

论著

# 用免疫生物传感器快速检测金黄色葡萄球菌的初步研究

魏玲<sup>1</sup> 武会娟<sup>1</sup> 伦永志<sup>2</sup> 李宝明<sup>1</sup> 高丽娟<sup>1</sup> 张小莉<sup>1</sup> 亢子佳<sup>1</sup>

(1. 北京市理化分析测试中心,北京 100094; 2. 大连大学医学院,辽宁 大连 116622)

**摘要:**目的 研究快速、经济、高灵敏的金黄色葡萄球菌新型检测技术。方法 本研究应用 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 酶旋转分子马达和免疫技术相结合,建立金黄色葡萄球菌的免疫生物传感器快速检测技术。首先 pH 变化敏感的荧光物质 F1300 标记到 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 酶的载体色素体的内表面,然后在 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 酶上连接 β 亚基抗体-生物素-链亲和素-生物素-金葡菌抗体复合体,得到可以捕获金黄色葡萄球菌的免疫生物传感器。传感器上负载菌量不同,引起的酶活性变化不同,酶活性变化又引起色素体内 pH 变化,最后通过 F1300 的荧光强度变化来检测菌量。结果 该方法对金黄色葡萄球菌标准菌株(CMCC26003)的检测时间为 4.5 h,10<sup>2</sup> ~ 10<sup>4</sup> CFU/孔呈现良好的梯度关系。结论 该技术耗时短、操作简单、成本低、灵敏度高,符合食品安全检测技术发展要求。

**关键词:**金黄色葡萄球菌;免疫生物传感器;检测

中图分类号:TP212.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)06-0498-04

## An Immunobiosensor for Rapid Detection of *Staphylococcus aureus*

WEI Ling, WU Hui-juan, LUN Yong-zhi, LI Bao-ming, GAO Li-juan, ZHANG Xiao-li, KANG Zi-jia  
(Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100094, China)

**Abstract: Objective** To develop a highly sensitive, low-cost and rapid assay method for the detection of *Staphylococcus aureus*. **Method** Combining F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase molecular motor with immunotechnology to establish a rapidly technology for detecting *Staphylococcus aureus*. F1300 is a fluorescence indicator sensitive to the change of pH. F1300 was labeled first on the inner surface of chromatophore, which is the carrier of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase. A complex of *Staphylococcus aureus* antibody-biotin-streptavidin-biotin-β subunit monoclonal antibody was then connected to the β subunit of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase to construct an immunobiosensor; then the *Staphylococcus aureus* can be captured by the antibody anchored on the complex. The activity of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase changed with the content of *Staphylococcus aureus* loaded on the biosensor. The fluorescence of tagged F1300 was relative to the change of pH induced by the variation of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase activities. **Results**

The time taken by this examination was only 4.5 h and a favorable gradient was shown at 10<sup>2</sup> - 10<sup>4</sup> CFU/well.

**Conclusion** The method was time saving in examination, simple, low-cost and sensitive and met the requirements of detecting technology.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; Immunobiosensor; Detection

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (以下简称金葡菌)是最常见的细菌性食物中毒病原之一,该菌在自然界中无处不在,空气、水、灰尘及人和动物的排泄物中都可找到,食品受其污染的机会很多。国家标准关于食品卫生微生物学检验中规定,食品中金葡菌不得检出。近年来,金葡菌污染已成为国际卫生问题。美国疾病控制中心报告显示金葡

菌引起的感染占第 2 位。在加拿大由其引起的食物中毒占整个细菌性食物中毒的 45%。2006 年,尼日利亚的 Oluwafemi 和 Simisaye<sup>[1]</sup>对本地零售香肠进行检测,结果表明金葡菌的污染率为 10<sup>5</sup> ~ 10<sup>6</sup> CFU/g。2005 至 2009 年,我国每年都发生由金葡菌污染引发的集体食物中毒事件<sup>[2-5]</sup>。

目前,国标中对金葡菌的检测方法包括微生物法和 ELISA 法。微生物法耗时长,操作繁琐。ELISA 方法所耗时间相对较短,但其操作技巧性强,关键点的控制对结果影响大,检出限高达 10<sup>6</sup> CFU/L。聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 为国标法外研究的最成熟的金葡菌检测方法,PCR 法所需的试剂昂贵,整个检测需要经过特定引物设计、增菌, DNA 的制备, PCR 扩增、检测等复杂

收稿日期:2010-06-22

基金项目:科技部创新方法工作专项(2008IM021600);北京市科学技术研究院创新团队支持(IG200905N)

作者简介:魏玲,女,硕士,研究实习员,研究方向为生物传感器快速检测技术 E-mail: weilingscnu@126.com

通信作者:武会娟,女,博士,助理研究员,研究方向为生物传感器应用 E-mail: sunnywhj@126.com.cn

步骤。由于该方法极其敏感,外源性 DNA、试验条件控制不当、引物的设计及靶序列的选择等均会影响实验结果。另外,国内外研究人员正在研究表面等离子体共振 (SPR) 技术、毛细管区带电泳 (CZE) 检测技术等在金葡菌检测中的应用。这些技术比传统微生物法快速,比 PCR 法简单,但是需要贵重仪器,且检出限高,一般为  $10^5 \sim 10^6$  CFU/ml<sup>[6-7]</sup>。快速、高灵敏、高特异性的检测技术研究意义重大。

本研究应用高灵敏生物传感器  $F_0F_1$ -ATP 酶检测致病菌。 $F_0F_1$ -ATP 酶是一旋转分子马达,它既能利用跨膜  $H^+$  梯度合成 ATP,又能水解 ATP 而反向转运  $H^+$ 。在 ATP 合成过程中,质子能够从色素体膜内泵到膜外侧,导致内膜微环境溶液  $H^+$  浓度变化。研究发现,在  $F_0F_1$ -ATP 酶上连接负载会不同程度影响其旋转性能,在其  $\beta$  亚基上连接上一抗或二抗能引起质子转运速率的改变<sup>[8]</sup>。基于以上两理论,本研究在  $F_0F_1$ -ATP 酶上负载不同浓度的标准菌液,以 pH 敏感的荧光探针的荧光强度作为信号反应负载程度,进而达到检测目的<sup>[9]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

链亲和素、生物素、ADP (美国 Sigma 公司);金葡菌单克隆抗体 (英国 abcam 公司);金葡菌标准菌株 CMCC26003 (广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心);荧光探针 F1300 (美国 Invitrogen 公司);其他试剂为国产分析纯。荧光扫描仪 (美国 Thermo 公司);96 孔酶标板 (美国 Corning 公司);营养肉汤培养基 (北京陆桥生物技术有限公司)。

### 1.2 标准菌株的培养、计数及浓度梯度的制备

营养肉汤中  $37^\circ\text{C}$  培养金葡菌 24 h,菌液进行  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  稀释,取  $100\ \mu\text{l}$  涂板,每个稀释梯度做 3 个平行,24 h 培养后计数。剩余菌液  $80^\circ\text{C}$  水浴 1 h 灭活,混匀后取  $10\ \text{ml}$ , $4^\circ\text{C}$   $4\ 000\ \text{r/min}$ ,离心 30 min,弃上清,沉淀用无菌生理盐水恢复到原体

积。重复 2 次,去除培养基中复杂成分。第 3 次离心沉淀无菌生理盐水重悬至原体积备用。

### 1.3 色素体的制备

在  $60^\circ\text{C}$  高温摇床培养嗜热菌,高温菌属 *Thermomicrobium* 24 h, $4^\circ\text{C}$   $4\ 000\ \text{r/min}$  离心 30 min,弃上清,收集的沉淀用 pH8.0 Tris-HCl 缓冲液重悬, $4^\circ\text{C}$   $6\ 000\ \text{r/min}$  离心 10 min,收集清洗后的菌体进行超声破碎后, $4^\circ\text{C}$   $10\ 000\ \text{r/min}$  离心 5 min,上清液再进行  $4^\circ\text{C}$   $40\ 000\ \text{r/min}$  超速离心 1 h,沉淀用 pH8.0 Tris-HCl 缓冲液悬浮,得到色素体。其结构示意图见图 1。所得色素体于 20% 甘油,  $-20^\circ\text{C}$  冻存,备用。

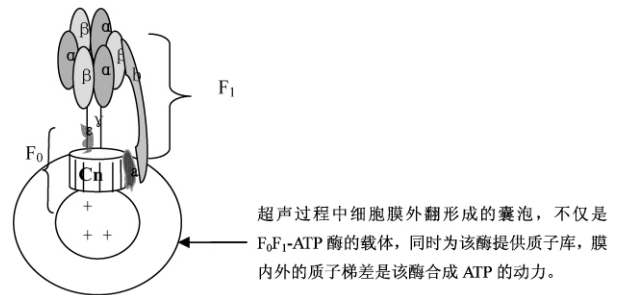


图 1 色素体结构示意图

### 1.4 F1300 单方向标记色素体及标记后水解活性测定

取色素体悬液  $600\ \mu\text{l}$ ,  $12\ 000\ \text{r/min}$  离心 30 min 去甘油,沉淀用 pH6.0 缓冲液 (0.1 mmol/L tricine, 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 5 mmol/L KCl) 悬浮,加入  $1 \sim 2\ \mu\text{l}$  质量浓度为  $1\ \text{mg/ml}$  的 F1300 混匀,冰浴中超声 3 min。然后, $4^\circ\text{C}$   $12\ 000\ \text{r/min}$  离心 30 min, pH8.0 缓冲液悬浮沉淀,重复 4 次,后 3 次离心时间为 15 min,其他条件不变,去除游离 F1300。最终得到标记好的色素体 (以下简称 F1300-ch),制备示意图见图 2。F1300-ch 的 ATP 水解活性测定采用酶偶联法,通过检测 NADH 在  $340\ \text{nm}$  波长处的吸光度变化来测定  $F_0F_1$ -ATPase 水解活力<sup>[10]</sup>。1 个酶活单位定义为每毫克色素体每分钟内可水解  $1\ \mu\text{mol}$  ATP。

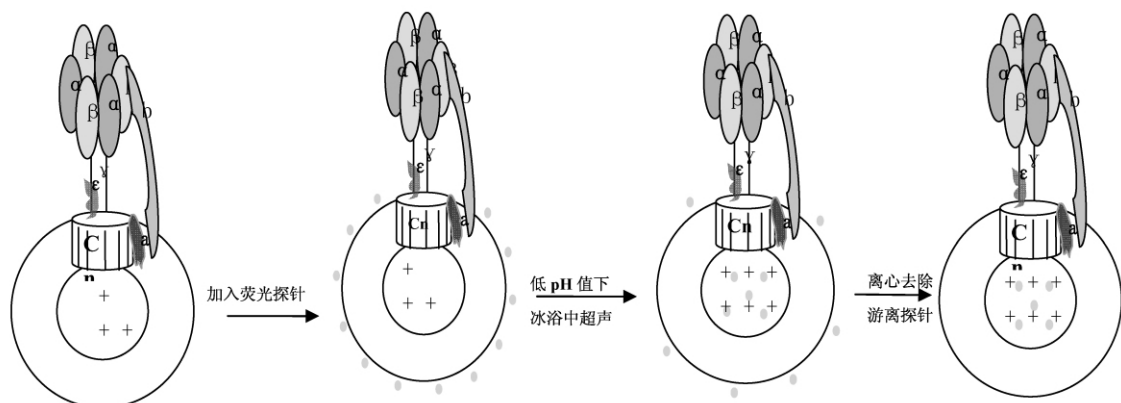


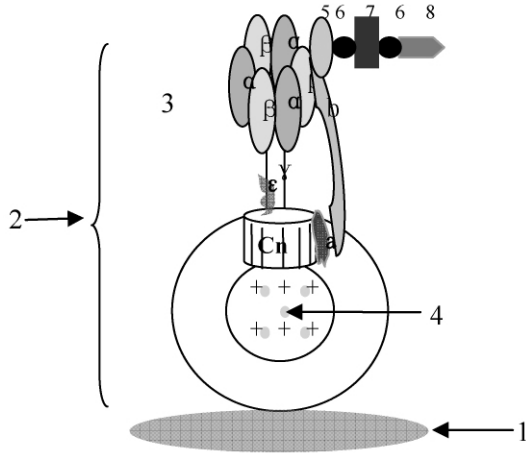
图 2 F1300 单方向标记色素体示意图

### 1.5 捕获体系的构建

等体积等摩尔浓度混合  $\beta$  单抗 ( $F_0F_1$ -ATP 酶  $\beta$  亚基的单抗)-生物素和金葡菌单抗-生物素 2 个复合体,震荡混匀,再加入相同体积的 1.1 倍摩尔浓度的链亲和素,室温 15 ~ 30 min。得到  $\beta$  单抗-生物素-链亲和素-生物素-金葡菌单抗捕获复合体。

### 1.6 免疫生物传感器的构建

捕获复合体与 F1300-ch,按体积比 4:1 混匀,60 r/min,37 °C 孵育 1 h,得到可以捕获检测目标的生物传感器,结构示意图见图 3。



注:1. 酶标孔;2. 膜上负载有  $F_0F_1$ -ATP 酶的色素体;3.  $F_0F_1$ -ATP 酶;4. pH 敏感荧光探针 F1300;5.  $F_0F_1$ -ATP 酶  $\beta$  亚基单抗;6. 生物素;7. 链亲和素;8. 金葡菌抗体。

图 3 基于  $F_0F_1$ -ATP 酶的生物传感器的模型示意图

### 1.7 金葡菌的捕获和荧光扫描仪检测

每个酶标孔加入 50  $\mu$ l 1.6 制备的生物传感器,再加入 20  $\mu$ l 灭活菌液,菌液浓度分别为  $5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^5$  CFU/ml,其对应的每孔细菌数分别为  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  CFU/孔;对照组加入等体积无菌生理盐水。37 °C 孵育 30 min,捕获金葡菌。每孔再加入 70  $\mu$ l 终浓度为 2 mmol/L ADP 的 ATP 合成缓冲液 (50 mmol/L tricine pH8.0、10% 丙三醇、5 mmol/L  $NaH_2PO_4$ 、5 mmol/L  $MgCl_2$ ) 启动 ATP 合成反应,45 °C 温浴 15 min 后进行检测,选择激发波长 485 nm、发射波长 538 nm。

## 2 结果

### 2.1 菌液计数结果

$10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  倍 3 个梯度稀释菌液菌落均数分别为 143、91 和 16。原始菌液浓度为  $1.5425 \times 10^8$  CFU/ml。稀释菌液得到  $5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^5$  CFU/ml 3 组梯度。

### 2.2 F1300-ch 活性测定

F1300-ch 上负载的  $F_0F_1$ -ATP 酶水解活性结果见图 4,酶活性单位为  $42.56 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。

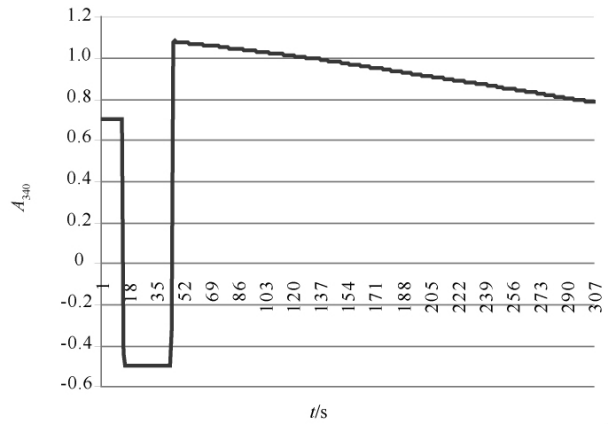


图 4 F1300-活性测定结果

### 2.3 金葡菌梯度菌液的荧光检测结果

实验组每组菌量为  $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$  CFU/孔。以浓度为横坐标,相对荧光值为纵坐标,建立浓度与荧光值的相关性曲线,结果见图 5。

随着浓度增加,荧光值逐渐下降。利用 SPSS 10.0 软件对数据进行方差齐性检验,  $F = 2.407$ ,  $P = 0.083$ ,结果表明方差齐且均一性很好。LSD 分析结果显示,空白对照组与  $10^4$  CFU/孔组存在显著性差异,  $P = 0.036$ ,具有统计学意义。

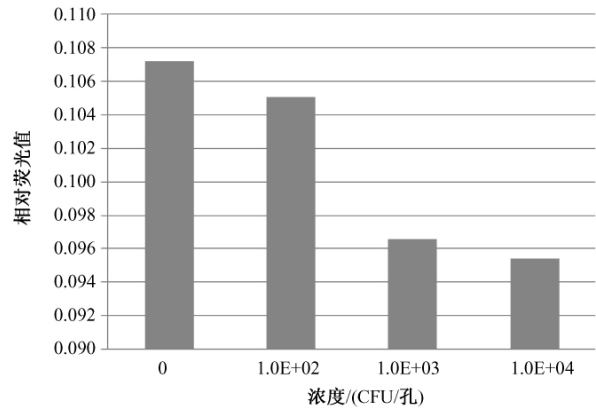


图 5 不同菌量负载的传感器荧光检测结果

## 3 讨论

金葡菌新型检测技术是当今国内外研究热点。陈彬等<sup>[11]</sup>研究了 Accuprobe 基因探针方法在金葡菌快速检测技术中的应用,检出限为  $10^7$  CFU/ml。Rajkovic 等<sup>[12]</sup>建立了实时免疫定量 PCR 技术检测金葡菌外毒素 B (*Staphylococcus aureus* enterotoxin B, SEB) 的方法,该方法比 ELISA 法大约灵敏 1 000 倍 ( $< 10 \text{ pg/ml}$ )。CHEN Lingli 等<sup>[13]</sup>用不同免疫标记的高分子免疫磁珠对混合菌液中的金葡菌及 SPA 进行分离,生理生化鉴定分离菌, MALDI-TOF/MS 质谱分析 SPA 技术只能在金葡菌浓度达到  $10^6$  CFU/ml 才能检出。Balasubramanian<sup>[14]</sup>建立了以金葡菌的溶菌噬菌体作为识别元件,以 SPREETA 为

检测平台的新型检测技术,该技术的检出限为 $10^4$  CFU/ml。美国的 Subramanian<sup>[6]</sup>用单硫醇和双硫醇修饰金表面,然后连接抗金葡菌抗体,金葡菌被捕获后,用 SPR(表面等离子共振)技术检测,该方法的检出限为 $10^5$  CFU/ml。GAO Peng 等<sup>[7]</sup>用特异性抗体化的乳胶和毛细管区域电泳(CZE)联合技术建立了从细菌混合物中快速分离、鉴定金葡菌的新方法,检出限为 $9.0 \times 10^5$  CFU/ml。

免疫生物传感器在金葡菌检测中的应用研究,尚未见报道。本研究组对 $F_0F_1$ -ATP酶免疫生物传感器在金葡菌检测中的应用研究表明, $10^2 \sim 10^4$  CFU/孔时,免疫生物传感器快速检测技术对金黄色葡萄球菌标准菌(CMCC 26003)的检测呈现良好的梯度性,且空白对照组与 $10^4$  CFU/孔存在显著性差异, $P=0.036$ ,具有统计学意义。

该技术耗时短,包括增菌液处理、生物传感器制备、加样、检测4个步骤,所需时间分别为2、1.75、0.5、0.25 h,共计4.5 h。该方法具有如下优点:①操作步骤简单,包括样品前增菌、增菌液处理、传感器制备、加样、检测5个步骤。②每批次可以检测多个样品;③所需试剂均为实验室常规试剂,可节约检测成本。

与目前国际上其他新型的金葡菌检测技术研究一样,本研究选择金葡菌标准菌株为对象,对生物传感器在金葡菌快速检测应用进行了初步研究。此外,本课题组还进行了本方法对肠杆菌科细菌、其他致病菌的特异性研究,初步结果显示出本方法对样品中常见的大肠杆菌和沙门菌的特异性良好,进一步的工作还在进行中。我们还用本方法对单核细胞增生李斯特菌和 O157:H7 进行了特异性研究,均表现出很好的梯度性。但是,最终方法的建立还需要进一步开展大量实际样品检测研究。另外,还可以选择新型荧光材料以提高检测的灵敏度和准确度<sup>[15-17]</sup>。由于实际样品基质复杂,为减少基质成分干扰,提高样品增菌液目标菌的纯度和浓度,在样品检测研究中可以考虑利用免疫磁珠富集技术<sup>[18]</sup>。方法建立之后,还需要进行生物传感器高稳定性和高寿命研究等大量工作。该技术还可以推广到食品中农药残留等其他有毒有害物质和疾病标志物的检测,从而进一步涉及食品检测、环境监测、医疗保健、疾病诊断的各个领域。

## 参考文献

[1] OLUWAFEMI F, SIMISAYE M T. Extent of microbial contamination of sausages sold in two Nigerian cities[J]. AJBR, 2006, 9(2):133-136.

[2] 邢素琴,曲桂娟,于慧霞.一起由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒的调查分析[J].医学动物防治,2006,22(2):155-156.

[3] 贾煦,毛新武.一起由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒分析[J].热带医学杂志,2008,1(8):71-72.

[4] 孙晓冰,艾丽艳,巴蕾,等.一起由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件调查[J].职业与健康,2008,24(13):1268-1272.

[5] 贾彬,施彩虹,朱玲.一起由金黄色葡萄球菌污染豆制品引起食物中毒调查及实验研究[J].中外医疗,2009,28(18):149.

[6] SUBRAMANIAN A, IRUDAYARAJ J, RYANC T. Mono and dithiol surfaces on surface plasmon resonance biosensors for detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Sens Actuators B, 2006, 114(1):192-198.

[7] GAO Peng, XU Guowang, SHI Xianzhe, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by a combination of monoclonal antibody-coated latex and capillary electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2006, 27(9):1784-1789.

[8] CUI Yuanbo, ZHANG Fan, YUE Jiachang, et al. Detecting proton flux across chromatophores driven by  $F_0F_1$ -ATPase using N-( fluorescein-5-thiocarbonyl )-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt [J]. Anal Biochem, 2005, 344(1):102-107.

[9] 武会娟,魏玲,刘清珺,等.纳米生物传感器在氯霉素检测中的应用[J].食品科学,2010,31(8):167-170.

[10] LIU Xiaolong, ZHANG Yun, YUE Jiachang, et al.  $F_0F_1$ -ATPase as biosensor to detect single virus [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(4):1319-1322.

[11] 陈彬,黄晓蓉,汤敏英,等.基因探针法快速检测食品中金黄色葡萄球菌的研究[J].现代预防医学,2007,34(6):1017-1021.

[12] RAJKOVIC A, EI MOUALIJ B, UYTENDAELE M, et al. Immunoquantitative real-time PCR for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in foods [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(10):6593-6599.

[13] CHEN Lingli, DENG Le, LIU Linlin, et al. Immunomagnetic separation and MS/SPR end-detection combined procedure for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and protein A [J]. Biosens Bioelectron, 2007, 22(7):1487-1492.

[14] BALASUBRAMANIAN S, SOROKULOVA I B, VODYANOV V J, et al. Lytic phage as a specific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus*: A surface plasmon resonance spectroscopic study [J]. Biosens Bioelectron, 2007, 22(6):948-955.

[15] TANG Zhiyong, KOTOV N A, GIERSIG M. Spontaneous organization of single CdTe nanoparticles into luminescent nanowires [J]. Science, 2002, 297(5579):237-240.

[16] WU Xingyong, LIU Hongjian, LIU Jianquan, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(1):41-46.

[17] CHAN W C W, NIE Shuming. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection [J]. Science, 1998, 281(5385):2016-2018.

[18] YANG Hua, QU Liangwei, WIMBROW A N, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR [J]. Int J Food Microbiol 2007, 118(2):132-138.