

免疫磁珠捕获PCR快速检测单核细胞增生李斯特氏菌

李婧娟¹, 郭慧琴², 高晓强³, 刘芳³, 邱实¹, 李建武¹, 曾海娟¹, 刘兰², 宋春美¹, 刘箐^{1,*}
(1.上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093; 2.上海慧耘生物科技有限公司, 上海 200433;
3.甘肃出入境检验检疫局, 甘肃 兰州 730020)

摘要: 利用免疫磁珠富集单核细胞增生李斯特氏菌, 采用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增进行快速检测。所制备的免疫磁珠选取在37 °C条件下均匀振荡1 h为最佳包被条件, 1 mg磁珠偶联抗体的最佳量为100 µg/mg, 制备的免疫磁珠捕获率为45%。所建立的免疫磁珠捕获-PCR技术在样品细菌浓度达到10⁴ CFU/mL即可被检出, 其灵敏度是直接PCR检测限 (10⁵ CFU/mL) 的10倍, 可为病原菌的富集和快速检测提供新方法。

关键词: 免疫磁珠; 单核细胞增生李斯特氏菌; 聚合酶链式反应

Immunomagnetic Capture PCR for Rapid Detection of *Listeria monocytogenes*

LI Jinghui¹, GUO Huiqin², GAO Xiaoqiang³, LIU Fang³, QIU Shi¹, LI Jianwu¹, ZENG Haijuan¹, LIU Lan², SONG Chunmei¹, LIU Qing^{1,*}
(1. College of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. Prajna Biology Technique Co. Ltd., Shanghai 200433, China;
3. Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Lanzhou 730020, China)

Abstract: This experiment was conducted using immunomagnetic enrichment followed by amplification with polymerase chain reaction (PCR) for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. The best coating conditions were achieved by shaking the prepared immunomagnetic beads at 37 °C for 1 h, and the amount of antibody conjugated to the immunomagnetic beads was 100 µg/mg, leading to a capture rate of 45%. The immunomagnetic capture PCR assay was able to detect as low as 10⁴ CFU/mL *Listeria monocytogenes* with 10 times higher sensitivity than direct PCR showing a limit of detection of 10⁵ CFU/mL. This PCR assay can provide a new method for the enrichment and rapid detection of pathogenic bacteria.

Key words: IMBs; *Listeria monocytogenes*; PCR

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 12-0226-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201512043

单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) 是一种常见的食源性致病菌, 世界贸易组织于20世纪90年代将其列为四大食源性病原菌之一。由于其广泛存在于自然界, 当牲畜感染后, 最终可通过食物链导致人类感染。人类受感染后可导致脑膜炎、胃肠炎、败血症、孕妇流产等, 新生儿及免疫力低下者更易感染。由于该菌能忍受冷冻和干燥, 在极端的环境中亦能存活, 因此对人体的身体健康造成潜在的危^[1-2]。

目前针对于 *Lm* 的检测方法有传统分离检测法、酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、酶免疫分析检测技术等^[3-4]。上述方法中, 增菌培养是重要步骤但耗时长, ELISA方法由于单克隆抗

体费用昂贵, 所以用ELISA盒进行多种食品样品的检测费用较高^[5]。因此, 建立一种快速的样品前处理方法显得尤为重要。免疫磁珠富集技术是以磁性微球通过结合特定抗体, 加到待测样品中与相应抗原结合, 再依靠磁场作用力使所需样品在短时间内得以大量浓缩的技术手段^[6]。由于免疫磁珠富集技术具有快速及特异性强的特点, 目前已广泛应用于分离及浓缩特定微生物、蛋白质等微量有害物质^[7-10]。

本研究运用免疫 *Lm* 的多克隆抗体与磁珠进行偶联制备免疫磁珠, 探讨磁珠与抗体最佳偶联条件, 结合免疫磁珠富集技术与选择性平板培养法, 初步建立免疫磁珠-选择性平板快速检测方案, 对 *Lm* 进行分离及鉴定, 以实

收稿日期: 2014-10-15

基金项目: 上海理工大学大学生卓越工程项目; 上海市科委重点支撑项目 (13430502400)

作者简介: 李婧娟 (1993—), 女, 本科生, 研究方向为食品微生物。

*通信作者: 刘箐 (1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食源性致病菌致病机理及快速检测技术。

现对*Lm*进行快速检测^[11]。同时,利用免疫磁珠富集技术进行病原富集并联合聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术,建立一种快速检测*Lm*的新方法。

1 材料与方 法

1.1 菌株、试剂与仪器

*Lm*菌株(ATCC 43251) 上海慧耘生物科技有限公司。

羧基磁珠(直径0.5 μm) 郑州英诺生物科技有限公司; *Lm*多克隆抗体 上海慧耘生物科技有限公司; 脑心浸液培养基 北京陆桥技术有限公司; 考马斯亮蓝蛋白试剂盒、2-(*N*-吗啉)乙磺酸(2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid, MES)、碳二亚胺(carbodiimide, EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)、*Taq* DNA聚合酶及其他PCR试剂、本实验所用引物根据文献[12]报道,其核苷酸序列为:*hly1*: CGGAGGTTCCGCAAAAGATG; *hly2*: CCTCCAGAGTGATCGATGTT, 试剂及引物合成均为生工生物工程(上海)股份有限公司。

PCR热循环仪 美国应用生物系统公司; SpectraMax M2多功能酶标仪 美国分子仪器公司; Mini-power电泳仪 美国伯乐公司; 全系列离心机德国Eppendorf公司; 磁分离架 郑州英诺生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 羧基磁珠与抗体偶联条件优化

1.2.1.1 磁珠的活化

小瓶摇匀后移取200 μL羧基磁珠至1.5 mL离心管中,用200 μL的去离子水和MES(pH 6.0、0.05 mol/L)各洗2次,然后用0.05 mol/L MES溶液配制100 mg/mL的EDC和NHS溶液,再分别加入100 μL EDC和NHS溶液到洗过的磁珠溶液中充分混合,并在室温条件下振荡45 min,振荡结束,在磁力架上进行磁分离5 min并除去清液,用200 μL 0.05 mol/L MES溶液洗2次,分散在100 μL 0.05 mol/L MES溶液中,4 °C保存^[13-14]。

1.2.1.2 磁珠与抗体最佳偶联温度

取200 μL活化后的磁珠重悬于各离心管中,加入等量的用偶联的缓冲液稀释的500 μL抗体之后经过^[15]: 1) 4 °C包被3 h; 2) 常温条件下包被3 h; 3) 37 °C包被3 h,每个温度设定3个平行。然后在磁力架上磁分离5 min后,吸取上清液于另一离心管中,用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒在595 nm波长处测得OD值,以确定磁珠与抗体最佳偶联温度^[16]。

1.2.1.3 磁珠与抗体最佳偶联时间

取200 μL活化后的磁珠重悬于各离心管中,分别加

入等量的用偶联的缓冲液稀释的300 μL抗体,在37 °C条件下分别偶联0.5、1、2、3、4、6 h,保持磁珠处于均匀悬浮状态,每个时间设定3个平行。用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定OD值,以确定磁珠与抗体的最佳偶联时间^[17]。

1.2.1.4 羧基磁珠与抗体最佳偶联率

取等量1 mg活化后的磁珠,分别加入40、60、80、100、200、400、600、800、1 000 μg的抗体,每组设定3个平行。在37 °C条件下包被1 h后,磁分离取上清溶液,用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定OD值,以确定磁珠与抗体最佳偶联率^[18]。

1.2.2 免疫磁珠(immunomagnetic beads, IMBs)的制备

取200 μL磁珠加入到300 μL抗体中,室温条件下振荡1 h,振荡结束后磁分离5 min并去除上清液,并用含有2%牛血清白蛋白的磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)室温封闭1 h,封闭结束用PBS洗3次,然后分散在200 mL PBS中,保存于4 °C备用^[19]。

1.2.3 IMBs捕获率的确定

用接种环挑去*Lm*单菌落接种于灭菌脑心浸液液体培养基中,37 °C摇床过夜。用无菌生理盐水10倍稀释*Lm*菌液到10⁴。取两份样品,均为100 μL,一份直接涂布于显色培养基上,另一份加到1.5 mL离心管中,加入20 μL免疫磁珠,然后在37 °C条件下孵育1 h,使免疫磁珠处于均匀混合的状态。然后磁分离5 min,弃上清液后用PBS洗3次,悬浮在20 μL PBS中,再涂布于显色培养基上,置于37 °C恒温箱培育20 h,观察并统计平板上的菌落数。

1.2.4 PCR检测

取10倍稀释好的各浓度菌液100 μL,分别加入20 μL免疫磁珠,然后在37 °C条件下孵育1 h,使免疫磁珠处于均匀混合的状态^[20]。然后磁分离5 min,吸走上清液后用PBS洗3次,重悬在20 μL PBS中,75 °C裂解30 min后,*Lm*裂解后DNA会释放出来,15 000 r/min离心15 min,使磁珠完全沉在PCR管底部,取上清液5 μL作模板^[21-22]。将IMBs捕获的细菌进行PCR检测,PCR反应体系为:含Mg²⁺的Buffer(10×) 5 μL, dNTP(各2.5 mmol/L) 2 μL, *Taq* DNA Polymerase(5 U/μL) 0.5 μL,正负引物(10 pmol/μL) 3 μL,模板5 μL,用去离子水补充至50 μL。PCR扩增条件为变性95 °C、20 min,95 °C、30 s,退火55 °C、45 s,延伸72 °C、45 s,35个循环,72 °C、5 min,4 °C保存^[23],并与直接PCR作比较。

2 结果与分析

2.1 羧基磁珠与抗体偶联条件优化

2.1.1 偶联温度优化

活化磁珠在不同温度条件下与抗体偶联,用考马斯亮蓝蛋白试剂盒测得上清中剩余抗体的含量,3次平行结果如表1所示。4℃时磁珠与抗体偶联量为0.218 mg/mL,随着温度的升高,磁珠偶联抗体的量也在不断增加。常温时磁珠与抗体偶联量为0.387 mg/mL,37℃时磁珠偶联抗体量为0.391 mg/mL,此时磁珠偶联抗体量趋于饱和,故选择37℃为最佳偶联温度。

表1 不同温度条件下磁珠与抗体偶联量
Table 1 The concentrations of antibody conjugated to immunomagnetic beads at different temperatures

处理条件	第1次	第2次	第3次	平均值
37℃、3h	0.394	0.387	0.392	0.391
常温、3h	0.389	0.385	0.387	0.387
4℃、3h	0.212	0.210	0.231	0.218

2.1.2 偶联时间优化

活化磁珠与抗体在不同时间内偶联,用考马斯亮蓝蛋白试剂盒测得上清中剩余抗体的OD值,结果如图1所示。当偶联时间在0.5~1h,上清液的OD值快速递减,磁珠和抗体大量偶联,当偶联时间大于1h,上清液的OD值趋于平缓,磁珠偶联抗体已达到饱和。故选择1h为最佳偶联时间。

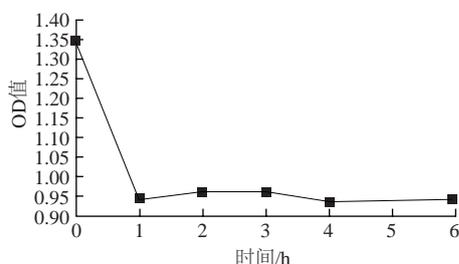


图1 时间对偶联效果的影响

Fig.1 Time course of conjugation between antibody and immunomagnetic beads

2.1.3 羧基磁珠与抗体偶联率优化

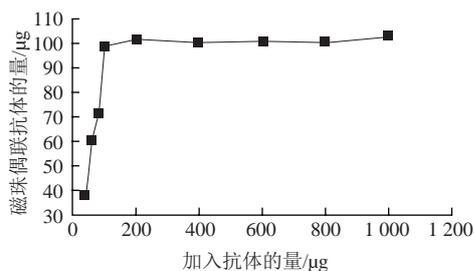


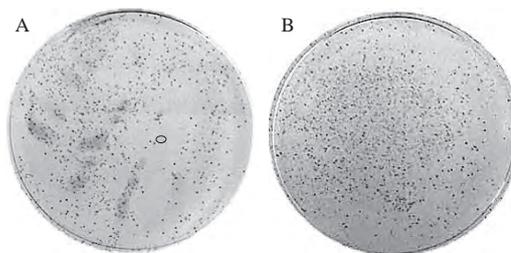
图2 加入抗体量对偶联效果的影响

Fig.2 Effect of antibody concentration on the conjugation to immunomagnetic beads

用1mg的活化磁珠与不同质量的抗体在相同条件下偶联,用考马斯亮蓝蛋白试剂盒测得上清液中剩余抗体含量,结果如图2所示。当加入抗体量在40~100μg时,磁珠偶联抗体的量随加入抗体量的增加而增加,当加入抗体量大于100μg时,磁珠偶联抗体的量趋于饱和,因此1mg羧基磁珠偶联抗体最佳用量为100μg。

2.2 免疫磁珠捕获率

根据平板计数,原*Lm*菌液浓度为 2.2×10^8 CFU/mL,IMBs与稀释到 10^4 的*Lm*菌结合后,观察其在显色平板上的生长情况。如图3所示,A平板是IMBs捕获100μL 10^4 CFU/mL *Lm*菌在显色平板上的生长情况,B平板是100μL 10^4 CFU/mL *Lm*菌在显色平板上的生长情况。图3A显色平板上红色圆环圈住的蓝绿色小点为*Lm*菌,中间连成片的棕色区域为免疫磁珠(颜色图中未显示),IMBs对*Lm*菌的捕获率约为45%,说明IMBs对*Lm*菌体有良好的捕捉能力。

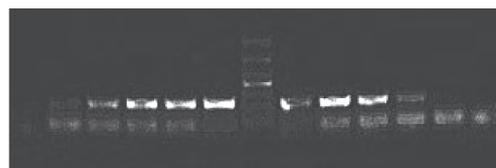


A. 100 μL IMBs捕获 10^4 CFU/mL的*Lm*; B. 100 μL 10^4 CFU/mL的*Lm*。

图3 IMBs捕获*Lm*在显色平板中的生长情况

Fig.3 Growth status of *Lm* captured by IMBs in chromogenic medium

2.3 IMBs捕获*Lm*-PCR检测结果



1 2 3 4 5 M 6 7 8 9
M. Marker; 1~5.免疫磁珠PCR检测结果; 6~9.直接PCR检测结果。

图4 IMBs-PCR和Direct-PCR捕菌效果比较

Fig.4 Comparison of bacterial capture efficiency between IMBs-PCR and direct PCR

由图4可知,6~9号泳道分别是浓度为 $10^8 \sim 10^5$ CFU/mL的*Lm*菌液做直接PCR扩增后的目标条带,直接PCR最低检测限为 10^5 CFU/mL。1~5号泳道分别是浓度为 $10^4 \sim 10^8$ CFU/mL的*Lm*菌液用IMBs捕获后再做PCR扩增后的目标条带,由此可知IMBs-PCR捕捉*Lm*最低检测限可达到 10^4 CFU/mL,即所取的1μL模板中只要有10 CFU *Lm*细菌就能被检测出来,灵敏度是原来的10倍,由此证明用IMBs富集*Lm*可有效提高PCR检测的灵敏度。

3 结论

本实验证明了磁珠与抗体的偶联时间和偶联温度均会对磁珠偶联抗体的含量产生极大影响,在实验中还发现,偶联温度过低不利于磁珠与抗体的结合,低温条件下磁珠容易发生凝聚,抗体活性也比较低,在37℃时偶联效果最好^[18]。制备的免疫磁珠选取37℃条件下均匀振荡1h为最佳包被条件,1mg磁珠偶联抗体的最佳量为100μg,制备出的IMBs捕获率为45%。用IMBs富集*Lm*有效降低PCR对*Lm*的最低检测限,样品中只要有10CFU/mL就能被检测出来,整个检测时间在7h,与传统检测方法相比缩短了10~12h^[23-24]。

免疫磁珠虽广泛,但仍存在一些问题,要想获得大小均匀、粒度适中的磁珠,其制备难度较大^[8]。目前市场上的磁珠价格也比较昂贵,大大限制了免疫磁珠的推广及应用。市场上由于单克隆抗体费用昂贵,目前制备IMBs多使用多克隆抗体,但由于靶细胞表面有多个抗原决定簇,想要用IMBs分离到纯的细胞也比较困难,用不同基团的磁珠制备IMBs结合靶细胞虽可提高细胞分离率,但特异性受到影响^[25]。随着科技的发展,相信目前的问题都能解决,免疫磁珠将会得到更多的推广和运用。

参考文献:

- [1] 丁建英,韩剑众.食品中单增李斯特菌的存在现状及检测方法研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(12):171-174.
- [2] 张加林,杨林娟.单增李斯特菌的食源性污染状况及检测方法[J].医学理论与实践,2012(8):910-911.
- [3] 段霞,黄欣,黄岭芳,等.双抗夹心ELISA方法检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌[J].食品科学,2010,31(24):272-276.
- [4] 张亚爽.LAMP和PCR检测单核细胞增生性李斯特氏菌的研究[D].保定:河北农业大学,2008:4;57.
- [5] 郭桂萍,葛红梅,王匀,等.单增李斯特菌检测技术研究进展[J].中国食物与营养,2011,17(3):12-15.
- [6] 何小曼,曾繁启.免疫磁珠分离技术在微生物学检测中的应用[J].中国生物制品学杂志,2008(11):1030-1032.
- [7] 闫冰,李一松,霍贵成,等.食品中单核细胞增多李斯特菌的快速检测[J].食品工业科技,2006,27(10):202-205.
- [8] 张璇,鲜瑶.免疫磁珠技术及其在食品微生物检测中的应用[J].农产品质量与安全,2011(1):40-43.
- [9] 杨金玲,陈翊平,邹明强,等.超顺纳米磁颗粒在生化分离分析中的研究进展[J].分析测试学报,2013(10):1270-1276.
- [10] 黄小林,许恒毅,熊勇华,等.磁性纳米材料在食源性致病菌分离中应用的研究进展[J].食品科学,2014,35(11):280-285. doi: 10.7506/spkx1002-6630-201411056.
- [11] 刘雅莉,刘箐,刘芳,等.免疫捕捉PCR和直接PCR技术检测单核细胞增生性李斯特菌比较研究[J].食品科学,2012,33(20):243-248.
- [12] 王海艳,刘中学,刘虹,等.食品中单增李斯特菌快速、敏感、特异PCR检测方法的建立[J].检验检疫科学,2006,16(1):3-6.
- [13] 刘辉荣,徐宏,古宏晨,等.简便高效分离细胞新型免疫磁珠制备[J].中国公共卫生,2008,24(11):1349-1351.
- [14] 王海明,俞晓,金燕飞,等.应用磁免疫技术快速检测食源性沙门氏菌方法研究[J].中国卫生监督杂志,2009(1):36-39.
- [15] 王晓闻,杨永莉.免疫磁珠捕获PCR检测牛乳中沙门氏菌的研究[J].山西农业大学学报:自然科学版,2009(4):289-293.
- [16] 王东升,张岩,吕平,等.抗体包被免疫磁珠的研制及其应用[J].细胞与分子免疫学杂志,2001(3):296-297.
- [17] 钟子清,熊勇华,赖卫华,等.纳米免疫磁珠富集单核增生李斯特菌[J].食品科学,2013,24(23):212-215. doi: 10.7506/spkx1002-6630-201323044.
- [18] 徐金亨,李志清,向军俭,等.单增李斯特菌免疫磁珠的制备研究[J].食品工业科技,2012,33(5):323-327.
- [19] 刘燕艳.免疫磁珠-实时荧光PCR联用技术快速检测食品中单增李斯特菌的研究[D].杭州:浙江大学,2014.
- [20] 冯家望,吴小伦,黄云君,等.食品中单核增生性李斯特菌的PCR快速检测研究[J].中国食品卫生杂志,2005(3):234-237.
- [21] 张辉,崔焕忠,何昭阳.应用PCR检测单核细胞增生性李斯特氏菌[J].中国兽医杂志,2007(9):76-77.
- [22] 徐伟,刘军,李素芳.单增李斯特菌与志贺氏菌多重PCR检测技术的建立[J].中国食品学报,2009,9(1):201-207.
- [23] 闻一鸣.应用特异性免疫磁珠快速检测单增李斯特菌[D].广州:暨南大学,2013.
- [24] 王海艳,刘中学,刘虹,等.食品中单增李斯特菌快速、敏感、特异PCR检测方法的建立[J].检验检疫科学,2006(1):3-6.
- [25] 于露,孙秀兰.免疫磁珠技术研究进展[J].粮食与油脂,2011(10):17-19.