目标致病菌含量,主要利用其背景低且无需培养的特点提高检测灵敏度和速度。ATP 技术由于无特异性,一直作为细菌总数指标检测的手段,本文首先采用磁免疫纳米探针将被测物捕获,因此使 ATP 生物发光检测固定的细菌,从而具有特异性。以大肠杆菌(O157:H7)为实验目标物,在细菌浓度为 $(8\sim 8.3)\times 10^8$ CFU/mL 范围内进行测量,测量时间为 2 h。结果表明与传统培养方法的线性相关系数为 0.943,对同一样品进行重复性实验,测量 12 次获得精密密度为 4.88%,说明与传统方法相比具有很好的相关性和重复性。本方法具有检测速度快,特异性好且具有较高的灵敏度,为食品、环境、医药等领域的病原体检测提供了一种新的方法和技术。

参 考 文 献

- Swaminathan B., Feng P.. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1994, **48**: 401~426
- Monis P. T., Giglio S.. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2006, **6**(1): 2~12
- Hua Yang, Huaping Li, Xiuping Jiang. Detection of foodborne pathogens using bioconjugated nanomaterials [J]. *Microfluid Nanofluid*, 2008, **5**(5): 571~583
- Deisingh A. K., Thompson M.. Biosensors for the detection of bacteria[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, **50**(2): 69~77
- Lazcka O., Del Campo F. J., Munoz F. X.. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, **22**(7): 1205~1217
- Churchill R. L., Lee H., Hall J. C.. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, **64**(2): 141~170
- Sulan Bai, Jinyi Zhao, Yaochuan Zhang *et al.*. Rapid and reliable detection of 11 food-borne pathogens using thin-film

- biosensor chips[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, **86**(3): 983~990
- 8 Pyle B. H. , Broadaway S. C. , McFeters G. A. . Sensitive detection of Escherichia coli O157:H7 in food and water by immunomagnetic separation and solid-phase laser cytometry[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(5): 1966~1972
- 9 M. Fisher, Y. Atiya-Nasagi, I. Simon *et al.*. A combined immunomagnetic separation and lateral flow method for a sensitive on-site detection of Bacillus anthracis spores-assessment in water and dairy products[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, **48**(4): 413~418
- 10 Shu I. Tu, Sue A. Reed, Andrew G. *et al.*. Detection of salmonella enteritidis from egg components using different immunomagnetic beads and time-resolved fluorescence[J]. *Food Analytical Methods*, 2009, **2**(1): 14~22
- 11 Yu Zhao, Mingqiang Ye, Qiangguo Chao *et al.*. Simultaneous detection of multifood-borne pathogenic bacteria based on functionalized quantum dots coupled with immunomagnetic separation in food samples[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, **57**(2): 517~524
- 12 N. D. Ayaz, I. Erol. Rapid detection of listeria monocytogenes in ground turkey by immunomagnetic separation and polymerase chain reaction[J]. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 2009, **17**(2): 214~222
- 13 Pavel Dostalek, Tomas Branyik. Prospects for rapid bioluminescent detection methods in the food industry-a review[J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2005, **23**(3): 85~92
- 14 Girotti S. , Ferri E. , Fini F. *et al.*. Determination of microbial contamination in milk by ATP assay[J]. *Czech Journal of Food Science*, 1997, **15**(4): 241~248
- 15 Roif A. Deininger, J. Young Lee. Rapid Detection of Bacteria in Water[C]. *SPIE*, 2002, **4722**: 21~25
- 16 Arjang Hassibi, Christopher Contagd, Marcel O. Vlade *et al.*. Bioluminescence regenerative cycle (BRC) system: Theoretical considerations for nucleic acid quantification assays[J]. *Biophysical Chemistry*, 2005, **116**(3): 175~185
- 17 Feng Min, Lin Chunquan, Zhu Jiayan *et al.*. Quick determination of irradiation sterilization for agricultural products by ATP bioluminescence technique[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2006, (5): 147~150
- 冯 敏, 刘春泉, 朱佳延 等. ATP 生物发光技术快速测定农产品辐照灭菌效果[J]. *江苏农业科学*, 2006, (5): 147~150