

特定细菌的磁性凝集分离法

解 宇

(丸兴工业株式会社 藤泽市 日本)

摘 要 介绍一种对细菌进行直接分离的新模式,以大肠杆菌的分离为例,使用从磁性细菌体内提取的纳米磁珠,在纳米磁珠表面联上大肠杆菌抗体后制成磁性大肠杆菌抗体,以此来结合、凝集并分离细菌混合液中的大肠杆菌。结果表明标本溶液中添加 $80\mu\text{g}$ 的磁性大肠杆菌抗体,可对 10^5 个大肠杆菌进行凝集和分离,处理后标本溶液中其他细菌的浓度无变化。利用此项技术可以快速凝集和分离细菌混合液中的特定细菌。

关键词 磁性抗体 磁性凝集 直接分离 特定细菌

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2004)01-0119-03

磁性细菌(Magnetotactic bacteria)多为厌氧的螺旋状菌,长约数 μm ,呈革兰氏阴性,有沿着磁力线朝 N 极或 S 极泳动的趋磁性,在含有铁离子的培养液中常温常压及厌氧环境下可以大量繁殖;磁性细菌体内有 10 ~ 20 颗粒径为 50nm ~ 100nm 的磁珠排列其中,各磁珠表面自然覆盖着一层厚度约为 4nm 的生物膜,生物膜的主要成分为磷脂酰乙醇胺^[1,2]。

对于特定细菌的分离,一般采用先对标本溶液进行菌落培养,再选择特定细菌的菌落分离法,分离周期较长。本文介绍一种新型的细菌分离模式,使用从磁性细菌体内提取的纳米磁珠,利用此磁珠表面自然覆盖着生物膜且生物膜易于进行化学修饰的特性^[1-5],将大肠杆菌抗体接种固定于磁珠表面生物膜,制成磁性大肠杆菌抗体,以此来结合、凝集并分离细菌混合液中的大肠杆菌,并对磁性大肠杆菌抗体对大肠杆菌的分离能力进行了定量。

1 材料和方法

1.1 试剂和培养基

试剂 Sulfo-LC-SPDP {Sulfosuccinimidyl, 6[3']-(2-pyridylidithio)propionamido hexanoate}及 Sulfo-SMCC{Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate}从 Pierce Chemical Co.(Rockford, North America)购入。大肠杆菌抗体(Mouse anti-*Escherichia coli* monoclonal antibody)从 Wataribio 公司(日本东京)购入。

实验中使用两种琼脂平板培养基。一种为添加青霉素的甘露醇 NaCl 培养基,适合耐青霉素葡萄球菌的培养。另一种为脱氧胆酸盐培养基,专用于大肠杆菌的分离培养。各培养基参照医学会制定的有关微生物培养检查法中推荐的配方及配制法制作^[6]。

1.2 磁珠的提取和磁性抗体的合成

从海底淤泥中采取的磁性细菌标本(MBI株)经实验室培养后,高浓度的磁性细菌溶液通过数次高压限域(最终回直径 150nm)滤过处理挤碎菌体,从菌体内分离出来的磁珠用外磁场进行回收,经超声波洗净后以 1mg/mL 的浓度低温(4℃)保存于 PBS(pH7.4)溶液中。磁珠回收用的外磁场为尺寸约 2cm × 2cm × 1cm 的普通 Sm-Co 的磁石。

磁性抗体的合成是将磁珠表面生物膜的氨基与抗体的氨基连接起来形成一体^[1,2]。具体步骤为(1) Sulfo-SMCC 0.06mg 加入 1mL 浓度为 1mg/mL 的大肠杆菌抗体溶液中,混合均匀后室温反应 2h。(2) 将 Sulfo-LC-SPDP 1.2mg 加入 2mL 浓度为 1mg/mL 的磁珠 PBS 溶液中,混合均匀后室温反应 2h。反应完成后用外磁场进行回收,保存于 1.0mL PBS 溶液中。(3) 经过 Sulfo-LC-SPDP 处理后的磁珠溶液 1.0mL,加入 2mL 浓度为 20mmol/L 的 DTIC(Dithiothreitol)溶液中,混匀后室温反应 1h。反应完成后用外磁场进行回收,然后将回收物加入经 2h 反应的 Sulfo-SMCC 与大肠杆菌抗体的溶液中,混匀后低温(4℃)反应 12h。反应完成后用外磁场进行回收,经 PBS 溶液洗净后,形成的磁性大肠杆菌抗体低温(4℃)保存于 PBS 溶液中。

使用 FITC(Fluorescein isothiocyanate)标识的大肠杆菌抗体,对接种固定在磁珠表面该大肠杆菌抗体进行发光量测定,结果表明大肠杆菌抗体的接种固定量为 $152\mu\text{g}/\text{mg}$ 磁珠。

1.3 实验方法

使用实验室培养的大肠杆菌 JM105、耐青霉素葡萄球菌 MS276。在加入了大肠杆菌与葡萄球菌的蒸馏水溶液(各细菌浓度分别为 10^5 个/mL)1mL 中添加一定量的磁性大肠杆菌抗体,混合均匀,室温 10min 反应后,将结合了靶细菌的磁

性大肠杆菌抗体用外磁场进行磁性诱导 ,凝集后固定于容器壁上(图 1),取出无磁性的溶液成分,分别使用添加青霉素的甘露醇 NaCl 培养基(此培养基中大肠杆菌菌落无法生长)及大肠杆菌专用培养基进行平板培养,参照医学会制定的有关微生物培养检查法中介绍的稀释法及菌落计数法^[6],查明磁性固定后无磁性的溶液中葡萄球菌及大肠杆菌数量。

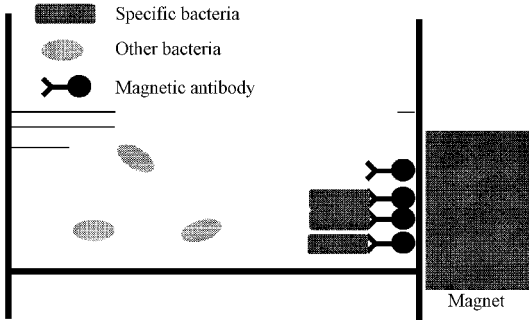


图 1 特定细菌的磁性凝集分离
Fig.1 The magnetic agglutination and detachment of specific bacteria

作为对照,取出了全部溶液成分后的磁性凝集体在原容器内经 PBS 溶液洗净后,加入 0.2mol/L Glycine-HCl 缓冲液 (pH2.5)至 1mL,超声波分散处理后,分别使用添加青霉素的甘露醇 NaCl 培养基及大肠杆菌专用培养基进行平板培养,查明其中细菌的种类。

2 结果

以图 1 所示的方法对标本溶液进行磁性凝集、固定后,无磁性的标本溶液中各细菌数量如图 2 所示。结果表明,使用 80μg 的磁性大肠杆菌抗体,可对 10⁵ 个大肠杆菌进行凝集和固定,处理后标本溶液中葡萄球菌的数量无变化。对照组中,磁性凝集体分散处理后培养的结果,未检查出葡萄球菌,大肠杆菌数量的变化与图 2 呈相反形式。

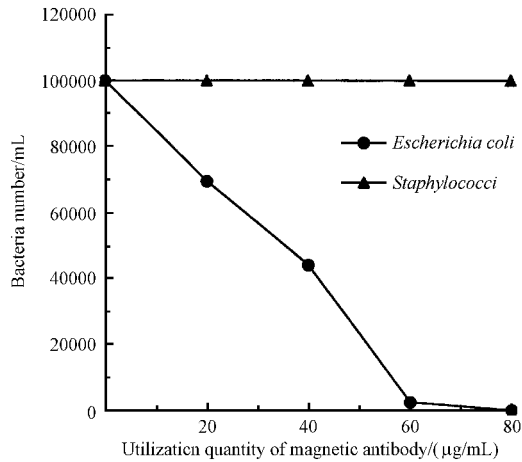


图 2 磁性抗体对目标细菌的分离结果

Fig.2 Detachment of target bacteria by using magnetic antibody

3 讨论

磁性细菌由来的磁珠作为一种纳米新材料,磁珠表面生物膜经化学修饰后作为目标抗原的磁性分离用载体,在抗体^[1]、癌胚抗原^[2]、胰岛素^[3]、DNA^[4,5]的分离及高敏感度检测等的应用中获得成功。本研究结果表明,磁性大肠杆菌抗体具有靶向性结合大肠杆菌的能力,使用磁性大肠杆菌抗体 80μg,通过外磁场诱导,可对细菌混合液中 10⁵ 个大肠杆菌进行快速磁性凝集和分离,且对细菌混合液中其他的细菌无明显影响。

在医疗临床的细菌培养和药敏实验检查中,从开放性与半开放性创面及病灶采取的标本,经常有大肠杆菌等数种非病原性杂菌存在,非病原性杂菌的混在,对低浓度病原菌的培养及早期检测产生明显的影响^[6]。在食品制造领域中,添加了拮抗菌、发酵菌的标本,受高浓度拮抗菌、发酵菌的影响,污染菌的早期检测和早期发现非常困难。对此,可考虑使用磁性抗体先对标本中的非病原性杂菌、拮抗菌或发酵菌进行磁性分离,进行标本的检测前处理。另外,在以特定细菌的分离及检测为目标的工业领域中,使用本文所提案的方法,能够对标本中已知的或存在可能性较大的细菌进行快速凝集与分离。

利用磁性细菌由来的磁珠表面覆盖着生物膜的特点,可将各种抗体接种固定于其表面作为一种备用试剂,通过外磁场控制磁性抗体,可以进行特定细菌的磁性凝集、固定与分离。

参 考 文 献

[1] Matsunaga T, Kawasaki M, Xie Y, et al. Chemiluminescence enzyme immunoassay using bacterial magnetic particles. *Anal Chem*, 1996, **68**(20): 3551 - 3554.

[2] 解 宇. 使用磁性细菌粒子分离浓缩和检测癌胚抗原. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, **23**(20): 159 - 160.

[3] Tanaka T, Matsunaga T. Fully automated chemiluminescence immunoassay of insulin using antibody-protein a-bacterial magnetic particle complexes. *Anal Chem*, 2000, **72**(15): 3518 - 3522.

[4] Yoza B, Matsumoto M, Matsunaga T. DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound. *J Biotechnol*, 2002, **94**(3): 217 - 224.

[5] Yoza B, Arakaki A, Matsunaga T. DNA extraction using modified bacterial magnetic particles modified with hyperbranched poly-amidoamine dendrimer. *J Biotechnol*, 2003, **101**(3): 219 - 228.

[6] 岗田 淳. 细菌检查法. 东京: 医齿药出版社, 2002, 339 - 441.

Magnetic Agglutination and Detachment of Specific Bacteria

XIE Yu*

(Maruko and Limited Company , Fujisawa , Japan)

Abstract :This is an introduction to a newly developed bacteria direct detachment method , which can be applied to *Escherichia coli* and other similar specific bacteria. In this method , magnetic particles are extracted from magnetotactic bacteria and immobilized onto anti-*Escherichia coli* antibody , producing magnetic anti-*Escherichia coli* antibody. On this basis , *Escherichia coli* can be combined , agglutinated and detached from mixture via external magnetic control. With this method , an injection of 80μg magnetic anti-*Escherichia coli* can agglutinate and detach 10⁵ cells of *Escherichia coli* while leaving the density of other bacteria unchanged. This technology makes possible quick agglutination and detachment of specific bacteria from mixture.

Key words :Magnetic antibody , Magnetic agglutination , Direct detachment , Specific bacteria

* Corresponding author. Tel 86-466442261 ;Fax 81-466467191 ;E-mail :Kai-U@maruko.co.jp

Received date :04-15-2003

科技论文中常见的一些格式

参照《中国科学院自然科学期刊编排格式规范》、国家标准 GB7713 – 87 和《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》的要求 ,对本刊经常遇到的一些格式暂作如下规定 :

正体与斜体

- 1. 物种的学名 :菌株的属、种用拉丁文斜体 ,属的首字母大字 ,其余小写 ,属以上用拉丁文正体。病毒一律正体 ,首字母大写。
- 2. 限制性内切酶 :内切酶前 3 个字母用斜体 ,后面的字母和编码正体平排 ,如 *Bam*H I ,*Hind* III ,*Pst* I ,*Sau*3A I 等。
- 3. 氨基酸和碱基的缩写 :氨基酸缩写用 3 个字母表示时 ,仅第一个字母大写 ,其余为小写 ,全部正体 ;用单字母表示时为大写正体。碱基缩写均为大写正体。
- 4. 质粒和载体 :质粒一律用正体 ,首字母 P 为小写 ,后面字母和数码平排 ,如 pBR322、pGBKT-ipaB 等。

计 量 单 位

计量单位和单位符号以国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。

- 1. 时间 :日(天)用 d ,小时用 h ,分钟用 min ,秒用 s 等 ,单位符号均用英文小写正体。
- 2. 溶液浓度 :溶液浓度用 mol/L 表示 ,而不用 M 或 N。
- 3. 旋转速率 :单位符号为 r/min ,而不用 rpm。
- 4. 生物大分子的分子量 :蛋白质用 kD ,核酸用 bp 或 kb。
- 5. 光密度 :光密度符号用斜体表示 ,如 *OD* ,*OD*₆₀₀ 等。
- 6. 图表中数值的量和单位 :用量与单位的比值表示数值 ,即物理量符号(斜体)与单位(正体)之间用斜线隔开 ,如 t/h(时间 ,单位是小时)。
- 7. 有些数值带的计量单位不能省略 ,如 30cm × 0.5cm 不可写成 30 × 0.5cm。