

炭疽杆菌检测方法的研究现状与展望

刘炬, 徐俊杰*, 陈薇*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要:炭疽是严重威胁人类健康的烈性传染病, 其病原体为炭疽芽孢杆菌。炭疽芽孢杆菌在我国公布的《人间传染的病原微生物名录》中被列为第二类病原微生物(高致病性病原微生物), 其芽孢可作为生物战剂和生物恐怖的原材料, 因此, 发展灵敏、高效的炭疽杆菌检测方法十分重要和紧迫。按检测的靶标分类, 针对炭疽杆菌的检测方法主要有四大类: 针对炭疽杆菌芽孢的检测方法, 针对细菌繁殖体的检测方法, 针对炭疽杆菌基因的检测方法和针对炭疽毒素蛋白的检测方法。其中, 针对炭疽杆菌芽孢和细菌繁殖体的检测已经有比较成熟的方法, 但其在特异性以及临床的实用性方面难以令人满意; 针对炭疽杆菌基因的检测技术在特异性和灵敏度上有较大的提高, 但在临床诊断等方面还有欠缺; 而针对炭疽毒素蛋白的检测技术的发展, 使得直接对炭疽杆菌的主要致病因子的检测成为可能, 这对于临床诊断以及流行病学研究具有重要意义。本文对当前炭疽杆菌检测方法的最新进展做了简要的归纳, 关注了不同检测方法的适用范围和检测能力, 并展望了相关领域的发展趋势, 希望能为从事炭疽杆菌检测方法研究的同行提供参考和帮助。

关键词:炭疽, 炭疽芽孢杆菌, 检测, 芽孢, 毒素

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 07-0809-07

1 炭疽芽孢杆菌

炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 为革兰氏阳性菌, 是烈性传染病炭疽的病原体, 在我国 2006 年 1 月 11 日下发的《人间传染的病原微生物名录》中被列为第二类病原微生物(高致病性病原微生物)。炭疽芽孢杆菌的完整毒株包括 pXO1 和 pXO2 两个质粒, 二者分别含有炭疽芽孢杆菌的两类重要毒力因子——炭疽毒素和抗吞噬的荚膜多肽的编码基因^[1]。炭疽毒素, 是一类 AB 型复合毒素, 包含三种蛋白——致死因子(LF), 具有金属蛋白酶的活性,

能够切割 MAPKK 蛋白家族的多种蛋白; 水肿因子(EF), 具有腺苷酸环化酶的活性; 保护性抗原(PA), 能够与细胞表面的受体特异性结合, 同时也与 LF 或 EF 结合, 将它们带入胞内。这三种组分中的任何一种都不能单独产生毒性作用, 但 PA + LF(LT, 致死毒素) 和 PA + EF(ET, 水肿毒素) 的组合形式则会对宿主产生极大的伤害^[1]。

当生存环境恶化时, 比如离开宿主进入土壤, 炭疽杆菌就会形成芽孢, 芽孢对恶劣环境具有极强的抵抗能力, 可存活数十年。当被摄入动物体内时, 芽孢通常会利用吞噬细胞作为载体, 抵达淋巴结, 萌发、增殖, 并最终被释放到血液之中, 导致严重的菌

基金项目: 国家自然科学基金 (81025018)

* 通信作者。Tel: +86-10-66948692, E-mail: xujunjie@sina.com (徐俊杰), E-mail: cw789661@yahoo.com (陈薇)

作者简介: 刘炬(1987-), 男, 河北徐水人, 硕士研究生, 从事微生物学研究。E-mail: liujuh06@yahoo.com

收稿日期: 2011-12-10; 修回日期: 2012-04-23

血症。而到此阶段时,常规的治疗手段,如抗生素治疗已经难以保护患者——大量的细菌及其产生的大量毒素已足以对宿主造成巨大的损伤^[2]。由此可见,及时有效的诊断治疗对于炭疽的防治具有至关重要的作用。

另外,由于存活时间长、易于制备、易于散布等特性,炭疽芽孢成为非常理想的生物战剂和生物恐怖的原材料。2011年美国的炭疽邮件事件进一步表明炭疽恐怖威胁的现实存在。因此,对于环境样本和诸如“白色粉末”等特殊样本的有效检测手段也是必不可少的。

2 当前的主要检测手段

作为一种危害极大的病原微生物,针对炭疽杆菌的检测手段的开发一直受到研究者的重视。近年来随着生物技术的快速发展,新的检测技术层出不穷。归纳起来,目前针对炭疽杆菌的检测方法主

要有以下几类(见表1):(1)基于芽孢的检测方法;(2)基于细菌繁殖体的检测方法;(3)基于基因的检测方法;(4)基于毒素蛋白的检测方法。

2.1 基于芽孢的检测方法

对炭疽杆菌芽孢的有效检测是应对可能的生物战及生物恐怖袭击的必需手段,针对可能被污染的土壤、空气、水源等的有效检测,以及针对可疑物品如“白色粉末”的有效分析,对于规避可能的伤害和损失有着至关重要的作用。因此,针对炭疽杆菌芽孢的检测,特别是对强毒株芽孢的检测,一直受到相关研究者的重视。

目前,针对芽孢的检测手段主要是利用芽孢的物理特性、芽孢的标志物或者其抗体或配体。

芽孢,作为有形的物质,存在着其独特的物理性质,利用这些性质,就可以完成对其检测。比如 Melissa 等人利用芽孢的高温裂解物在电场中的迁移率对芽孢进行分型,可以成功地对含 10^3 级别的芽孢、体积为数微升的样品进行分析^[3]。

表 1 几种主要的炭疽杆菌检测方法

Table 1 List of several detection methods of *Bacillus anthracis*

Methods	Targets	LOD ^a	TC ^b	Reference
Fluorescence detection targeting DPA	spore	10^1 spores/mL	nd + 20 sec	[7]
Laser analysis based on short peptide ligands	spore	34 spores/ reaction	35 min	[12]
Electrochemical analysis based on the lysis of specific phage-infected bacteria	Vegetative Cell	10^1 cells/mL	8 h	[13]
Multiplex q PCR	gene	less than 10 copies/reaction	nd	[21]
LAMP	gene	1000 copies/reaction	several h + 90 min	[22]
Multiplex PCR-suspension Array	gene	1.6 ng/ reaction	1 h + 0.5 h	[43]
PNA probe	gene	10 zmol/ reaction	nd	[27]
Immunoassay based on antibody and Europium nanoparticles	PA	0.01 ng/mL	nd	[30]
Electrochemical analysis based on short peptide ligands	PA	0.03 ng/mL	nd	[32]
Mass Spectrometry based on the enzyme activity of LF	LF	0.05 ng/mL	4 h	[35]
Mass Spectrometry based on the enzyme activity of LF	LF	0.005 ng/mL	20h	[36]

a. LOD, limit of detection.

b. TC, time consuming, described in two forms: A + B, or T. A means the time costed by sample processing; B means the time costed by detection alone; T means the time costed by both. The abbreviation “nd” means “no description”.

DPA (dipicolinic acid, 2,6-吡啶二羧酸), 作为芽孢中必不可少的成分,常用来作为标志物进行分析。比如 Morgan 等人利用 DPA 形成的 [Tb (DO2A) (DPA)]⁻ 络合物的光学特性, Steven 等人以及 Xiaoyu Zhang 等人分别利用表面增强的拉曼光谱 (SERS) 技术,都实现了对芽孢的检测^[4-6]。Wan-Kyu 等人则利用修饰的多聚纳米颗粒对 DPA 进行荧光分析,并实现了相当低的检测下限(相当于每毫升样品中只有几个芽孢)^[7]。

当然 DPA 并不是唯一可用的标志物。如 Marco Tamborrini 等人利用单克隆抗体对芽孢表面的低聚糖进行分析,同样可以对样品中的芽孢进行检测^[8]。Rongzhang Hao 等人也利用了单克隆抗体来检测芽孢,不过,他们是利用 QCM (quartzcrystal microbalance, 石英晶体微天平) 来检测抗体与芽孢结合后产生的频率变化^[11]。

除了抗体以外,一些简单的配体也受到了研究者的关注。如 David D. Williams 等人利用噬菌体展

示技术筛选到特异性的短肽,并将其用于芽孢的荧光检测分析^[9]。Park 等人也利用基于短肽和荧光技术的荧光量子点 (Peptide-Quantum Dot Conjugates) 对芽孢进行检测^[10]。利用短肽和对激光透射强度的测量, Ghanashyam Acharya 等人实现了灵敏度相当高的芽孢检测^[12]。

针对芽孢的检测方法非常多,这里只是列举出几种有代表性的方法。通过归纳可以看到,这类技术或是灵敏度低,或是需要特殊的仪器设备,适应性差,更普遍的问题是特异性的要求难以达到。如果想据此得到灵敏高效的检测技术的话,需要做的工作还有很多。

2.2 基于细菌繁殖体的检测方法

除了针对芽孢进行检测外,对炭疽杆菌繁殖体的检测也是重要而且有效的手段。其中,最常规的是经典微生物学方法。事实上,对于芽孢的检测,也包括这类方法,但考虑到最终的检测指标通常为菌落的形态、或是菌体的染色等,因此将该方法归类于此。

以蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 为模型, Miri Yemini 等人研究了基于噬菌体的炭疽杆菌检测方法:利用特异性的噬菌体使炭疽杆菌繁殖体裂解,得以通过电化学方法测量 CME (cell-marker enzyme) 的活性,从而可以检测到有活力的(亦即真正有威胁的)炭疽杆菌^[13]。Dian-Bing Wang 等人利用一种更优的单克隆抗体——其靶标 (EAI protein) 在炭疽杆菌的芽孢和繁殖体都存在,能够实现对于炭疽杆菌的芽孢和繁殖体的有效检测^[14]。同样是利用噬菌体, Schofield DA 等人将发光的标记物送入细菌体内,实现了对细菌的检测^[15]。

可能是由直接对炭疽杆菌繁殖体进行操作的危险度和复杂度所限,针对繁殖体的检测方法的研究并不像针对芽孢的方法研究得那么深入和广泛。但 Miri Yemini 等人的观点^[13]告诉我们,要想更加准确地估计炭疽杆菌的威胁,针对其活菌的检测可能还是需要的。

2.3 基于基因的检测方法

事实上,由于各种细菌的芽孢的相似性,以及细菌繁殖体本身标志物的相似性,炭疽杆菌检测的特异性都难以令人满意,基于基因的检测技术则可以比较好的解决这个问题。这一类方法主要有基于 PCR 及其各种改进型的技术,基因探针技术,芯片

技术等。

在 20 世纪末到 21 世纪初,很多研究者利用 PCR 或 RT-PCR 技术对炭疽杆菌或其芽孢进行检测,只要靶点选择合适,引物设计合理,就可以得到不错的结果^{[17] -20 [42]}。比如 William Hurtle 等人能够在 20 μL 体系中检测到 100 fg 左右的基因组 DNA,相当于 20 - 30 个拷贝数^[16]。荣光华等人利用实时定量 PCR 技术也可以达到类似的水平^[41]。而利用 Multiplex real-time PCR 技术, DIngar Janse 等人实现了更加灵敏的检测^[21]。

随着 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 技术的发展, Ben Hatano 等人尝试了将其应用于炭疽杆菌的检测,尽管污染的可能性更大,从而条件控制的要求实际比 PCR 更严格,但他们在一个反应体系内 (25 μL) 能够检测到大约 1000 个拷贝,显示了该项技术的潜力^[22]。

芯片技术作为常用的检测工具,在检测炭疽杆菌基因组的应用中,也占有着一席之地。如文海燕等人建立的基于悬浮芯片技术的多重检测方法,可以将炭疽芽孢杆菌作为检测目标之一^[43]。

探针技术也是特异性检测炭疽杆菌基因组的有效手段之一。Alonso Castro 和 Richard T. Okinaka 利用 PNA (peptide nucleic acid) 探针和荧光检测技术,能够检测到 0.5 fM 炭疽杆菌的基因组^[23]。Ning Zhang 和 Daniel H. Appella 利用 PNA 探针开发的色度检测方法能够实现更加灵敏的检测^[27]。Sudeshna Pal 等人 and Deng Zhang 等人利用 pagA (PA 的基因) 的探针和磁性纳米颗粒分别设计了针对炭疽检测的生物传感器,其中 Sudeshna Pal 等人设计的传感器中的纳米颗粒可以通电激发磁性,而 Deng Zhang 等人的设计则是带磁性的纳米颗粒直接由 DNA 探针包被,均实现了对 pagA 的灵敏检测,特别是后者,达到 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的分辨率^{[25] [26]}。另外, Rong-Zhang Hao 等在他们原来针对芽孢的 QCM 系统^[11]的基础上,又设计了基于 DNA 探针的 QCM 传感器,检测下限可达 3.5×10^2 CFU/mL (CFU, colony forming unit, 菌落形成单位)^[26]。

总之,基于基因的检测方法大多灵敏度较高,只要条件控制合理,特异性也能达到比较理想的状态,因此受到许多研究者的青睐。

2.4 基于毒素蛋白的检测方法

作为毒血症的作用因子,毒素蛋白同样可以作

为炭疽杆菌检测的靶标。通常被选作待检靶标的毒素蛋白是 PA 或 LF:一方面,细菌表达 PA 的量较其他毒素蛋白要高;另一方面,有研究表明,针对 LF 的抗体在炭疽患者体内出现较早,从而暗示 LF 可能较早地被细菌表达^[40]。

对于 PA 的检测,主要是利用其抗体、受体或配体保证特异性。比如 Robert Mabry 等人,分别基于 PA 的抗体和细胞表面受体(ATR2,即 CMG2),用夹心酶联免疫分析(Sandwich ELISA)对 PA 进行检测,发现通过他们所用的抗体,能使检测下限低至 1 ng/ml 以下^[28]。Shi-Hua Wang 等人通过人工构建的抗体,利用原子力显微镜(AFM, atomic force microscopy)也达到了同样的检测水平^[29]。Shixing Tang 等人利用抗体夹心和铂纳米颗粒进行免疫荧光分析,大大提高了检测的灵敏度^[30]。另外,特异性结合 PA 的短肽也受到了研究者的关注。Tran Ngoc Huan 等人利用噬菌体展示技术筛选找到对 PA 高亲和的特异性的短肽,并将其应用于 PA 的检测,能够实现和利用 PA 抗体进行检测相当的水平^[31-32]。Lakshmi N. Cella 等人则是用 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 技术筛选单链 DNA 作为配体,通过电学手段,实现了对 PA 的检测^[33]。Byul Nim Oh 等人也尝试了利用 PA 的 DNA 配体和荧光技术对 PA 进行检测^[34]。

虽然针对 PA 的检测技术在不断进步,但也有研究者指出,尽管 PA 的检测下限不断降低,但目前对于患病的人或动物,还是只能在晚期的时候(比如 DBA/2J 小鼠出现了可观察到的水肿症状)才能检测到 PA 的存在^[28,30]。

而针对 LF 的检测,除了使用抗体,还可以利用 PA 特异性结合 LF 的能力或者 LF 的酶活性。

Robert Mabry 等人就借助 PA 使用夹心 ELISA 对 LF 进行检测,检测下限可达 20 ng/mL 以下^[28]。虽然灵敏度与实际的需求尚有一定距离,但仍然为炭疽杆菌的检测方法研究提供了思路。

事实上,LF 具有金属蛋白酶的活性,如果将其加以利用,再加上酶联放大等技术,就有可能以更简单的方法达到好的检测效果。Capek P 等人就利用毒素的酶活性切割噬菌体与基质的连接物(即底物),通过定量 PCR 技术检测切下的噬菌体的量,从而对毒素进行定量^[37]。Michael 等人则是将设计的

底物与离子通道相连,利用电学方法,对 LF 进行检测^[38]。Anne 等人利用 LF 酶活性和质谱技术,可以检测低至 0.05 ng/mL 的 LF,而且在 0.05 - 400 ng/mL 的范围内都能实现良好的线性^[35],而后 Kuklenyik 和 Anne 等人还进一步降低了检测下限^[36],其唯一的缺点就在于需要利用质谱仪器等复杂的设备。Karine Bagramyan 和 Markus Kalkum 利用 LF 抗体和设计的荧光分子底物开发了称为 ALISSA (assay with a large immuno-sorbent surface area) 的方法,能够检测到大约 10^{-4} ng/mL 的 LF^[39]。可见,在没有采用质谱设备等复杂仪器的情况下,利用 LF 的酶活性就能达到与前者大致相当的检测水平,体现了这类方法的发展潜力。

考虑到 LF 作为炭疽毒素中重要的杀伤成分以及在感染建立过程中发挥的作用^[2],针对 LF 的灵敏高效的检测手段可能对于炭疽的诊断和治疗有着重要的意义。

3 小结和展望

由于芽孢和细菌本身的性质所决定,直接以它们为靶标的检测技术在特异性、灵敏度等方面已经难以获得突破性的进展。虽然应用比较复杂的仪器设备可能能够部分地解决一些问题,如提高灵敏度,但由此带来的复杂度及费用方面的提升却又难以避免。而且尽管在细菌学上具有重大的意义,但在炭疽的防治中,这类检测技术已经逐渐被基因检测技术以及毒素检测技术所取代。

由于基因技术的发展,基于基因的检测方法已经可以达到比较理想的效果,特别是在针对环境中炭疽病原体的检测方面,这类技术以其灵敏高效的特点具有很大的优势。同样,在炭疽防治方面,基于毒素蛋白的检测方法也有其优势。一方面,毒素直接与炭疽杆菌的活力和致病性相关,使得这类方法更加直接有效,而且对发展基于毒素蛋白的检测方法来说,可供选择的技术方法比较广;另一方面,对毒素蛋白的检测对于炭疽的治疗也有指导意义,因为在接受抗生素治疗后,患者体内的细菌可能已被清除,但存在的毒素蛋白仍可能是致命的。

总之,可以预计,在炭疽杆菌检测方法的研究中,作为生物反恐和环境监测的重要手段,基于基因的检测技术将会进一步受到重视和得到发展;而在

临床诊治中,基于毒素的检测技术则可能更受研究者的青睐。

参考文献

- [1] Tournier J, Quesnel-Hellmann A, Cleret A, Vidal DR. Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax. *Cellular Microbiology*, 2007, 9(3):555-565.
- [2] Tournier J, Paccani SR, Quesnel-Hellmann A, Baldari CT. Anthrax toxins: A weapon to systematically dismantle the host immune defenses. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009, 30:456-466.
- [3] Krebs MD, Mansfield B, Yip P, Cohen SJ, Sonenshein AL, Hitt BA, Davis CE. Novel technology for rapid species-specific detection of Bacillus spores. *Biomolecular Engineering*, 2006, 23:119-127.
- [4] Cable ML, Kirby JP, Sorasaene K, Gray HB, Ponce A. Bacterial Spore Detection by $[Tb^{3+}$ (macrocycle) (dipicolinate)] Luminescence. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129:1474-1475.
- [5] Bell SEJ, Mackle JN, Sirimuthu NMS. Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy of dipicolinic acid—towards rapid anthrax endospore detection. *Analyst*, 2005, 130:545-549.
- [6] Zhang X, Young MA, Lyandres O, Duyne RPV. Rapid Detection of an Anthrax Biomarker by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(12):4484-4489.
- [7] Oh W, Jeong YS, Song J, Jang J. Fluorescent europium-modified polymer nanoparticles for rapid and sensitive anthrax sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 29:172-177.
- [8] Tamborini M, Holzer M, Seeberger PH, Schurch N, Pluschke G. Anthrax Spore Detection by a Luminex Assay Based on Monoclonal Antibodies That Recognize Anthrax-Containing Oligosaccharides. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010, 17(9):1446-1451.
- [9] Williams DD, Benedek O, Turnbough CL Jr. Species-Specific Peptide Ligands for the Detection of Bacillus anthracis Spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10):6288-6293.
- [10] Park, Jung T, Park JP, Seo G, Chai YG. Rapid and Accurate Detection of Bacillus anthracis Spores Using Peptide-Quantum Dot Conjugates. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 16(11):1713-1719.
- [11] Hao R, Wang D, Zhang X, Zuo G, Wei H, Yang R, Zhang Z, Cheng Z, Guo Y, Cui Z, Zhou Y. Rapid detection of Bacillus anthracis using monoclonal antibody functionalized QCM sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24:1330-1335.
- [12] Acharya G, Doorneweerd DD, Chang C, Henne WA, Low PS, Savran CA. Label-Free Optical Detection of Anthrax-Causing Spores. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(4):732-733.
- [13] Yemini M, Levi Y, Yagil E, Rishpon J. Specific electrochemical phage sensing for Bacillus cereus and Mycobacterium smegmatis. *Bioelectrochemistry*, 2007, 70:180-184.
- [14] Wang D, Yang R, Zhang Z, and Bi L, You X, Wei H, Zhou Y, Yu Z, Zhang X. Detection of B. anthracis Spores and Vegetative Cells with the Same Monoclonal Antibodies. *PLoS ONE*, 2009, 4(11).
- [15] Schofield DA, Molineux IJ, Westwater C. 'Bioluminescent' Reporter Phage for the Detection of Category A Bacterial Pathogens. *The Journal of Visualized Experiments*, Jul 8; (53), e2740, DOI: 10.3791/2740 (2011).
- [16] Hurtle W, Bode E, Kulesh DA, Kaplan RS, Garrison J, Bridge D, House M, Frye MS, Loveless B, Norwood D. Detection of the Bacillus anthracis gyrA Gene by Using a Minor Groove Binder Probe. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(1):179-185.
- [17] Bell CA, Uhl JR, Hadfield TL, David JC, Meyer RF, Smith TF, Cockerill III FR. Detection of Bacillus anthracis DNA by LightCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(8):2897-2902.
- [18] Makino S, Cheun HI, Watarai M, Uchida I, Takeshi K. Detection of anthrax spores from the air by real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 2001, 33:237-240.
- [19] Levine SM, Perez-Perez G, Olivares A, Yee H, Hanna BA, Blaser MJ. PCR-Based Detection of Bacillus anthracis in Formalin-Fixed Tissue from a Patient Receiving Ciprofloxacin. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(11):4360-4362.
- [20] Makino S, Iinuma-Okada Y, Maruyama T, Ezaki T, Sasakawa C, Yoshikawa M. Direct Detection of Bacillus anthracis DNA in Animals by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31(3):547-551.
- [21] Janse I, Hamidjaja RA, Bok JM, Rotterdam BJV. Reliable detection of Bacillus anthracis, Francisella tularensis and Yersinia pestis by using multiplex qPCR

- including internal controls for nucleic acid extraction and amplification. *BMC Microbiology*, 2010, 10:314.
- [22] Hatano B, Maki T, Obara T, Fukumoto H, Hagisawa K, Matsushita Y, Okutani A, Bazartseren B, Inoue Satoshi, Sata T, Katano H. LAMP Using a Disposable Pocket Warmer for Anthrax Detection, a Highly Mobile and Reliable Method for Anti-Bioterrorism. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2010, 63:36-40.
- [23] Castro A, Okinaka RT. Ultrasensitive, direct detection of a specific DNA sequence of *Bacillus anthracis* in solution. *Analyst*. 2000, 125:9-11.
- [24] Pal S, Alocilja EC. Electrically active magnetic nanoparticles as novel concentrator and electrochemical redox transducer in *Bacillus anthracis* DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26:1624-1630.
- [25] Zhang D, Huarng MC, Alocilja EC. A multiplex nanoparticle-based bio-barcoded DNA sensor for the simultaneous detection of multiple pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26:1736-1742.
- [26] Hao R, Song H, Zuo G, Yang R, Wei H, Wang D, Cui Z, Zhang Z, Cheng Z, Zhang X. DNA probe functionalized QCM biosensor based on gold nanoparticle amplification for *Bacillus anthracis* detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26:3398-3404.
- [27] Zhang N, Appella DH. Colorimetric Detection of Anthrax DNA with a Peptide Nucleic Acid Sandwich-Hybridization Assay. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129 (27):8424-8425.
- [28] Mabry R, Brasky K, Geiger R, Carrion Jr R, Hubbard GB, Leppla Stephen, Patterson JL, Georgiou G, Iverson BL. Detection of Anthrax Toxin in the Serum of Animals Infected with *Bacillus anthracis* by Using Engineered Immunoassays. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2006, 13 (6):671-677.
- [29] Wang S, Zhang J, Zhang Z, Zhou Y, Yang R, Chen J, Guo Y, You F, Zhang X. Construction of Single Chain Variable Fragment (ScFv) and BiscFv-Alkaline Phosphatase Fusion Protein for Detection of *Bacillus anthracis*. *Analytical Chemistry*, 2006, 78 (4):997-1004.
- [30] Tang S, Moayeri M, Chen Z, Harma H, Zhao J, Hu H, Purcell RH, Leppla SH, Hewlett IK. Detection of Anthrax Toxin by an Ultrasensitive Immunoassay Using Europium Nanoparticles. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2009, 16 (3):408-413.
- [31] Huan TN, Ha VTT, Hung LQ, Yoon MY, Han S, Chung H. Square wave voltammetric detection of Anthrax utilizing a peptide for selective recognition of a protein biomarker. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 25:469-474.
- [32] Huan TN, Ganesh T, Han S, Yoon M, Chung H. Sensitive detection of an Anthrax biomarker using a glassy carbon electrode with a consecutively immobilized layer of polyaniline/carbon nanotube/peptide. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26:4227-4230.
- [33] Cella LN, Sanchez P, Zhong W, Myung NV, Chen W, Mulchandani A. Nano Aptasensor for Protective Antigen Toxin of Anthrax. *Analytical Chemistry*, 2010, 82 (5):2042-2047.
- [34] Oh BN, Lee S, Park H, Baeg J, Yoon M, Kim J. Sensitive fluorescence assay of anthrax protective antigen with two new DNA aptamers and their binding properties. *Analyst*, 2011, 136 (16):3384-3388.
- [35] Boyer AE, Quinn CP, Woolfitt AR, Pirkle JL, McWilliams LG, Stamey KL, Bagarozzi DA, Hart Jr. JC, Barr JR. Detection and Quantification of Anthrax Lethal Factor in Serum by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2007, 79 (22):8463-8470.
- [36] Kuklenyik Z, Boyer AE, Lins R, Quinn CP, Gallegos-Candela M, Woolfitt A, Pirkle JL, Barr JR. Comparison of MALDI-TOF-MS and HPLC-ESI-MS/MS for Endopeptidase Activity-Based Quantification of Anthrax Lethal Factor in Serum. *Analytical Chemistry*, 2011, 83 (5):1760-1765.
- [37] Capek P, Kirkconnell KS, Dickerson TJ. A bacteriophage-based platform for rapid trace detection of proteases. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132 (38):13126-13128.
- [38] Macrae MX, Blake S, Jiang X, Capone R, Estes DJ, Mayer M, Yang J. A Semi-Synthetic Ion Channel Platform for Detection of Phosphatase and Protease Activity. *ACS Nano*, 2009, 3 (11):3567-3580.
- [39] Bagramyan K, Kalkum M. Ultrasensitive Detection of Botulinum Neurotoxins and Anthrax Lethal Factor in Biological Samples by ALISSA. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 739:23-36.
- [40] Brennehan KE, Doganay M, Akmal Arya, Goldman S, Galloway DR, Mateczun AJ, Cross AS, Baillie LW. The early humoral immuneresponse to *Bacillus anthracis* toxins in patients infected with cutaneous anthrax. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2011, 62:164-172.

- [41] 荣光华, 夏懿, 朱诗应, 童一民, 戚中田. 炭疽芽胞杆菌染色体特异序列的筛选及实时定量检测. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46(6):900-905.
- [42] 曲识, 史清海, 何宁, 陈永胜, 周蕾, 郭兆彪, 周冬生, 翟俊辉, 杨瑞馥. 定量 PCR 快速检测炭疽芽胞杆菌的实验研究. 军事医学科学院院刊 (*Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*). 2010, 34(3):275-279.
- [43] 文海燕, 王静, 刘衡川, 杨宇, 胡孔新, 孙肖红. 五种生物恐怖细菌基因悬浮芯片多重检测方法的建立. 四川大学学报(医学版) (*Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*). 2009, 40(2):325-329.

Present status and prospects for the Detection of *Bacillus anthracis* –A review

Ju Liu, JunJie Xu^{*}, Wei Chen^{*}

State Key Laboratory of Pathogen and Bio-security, Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Abstract: Anthrax, as a fulminating infectious disease, threatens human's health seriously. *Bacillus anthracis*, the agent of anthrax, was classified into the second kinds of pathogenic microorganisms (one kind of the highly pathogenic microorganism) in the *List of Human Pathogenic Microorganisms* issued by the Chinese government. The spores formed by *B. anthracis* are potential material for biological warfare agent and biological terror. Therefore, it is very important and pressing to develop sensitive, efficient detection methods for the bacteria. For detection methods of *B. anthracis*, there are four types of targets: spores, vegetative cells, genes and anthrax toxin proteins. Among them, detection methods targeting spores and vegetative cells are developed. However, owing to disadvantages in specificity and clinical practicality, these methods are far from satisfaction. Detection methods targeting genes of *B. anthracis* are satisfactory in specificity and sensitivity, while it is short in clinical diagnosis. At the same time, the development of detection methods targeting anthrax toxin makes it possible to acquire information about main causative agent directly, which brings about great help in clinical diagnosis as well as epidemiology research. Herein, we summarized briefly detection methods of *B. anthracis* developed currently, investigated their application ranges and detection capacity, and discussed the development trend of related research, expecting favoring the profession developing detection methods of *B. anthracis*.

Keywords: Anthrax, *Bacillus anthracis*, Detection, Spore, Toxin

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81025018)

^{*} Corresponding authors. Tel: +86-10-66948692; E-mail: xujunjie@sina.com (JunJie Xu); E-mail: cw789661@yahoo.com (Wei Chen)

Received: 10 December 2011 / Revised: 23 April 2012