

荧光量子点免疫标记法检测炭疽芽孢杆菌

刘晓红^{1,2} 罗金平¹ 田 青^{1,2} 刘春秀¹ 蔡新霞^{* 1,2}

¹(中国科学院电子学研究所传感技术联合国家重点实验室, 北京 100190)

²(中国科学院研究生院, 北京 100190)

摘 要 建立了荧光量子点标记-免疫分析技术联用检测炭疽芽孢杆菌的方法。通过抗原抗体反应,结合生物素与亲和素间的特异性相互作用,将 QDs 特异性标记在炭疽芽孢杆菌上,并利用荧光显微镜和荧光分光光度计进行了验证。采用实验室自制的便携式荧光检测系统对标记 QDs 的炭疽芽孢杆菌样品进行定量检测。结果表明,在炭疽芽孢杆菌浓度在 $100 \sim 1 \times 10^6$ CFU/mL 范围内,相对荧光强度与炭疽芽孢杆菌浓度呈良好的线性关系,相关系数 $R = 0.9554$,检测相对标准偏差为 2.2%。通过与同菌属其它杆菌对比,证明本方法特异性良好。与传统方法相比,本方法操作简单,检测时间短(1 h),且能实现定量检测,在公共安全等方面有广泛的应用前景。

关键词 荧光量子点; 炭疽芽孢杆菌; 定量检测; 特异性

1 引 言

炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*) 具有高度致病性,特定条件下炭疽芽孢杆菌会形成芽孢^[1,2],在外环境中可存活数十年,给人类健康带来极大威胁^[3,4]。快速现场检验与鉴定炭疽芽孢杆菌对人和食草动物炭疽病的诊断及环境的卫生安全十分重要^[5]。传统检测炭疽主要通过涂片显微镜检查、培养性状、噬菌体实验等方法^[6,7],这些方法能进行定性检测,需专门人员操作,步骤繁琐,耗时长(2 ~ 4 d)。如混合有同菌属的芽孢杆菌,还会出现假阳性^[8]。

近年出现了一些快速简便的检测方法,如聚合酶链反应(PCR) 技术^[9~11]、酶联免疫分析(ELISA) 法^[12~14]、光纤生物传感器技术^[15,16]及免疫荧光技术^[17]等。PCR 技术虽然特异性好,灵敏度高,但也存在样品准备复杂,分析时间长,需专业人员操作,试剂成本较高等缺点; ELISA 法虽在检测炭疽芽孢杆菌方面研究较多,但操作步骤多且耗时; 光纤生物传感器技术一般基于双抗体夹心法,特异性较好,但也存在只可进行定性分析^[18],灵敏度不高^[19]等不足。免疫荧光技术是近年发展起来的新兴技术,具有传统技术不可比拟的优势。但由于传统的荧光染料(如异硫氰酸荧光素、罗丹明等) 的激发光谱和发射光谱互相干扰严重^[20,21],限制了其应用范围。作为新型荧光标记材料的荧光量子点(Quantum dots, QDs), 因其具有发射光谱范围窄且对称、Stokes 位移大、背景噪声小等优点^[20,21],灵敏度和分辨率显著提高,引起了研究者的极大关注。本研究通过抗原抗体反应来特异性捕获样品中的待测菌,结合生物素与亲和素间的特异性相互作用,将 QDs 标记到炭疽芽孢杆菌上,利用实验室自制的便携式荧光检测系统对炭疽芽孢杆菌进行定量检测。与传统方法相比,本方法操作简单,检测时间缩短(1 h),特异性良好,有望用于野外现场检测,在公共安全等领域具有重要的实际意义。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

F4500 荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司); 尼康 TE2000U 荧光显微镜(日本 Nikon 公司); CT15RE 高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司); 恒温培养箱(德国 MMM 公司); JQ-1 型免疫反应振荡器(上海强运科技有限公司); 便携式荧光检测系统(包括传感器和便携式荧光检测仪,由实验室自

2010-05-12 收稿; 2010-09-25 接受
本文系国家 863 项目(Nos. 2009AA03Z411, 2007AA03Z428), 国家科技重大专项(No. 2008Z10003003-02), 中科院优秀奖资助项目(No. J0913190260) 和中科院知识创新项目“太湖水域藻类污染传感器关键技术研究”资助。All rights reserved. <http://www.cnki.net>
* E-mail: xxcai@mail. ie. ac. cn

制) [24]。

生物素化的羊抗兔 IgG(效价 1:500,北京欣经科生物公司);链霉亲和素化的荧光量子点($2\text{ }\mu\text{mol/L}$, QDs 550,武汉珈源量子点公司);磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L , pH 7.4,美国 Sigma 公司);抗体稀释液(pH 7.4,北京欣惠泽奥科技有限公司);封闭液(含 0.01 mol/L PBS, 3% BSA,实验室自行配制)。所用试剂均为分析纯,实验用水为去离子水。

炭疽芽孢杆菌抗血清与炭疽芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、鼠疫杆菌、布氏杆菌和蜡样芽孢杆菌均经高压灭活处理,由中国药品生物制品检定所提供。

2.2 实验方法

2.2.1 检测原理 通过抗原抗体反应,特异性捕获样品中的待测菌,结合生物素与亲和素间的特异性相互作用,将荧光量子点标记到炭疽芽孢杆菌上形成荧光免疫复合物。在激发光的作用下,标记在待测菌上的荧光量子点发射荧光,通过检测荧光信号建立标准曲线,实现炭疽芽孢杆菌的定量检测。检测原理如图 1 所示。

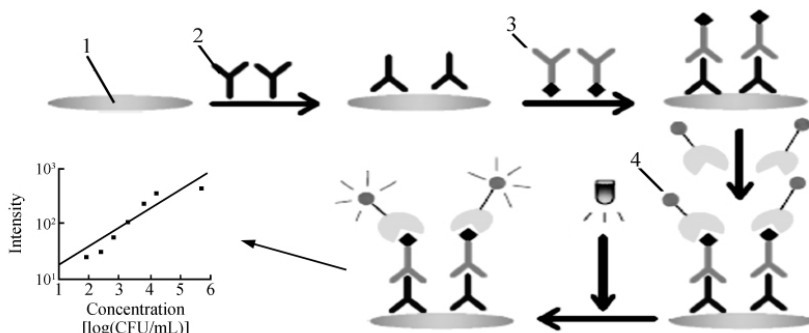


图 1 荧光量子点标记炭疽芽孢杆菌原理示意图

Fig. 1 Diagram of labelling of *B. anthracis* with streptavidin-conjugates quantum dots(QDs)

1. 炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*); 2. 炭疽芽孢杆菌抗体(Anti-*B. anthracis*); 3. 生物素化的羊抗兔 IgG (Biotinylated anti-rabbit IgG); 4. 亲和素化的荧光量子点 (Streptavidin-conjugated QDs)。

2.2.2 荧光量子点与炭疽芽孢杆菌偶联方法 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 炭疽芽孢杆菌溶液,离心收集炭疽芽孢杆菌后,加入封闭液封闭 10 min; 去除封闭液,使用 PBS 对菌液重新稀释,再加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 炭疽芽孢杆菌抗体(即一抗,稀释比为 1:10)溶液混匀,振荡孵育 10 min 后,对样品进行离心洗涤;加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 生物素化的羊抗兔 IgG(即二抗,稀释比为 1:20)混匀,振荡孵育 10 min 后再次进行离心洗涤;加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 链霉亲和素化的 QDs 溶液(稀释比为 1:50),振荡孵育 10 min 后进行离心洗涤,得到最终待测样品。实验中的封闭与孵育过程均在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中进行,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以 5000 r/min 离心 2 min,洗涤液均为 PBS。

2.2.3 荧光量子点与炭疽芽孢杆菌偶联效果测试 荧光显微镜测试:对炭疽芽孢杆菌不作 QDs 标记,按照 2.2.2 节进行处理,利用荧光显微镜观察处理后的样品,观察炭疽芽孢杆菌形态及荧光的变化。按照 2.2.2 节处理炭疽芽孢杆菌样品后,利用荧光显微镜观察明场和荧光图像,判断 QDs 是否标记在炭疽芽孢杆菌上。

荧光分光光度计测试:由于便携式荧光检测仪的激发波长为 395 nm ,利用 F4500 荧光分光光度计考察 395 nm 激发光下 QDs 的发射光谱;同时考察了激发光波长为 395 nm 时,按照 2.2.2 节处理后的炭疽芽孢杆菌样品的发射光谱。对比 QDs 标记前后的发射光谱,判断 QDs 是否标记在炭疽芽孢杆菌上。

2.2.4 便携式荧光检测系统测试 利用实验室自制便携式荧光检测系统对按 2.2.2 节处理后的炭疽芽孢杆菌样品进行测试。取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 处理后的样品滴加在传感器的微孔滤膜上,再用 PBS 溶液对传感器进行冲洗,将游离 QDs 去除,使结合有 QDs 的炭疽芽孢杆菌在微孔滤膜上富集。将传感器插入荧光检测仪的接口,进行相对荧光强度检测,10 s 后显示检测结果 [24]。

3 结果与讨论

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

3.1 荧光量子点与炭疽芽孢杆菌偶联效果测试

图 2A 和图 2B 为未标记 QDs,且其它处理同 2.2.2 节中的炭疽芽孢杆菌样品,在显微镜下明场与荧光图像,说明炭疽芽孢杆菌自身不发光,且标记 QDs 前后的形态未发生较大变化,有利于后续检测。

图 2C 和图 2D 为标记上 QDs 的炭疽芽孢杆菌样品在显微镜下明场和荧光图像,可以清晰地鉴别出经 QDs 标记的炭疽芽孢杆菌,且与明场下的炭疽芽孢杆菌对应很好,表明通过抗原抗体反应及生物素-亲和素作用力,QDs 能够很好地标记在炭疽芽孢杆菌上。

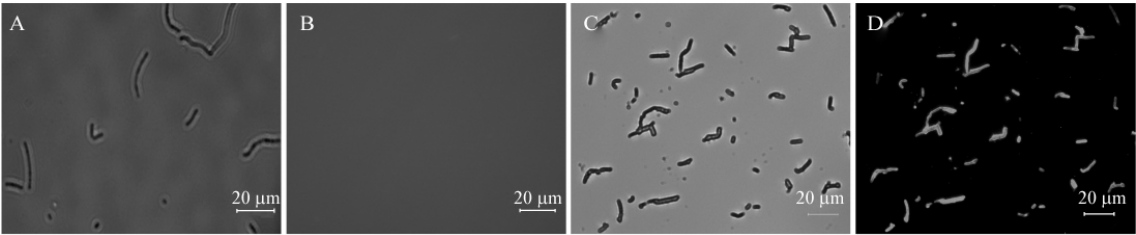


图 2 炭疽芽孢杆菌在显微镜下的明场与荧光图像
Fig.2 Fluorescence and bright-field images of *B. anthracis*

A. 未标记 QDs 的炭疽芽孢杆菌明场图像(Bright-field image of *B. anthracis* cells without QDs); B. 未标记 QDs 的炭疽芽孢杆菌荧光图像(Fluorescence image of *B. anthracis* cells without QDs); C. 标记 QDs 的炭疽芽孢杆菌明场图像(Bright-field image of *B. anthracis* cells with QDs); D. 标记 QDs 的炭疽芽孢杆菌荧光图像(Fluorescence image of *B. anthracis* cells with QDs)。

如图 3 所示,QDs 与不同浓度标记 QDs 的炭疽芽孢杆菌样品均在 550 nm 处有荧光发射峰,且炭疽芽孢杆菌样品的发射峰值随浓度的降低而降低,表明 QDs 已标记在炭疽芽孢杆菌上,能够实现定量检测。

3.2 便携式荧光检测系统测试结果

3.2.1 工作曲线制作 按照 2.2.2 节对不同浓度的炭疽芽孢杆菌溶液进行处理,利用便携式荧光检测系统测定相对荧光强度。以 PBS 溶液为空白,将样品的相对荧光强度去除空白值作为最终检测结果,响应曲线如图 4 所示。结果表明,炭疽芽孢杆菌的相对荧光强度与其浓度($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ CFU/mL) 的对数值呈较良好的线性关系,线性方程为 $Y =$

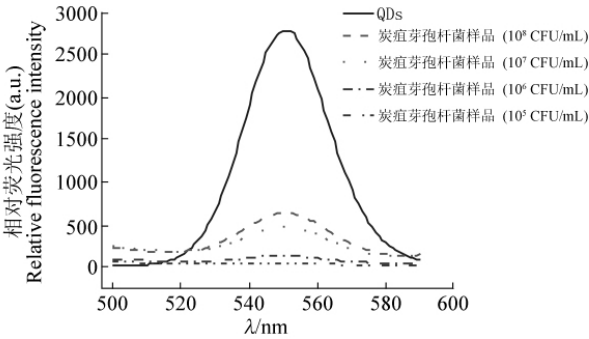


图 3 QDs 与标记 QDs 的炭疽芽孢杆菌样品的发射光谱比较
Fig.3 Comparison of fluorescence emission spectra of QDs and QDs-labeled *B. anthracis*
QDs 浓度(Concentration): 2×10^{-8} mol/L; 标记炭疽芽孢杆菌的 QDs 浓度(Concentration): 1×10^{-8} mol/L。

$5.87211 \log X + 33.08297$,相关系数 $R = 0.9554$ 。本方法结合实验室自制的便携式荧光检测系统对炭疽芽孢杆菌的检出限为 100 CFU/mL。

3.2.2 重复性测试结果 利用便携式荧光检测系统对 6 份处理好的浓度为 1×10^6 CFU/mL 的炭疽芽孢杆菌样品进行测试,考察了方法的重复性。检测结果的相对标准偏差为 2.2%,说明本方法具有良好的重复性。

3.2.3 特异性测试结果 利用便携式荧光检测系统进行测试。选取 PBS 溶液(作为空白)、地衣芽孢杆菌样品、短小芽孢杆菌样品、枯草芽孢杆菌样品、鼠疫杆菌样品、布氏杆菌样品、蜡样芽孢杆菌样品(以上菌液浓度均为 1×10^6 CFU/mL),与 1×10^6 CFU/mL 炭疽芽孢杆菌样品进行对比,如图 5 所示。

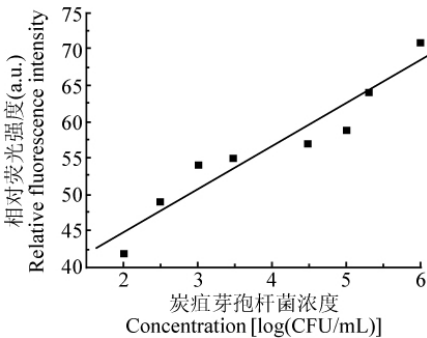


图 4 不同浓度炭疽芽孢杆菌与相对荧光强度的关系曲线图
Fig.4 Variation in differential fluorescence intensity with concentration of *B. anthracis*

结果表明,高浓度对比菌的相对荧光强度与空

白值接近,均远低于 1×10^3 CFU/mL 炭疽芽孢杆菌样品,说明 QDs 特异性的标记在炭疽芽孢杆菌样品上,与其它对比菌非特异性吸附小,证明了本方法的特异性良好。

4 结 论

建立了荧光量子点结合免疫荧光标记技术检测炭疽芽孢杆菌的方法。通过荧光显微镜观察和荧光分光光度计测试,证明 QDs 可很好地标记在炭疽芽孢杆菌上。利用实验室自制的便携式荧光检测系统检测样品的相对荧光强度,表明炭疽芽孢杆菌浓度与相对荧光强度呈良好的线性关系,相关系数 R 为 0.9554;检测相对标准偏差为 2.2%。此外,通过与同菌属其它杆菌对比,证明了本实验方法特异性好。与传统方法相比,本方法操作简单,检测时间缩短(1 h),在公共安全等方面具有良好的应用前景,但游离 QDs 干扰的去除方法、检测系统的精度等方面还有待进一步研究,以便更好地提高检测灵敏度。

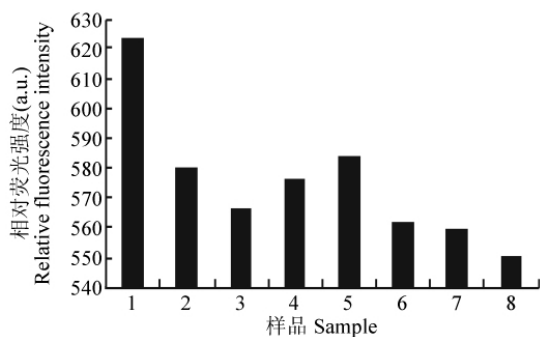


图 5 空白与不同菌种的相对荧光强度对比图

Fig. 5 Fluorescence intensities of different bacteria and blank

1, 1×10^3 CFU/mL 炭疽芽孢杆菌 (*B. anthracis*); 2, 空白 (Blank); 3, 1×10^6 CFU/mL 地衣芽孢杆菌 (*B. Licheniformis*); 4, 1×10^6 CFU/mL 短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*); 5, 1×10^6 CFU/mL 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*); 6, 1×10^6 CFU/mL 鼠疫杆菌 (*Yersinia pestis*); 7, 1×10^6 CFU/mL 布氏杆菌 (*Brucella*); 8, 1×10^6 CFU/mL 蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*)。

References

- James C P, John D M, Edward M E, Arthur M F. *Arch. Intern. Med.*, **1998**, 158(5): 429 ~ 434
- Kaufmann A F. *Salisbury Med. Bull. Suppl.*, **1990**, 68(Supplement): 16 ~ 17
- Higgins J A, Cooper M, Schroeder-Tucker L, Black S, Miller D, Karns J S, Manthey E, Breeze R, Perdue M L. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, 69(1): 593 ~ 599
- Inglesby T V, Henderson D A, Bartlett J G, Ascher M S, Eitzen E, Friedlander A M. *JAMA*, **1999**, 281(18): 1735 ~ 1745
- WEN Yu-Mei(闻玉梅). *Modern Medical Microbiology(现代医学微生物学)*, Shanghai(上海): Shanghai Medical University Press(上海医科大学出版社), **1999**: 441
- Franz D R, Jahrling P B, Frielander A M, McClain D J, Hoover D L, Bryne W R, Pavlin J A, Christopher G W, Eitzen E M. *JAMA*, **1997**, 278(5): 399 ~ 411
- Papaparaskevas J, Houhoula D P, Papadimitriou M, Saroglou G, Legakis N J, Zerva L. *Emerg. Infect. Dis.*, **2004**, 10(4): 732 ~ 735
- Belgrader P, Benett W, Hadley D, Richards J, Stratton P, Mariella R, Milanovich F. *Science*, **1999**, 284(5413): 449 ~ 450
- Ji Ying, WANG Qing-Qing, FU Jie, GAO Xin, SONG Hai-Feng(季颖, 王清清, 付洁, 高新, 宋海峰). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2010**, 38(5): 622 ~ 626
- Tims T B, Daniel V L. *J. Microbiol. Methods*, **2004**, 59(1): 127 ~ 130
- ZHENG Ling, HONG Xin-Ru(郑玲, 洪新如). *Chinese Journal of Zoonoses(中国人兽共患病杂志)*, **2003**, 19(4): 112 ~ 114
- YU Feng-Li, ZOU Jin, MEI Zhen-Hua(于凤丽, 邹晋, 梅振华). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2009**, 37(7): 994 ~ 998
- Morais S, GonzalezMartinez M A, Abad A, Montoya A, Maquieira A, Puchades R. *J. Microbiol. Methods*, **1997**, 208(1): 75 ~ 83
- WEI Hua, JIANG Yong-Qiang, ZHAO Yong-Kai, BI Yu-Jing, GUO Zhao-Biao, ZHAI Jun-Hui, SONG Ya-Jun, HUANG Hui-Jie, YANG Rui-Fu(魏华, 姜永强, 赵永凯, 毕玉晶, 郭兆彪, 翟俊辉, 宋亚军, 黄惠杰, 杨瑞馥). *Letters in Biotechnology(生物技术通讯)*, **2006**, 17(3): 374 ~ 377

- 15 Tims T B, Lim D V. *J. Microbiol. Methods*, **2004**, 59(1): 127 ~ 130
- 16 Welkos S L, Cote C K, Rea K M, Gibbs P H. *J. Microbiol. Methods*, **2004**, 56(2): 253 ~ 265
- 17 Hang J, Sundaram A K, Zhu P X, Shelton D R, Karns J S, Martin P A W, Li S H, Amstutz P, Tang C M. *J. Microbiol. Methods*, **2008**, 73(3): 242 ~ 246
- 18 HUANG Hua-Wei, DU Mei-Ju(黄华伟, 杜美菊). *Applied Chemical Industry(应用化工)*, **2007**, 36(4): 394 ~ 397
- 19 Chen C, Alexander H, Dalibor S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(27): 8130 ~ 8133
- 20 Su X L, Li Y. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(16): 4806 ~ 4810
- 21 ZHANG Xian-En(张先恩). *Biosensors(生物传感器)*. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), **2006**: 371
- 22 LIU Jian(刘剑). *Ph. D Dissertation*, The Chinese Academy of Sciences, China, **2008**: 156 ~ 157

Detection of *Bacillus Anthracis* Using Fluorescence Immunoassay with Quantum Dots Labels

LIU Xiao-Hong^{1,2}, LUO Jin-Ping¹, TIAN Qing^{1,2}, LIU Chun-Xiu¹, CAI Xin-Xia^{*1,2}

¹(State Key Laboratory of Transducer Technology, Institute of Electronics,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)

²(Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)

Abstract A method for detecting *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) was constructed with indirect immunofluorescence technique using quantum dots (QDs) as fluorescent probes. *B. anthracis* could be labeled with QDs selectively, that was proved by fluorescence microscope and F4500 spectrofluorometer. The laboratory-made system including biosensor and device was utilized as detection apparatus. A linear relationship of the fluorescence intensity and log total count of *B. anthracis* was obtained with correlation coefficient of 0.9554 from 100 CFU/mL to 1×10^6 CFU/mL, and a low relative standard deviation of 2.2%. By comparing the fluorescence intensity of *B. anthracis* and other bacillus, this method showed good specificity. Because of the simple operation, the detecting time is less (1 h) than traditional methods as well as quantitative detection, this method has potential prospect in monitoring *B. anthracis* and other biowarfare agents.

Keywords Quantum dots; *Bacillus anthracis*; Quantitative detection; Specificity

(Received 12 May 2010; accepted 25 September 2010)

2011 年冶金及材料分析检测人员培训通知

为提高我国分析检测人员的技术能力,确保实验室向社会提供检测结果的准确性和可靠性,中国金属学会分析测试分会协同钢铁研究总院分析测试培训中心将于 2011 年将在北京·钢铁研究总院举办四期包含拉伸试验、XRF、ICP、火花光谱、金相分析以及冶金材料化学成分分析测量不确定度评定等共十二个班次的“冶金及材料分析检测技术培训班”,并分别在上海、北京、成都和广州举办四期“金属材料拉伸试验方法国家标准(GB/T 228.1-2010)培训班”。培训班讲师均为全国分析检测人员能力培训委员会(NTC)指定技术的考核及培训大纲编写组专家、冶金及材料检测相关标准主要起草人,其中金属材料拉伸试验方法国家标准培训班特邀 GB/T 228 的主要起草人钢铁研究总院高怡斐教授、梁新邦教授担任主讲老师。同时培训中心常年举办力学测试、金相检测、光谱分析、化学湿法分析等相关技术一对一的师徒培训,并为冶金及材料领域实验室提供覆盖全专业的检测人员现场培训服务和实验室认可咨询服务。欢迎登录网站或电话垂询。

钢铁研究总院分析测试培训中心 中国金属学会分析测试分会秘书处

地址:北京市海淀区学院南路 76 号 14 信箱

E-mail: training@analysis.org.cn

邮编: 100081

电话: 010-62183362, 62182652, 62183851

网址: www.yejinfenxi.cn; www.nacis-cn.com

传真: 010-62182652, 62182584