

基于单克隆抗体的多元弧菌流式细胞术 检测技术的研究

林海英¹ 马振宁¹ 郑允权² 郭养浩^{1,2} 唐凤翔^{2*}

(1. 福州大学 药物生物技术研究所以 福建 福州 350002)

(2. 福建省医疗器械与医药技术重点实验室 福建 福州 350002)

摘要: 【目的】建立一种基于单克隆抗体的多元弧菌流式细胞仪检测技术。【方法】以副溶血弧菌表面蛋白 r-OmpW 的单克隆抗体(mAb)为基础,以细胞染色率为指标优化流式细胞仪检测副溶血弧菌时所需 mAb 的反应浓度和反应时间。通过菌落数对比评价在优化条件下流式细胞术方法的准确度、检出限和精密度。根据所建立的流式细胞术平台分析鉴定单抗对其它 5 种多元弧菌的特异性。【结果】流式细胞仪检测副溶血弧菌时所需 r-OmpW 单克隆抗体的优化反应浓度为 20 mg/L,反应时间为 60 min。当菌浓在 10^4 – 10^7 cells /mL 范围时,检测值可信度较高,可特异性识别 5 种病原弧菌。对含不同菌体浓度的样品进行重复检测,变异系数均在 7%以内。【结论】所建立的这种基于单克隆抗体的多元弧菌流式细胞仪检测技术可快速准确地检测多种病原弧菌。

关键词: 单克隆抗体,多元弧菌,流式细胞术

A flow cytometry method for detecting multi-vibrios using anti-OmpW monoclonal antibody

LIN Hai-Ying¹ MA Zhen-Ning¹ ZHENG Yun-Quan² GUO Yang-Hao^{1,2}
TANG Feng-Xiang^{2*}

(1. Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Bioengineering, Fuzhou University,
Fuzhou, Fujian 350002, China)

基金项目:福建省科技厅重点项目(No. 2009N4002);福建省科技厅计划重点项目(No. 2010N0014)

*通讯作者: Tel: 86-591-83720772; Fax: 86-591-83720772; 信箱: haiylin@163.com

收稿日期: 2011-11-21; 接受日期: 2012-02-27

(2. Fujian Key Laboratory of Medical Instrumentation and Pharmaceutical Technology, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: [Objective] To establish the flow cytometry (FCM) method for detecting multi-vibrio based on anti-OmpW monoclonal antibody. **[Methods]** With the rate of cell staining as an indicator, optimize the reacted conditions of anti-OmpW mAb concentration and reaction time for detecting *Vibrio parahaemolyticus* by flow cytometry. Evaluate the accuracy, detection limits and precision of flow cytometry by comparing the number of bacteria calculated by FCM with that in the culture. Based on the above flow cytometry method, analyze and identify the mAb specificity to the five vibrios. **[Results]** The optimized mAb concentration was 20 mg/L, and the optimized reaction time of mAb was 60min when *Vibrio parahaemolyticus* was detected by flow cytometry. The FCM method could provide high reliability which could specifically recognize the five vibrios in the appropriate cell concentration of 10^4-10^7 cells/mL. To detect different cell concentration samples repeatedly, the coefficient of variation was less than 7%. **[Conclusion]** The established flow cytometry method based on anti-OmpW mAb could quickly and accurately detect multiple vibrios.

Keywords: Monoclonal antibody, Multi-Vibrio, Flow cytometry

弧菌属细菌是海水水产动物的重要致病菌,也是引起人类肠道疾病的主要病原之一^[1]。目前,国内外已经报道的弧菌病原主要有副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*, Vp)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*, Va)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*, Vh)、创伤弧菌(*V. vulnificus*, Vv)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*, Van)等^[1-2]。

病原弧菌的检测在水产养殖病害的调查和防治、水产品卫生质量检验以及保护公众健康等方面都具有十分重要的意义^[3-6]。近十几年,病原弧菌的检测技术已由传统的生理生化检测方法发展到以免疫学和分子生物学为基础的检测技术,检测目标菌也从一种菌向多种菌发展^[7-9]。

流式细胞术(Flow cytometry, FCM),是一种高效率的细胞分析技术。待测细胞悬液样品经特异性荧光单克隆抗体或荧光染料染色后,与鞘液流中的细胞依次逐个通过检测区,结合于细胞上的荧光指示剂受激光激发而发射荧光,数据处理系统对荧光信息和散射光信号进行分析。采

用单克隆抗体可以高特异性地识别单一抗原决定簇,应用单克隆抗体可建立起结果稳定、快速的检测方法,在病原菌的鉴定方面具有广泛的应用前景。

本文采用自行制备的副溶血弧菌表面蛋白r-OmpW的单克隆抗体(mAb),探讨流式细胞仪检测弧菌时所需mAb的最优反应浓度和反应时间,并评价在优化条件下流式细胞术方法的准确度、检出限和精密度,以及对其它5种多元弧菌的特异性,以此为依据建立一种基于单抗的多元弧菌流式细胞仪检测技术,国内外未见报道。

1 材料与方 法

1.1 材料

副溶血弧菌(Vp 1.1997)、创伤弧菌(Vv 1.1758, 无荚膜)、创伤弧菌(Vv FJ03-X2, 有荚膜^[3])由福建省出入境检验检疫局惠赠;溶藻弧菌(Va 1.1587)、哈维氏弧菌(Vh 1.1593)、鳃弧菌(Van SM)由中国科学院青岛海洋研究所惠赠;嗜水气单胞菌、温

和气单胞菌、荧光假单胞菌等为本研究所保存菌株;单克隆抗体 S5C10 由本研究所自行制备;羊抗鼠 IgG-FITC 购于中杉金桥生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞仪检测参数设定:流式细胞仪检测参数的设定值:前向散射光(FSC):100/75;侧向散射光(SSC):460/100;荧光信号(FL1)电压/增益:560/5.0。

1.2.2 mAb 反应浓度的优化:无菌生理盐水稀释副溶血弧菌菌悬液至 5×10^5 cells/mL,于每只离心管中加入 1 mL, 10 000 r/min 冷冻离心 5 min, 弃上清。1 mL 0.1 mol/L PBS (pH 7.2)重悬菌体沉淀,每管分别加入 mAb 至终浓度为 2.5、5、10、20 和 40 mg/L, 轻微振荡反应 60 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重复洗涤 2 次。每管加过量的羊抗鼠二抗 IgG-FITC(1:100), 轻微振荡避光反应 30 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 洗涤 2 次, 经 300 目尼龙膜过滤样品, 流式细胞仪(Beckman, Coulter Epics XL)检测, 检测时间 90 s, 利用 Expo 32 ADC 分析软件处理, 直接获得荧光信号细胞所占的比例, 即细胞染色率(荧光信号细胞数/细胞总数)。以未加 mAb 的副溶血弧菌菌悬液作为空白对照。

1.2.3 mAb 反应时间的优化:无菌生理盐水稀释副溶血弧菌菌悬液至 5×10^5 cells/mL, 于每只离心管中加入 1 mL, 10 000 r/min 冷冻离心 5 min, 弃上清, 加 1 mL 0.1 mol/L PBS 重悬沉淀;每管加入 mAb 至终浓度为 20 mg/L, 轻微振荡分别反应 15、30、45、60 和 75 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重复洗涤 2 次。每管加过量的羊抗鼠二抗 IgG-FITC (1:100), 轻微振荡避光反应 30 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 洗涤 2 次。样品经 300 目尼龙膜过滤后经流式细胞术检测。以未加 mAb 的副溶血弧菌菌悬液作为空白对照。

1.2.4 流式细胞术检测弧菌的准确度与检出限:将在 Zobell 2216E 液体培养基中过夜培养的副溶血弧菌 1.1997 逐级稀释, 制备成样品 1-5 (对应浓度为: 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 和 10^7 cells/mL), 分别进行 FCM 检测, 对比样品菌浓在 10^3 - 10^7 cells/mL 的检测结果。

1.2.5 流式细胞术检测弧菌的精密度:将甲醛灭活的副溶血弧菌配制成 2 个不同菌浓的样品: 1 号样品(5×10^4 cells/mL)和 2 号样品(5×10^5 cells/mL)。每天对 2 个样品进行一次 FCM 分析, 每次做 3 个平行, 一共测试 5 d, 综合测定结果, 求出变异系数。

1.2.6 流式细胞术检测弧菌的特异性:选取 5 种弧菌进行流式细胞术检测方法的特异性评价。菌液浓度稀释至 1×10^5 cells/mL, 按 1.2.4 流式细胞术方法进行检测, 每个样品检测 2 000 个细胞, 测定每种菌的染色率。每种菌株以不加 mAb 作为空白对照。

2 结果

2.1 mAb 反应浓度的优化

于 5 只离心管中各加入 1 mL 副溶血弧菌 (5×10^5 cells/mL), 分别与终浓度为 2.5、5.0、10.0、20.0 和 40.0 mg/L 的单克隆抗体(mAb)反应 60 min, 洗涤后, 加入过量二抗反应 30 min, 洗涤后, 通过流式细胞仪进行检测, 结果见图 1。

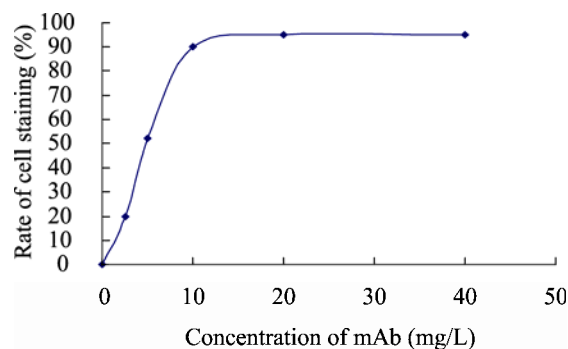


图 1 mAb 反应浓度的优化

Fig. 1 Optimization of mAb concentration

当 mAb 终浓度为 2.5–20 mg/L 时, 细胞染色率随着抗体浓度的增加而增大, 当 mAb 浓度增加到 20 mg/L 时, 细胞染色率达到 96.8%。mAb 增加到 40 mg/L 时, 细胞染色率增加不显著。因此, 以 mAb 终浓度 20 mg/L 作为最佳反应浓度。

2.2 mAb 反应时间的优化

于 5 只离心管中各加入 1 mL 副溶血弧菌 (5×10^5 cells/mL), 每管加入 mAb 至终浓度 20 mg/L, 分别反应 15、30、45、60 和 75 min, 洗涤后, 加入过量二抗反应 30 min, 洗涤后, 经 FCM 检测, 结果见图 2。

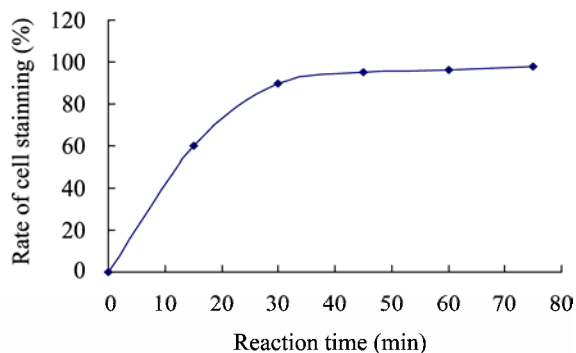


图 2 mAb 反应时间的优化

Fig. 2 Optimization of reaction time for mAb

当 mAb 反应时间在 15–45 min 时, 细胞染色率随着染色时间的增加而增大, 当染色时间为 45 min 时, 细胞染色率达到 95.7%。在 45–75 min, 随着时间的增加, 细胞染色率增加不显著。为确保 mAb 与菌株反应充分, 采用的反应时间应为 60 min。

在上述 mAb 的优化条件下, 取 1 mL 副溶血弧菌 (5×10^5 cells/mL), 加入 mAb 至终浓度 20 mg/L, 反应 60 min, 洗涤后, 加入过量二抗反应 30 min, 洗涤后, 进行流式细胞仪分析。结果如图 3 所示, 利用 Expo 32 ADC 分析软件处理, 以荧光强度对数值为横坐标, 以细胞数为纵坐标, 直接获得荧光信号细胞所占的比例, 结果表明, 在所选定的

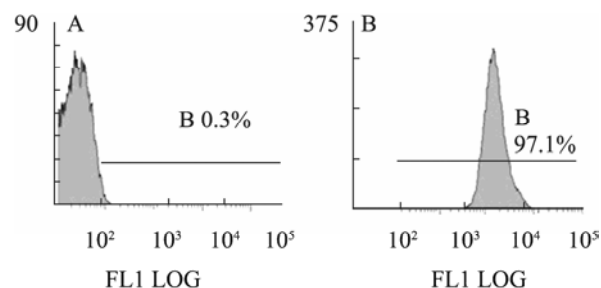


图 3 最适反应条件 FCM 检测弧菌的荧光信息直方图
Fig. 3 FCM histogram of fluorescence information for vibrio detection

注: A: 未加 mAb 的空白对照; B: mAb 终浓度为 20 mg/L, 反应时间为 60 min.

Note: A: Control; B: Final concentration of mAb was 20 mg/L and the reaction time was 60 min.

最适反应条件下(mAb 终浓度为 20 mg/L, 反应时间为 60 min), 细胞染色率达到 97.1%。

2.3 流式细胞术检测弧菌的特异性分析

以副溶血弧菌(A)、溶藻弧菌(B)、哈维氏弧菌(C)、鳃弧菌(D)、创伤弧菌(E) 5 株弧菌和 3 种非弧菌(嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、荧光假单胞菌)为研究对象, 分别与一抗 mAb (S5C10)、二抗山羊抗小鼠 IgG-FITC 反应后, 经 FCM 分析。利用 Expo 32 ADC 分析软件处理, 以荧光强度对数值为横坐标, 以细胞数为纵坐标绘出荧光信息直方图(图 4), 直接获得荧光信号细胞占细胞总数的比例。结果表明, mAb (S5C10)对 5 种弧菌均具有良好的免疫反应性, 对嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、荧光假单胞菌(F) 3 种非弧菌无免疫反应。

2.4 流式细胞术检测弧菌的准确性与检出限

对菌体浓度在 10^3 – 10^7 cells/mL 范围内的样品 2–样品 5 的检测结果表明(图 5), 流式细胞术可高灵敏地检测到致病性弧菌, 检测限达到 10^3 cells/mL。在细菌浓度 10^4 – 10^7 cells/mL 范围内, FCM 检测值与平皿菌落计数法的检测结果显著相关($P < 0.01$), 相关系数 $r = 0.992 0$, 对于菌浓高

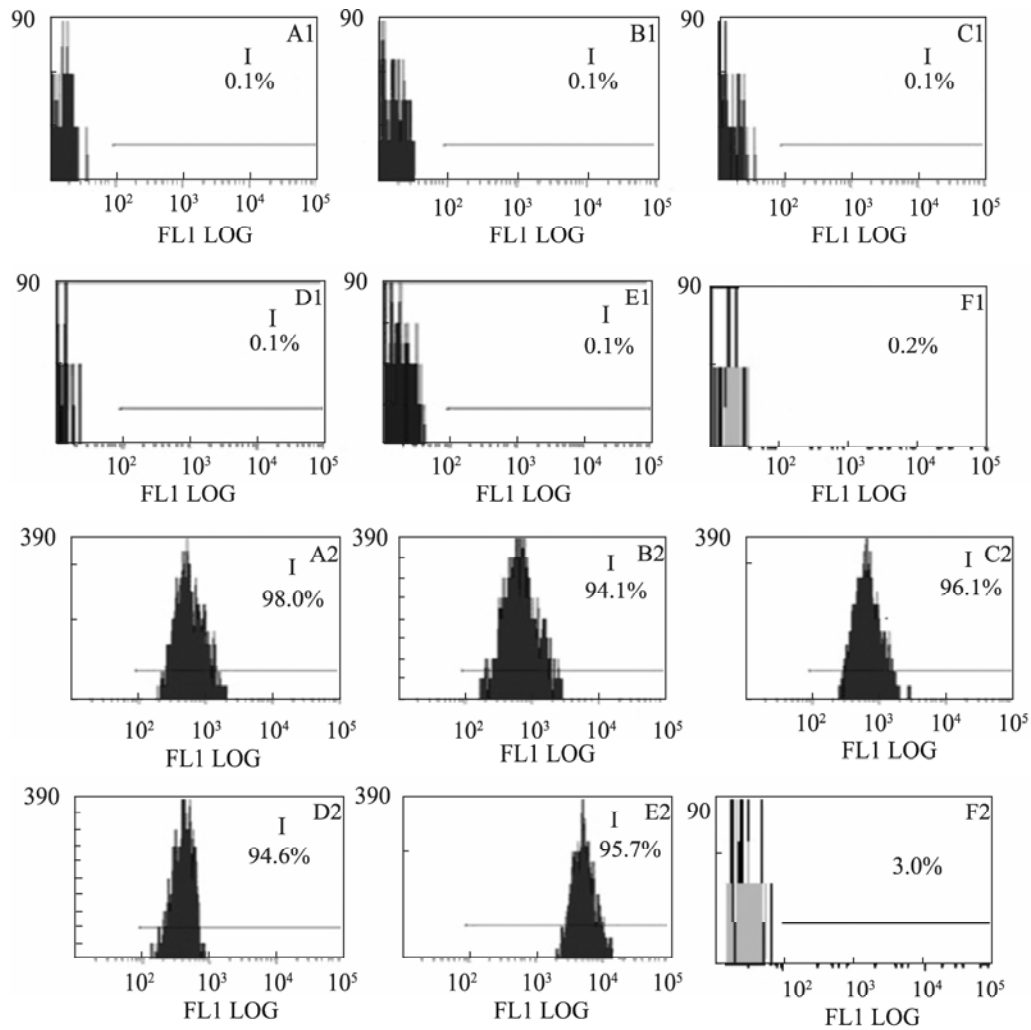


图4 mAb (S5C10)与5种弧菌和一种非弧菌的特异性

Fig. 4 mAb specificity with five different types of vibrios

注: A1-F1: 空白腹水与 *Vp 1.1997*、*Va 1.1587*、*Vh 1.1593*、*Van SM*、*Vv 1.1758* 和荧光假单胞菌的反应; A2-F2: mAb (S5C10) 与 *Vp 1.1997*、*Va 1.1587*、*Vh 1.1593*、*Van SM*、*Vv 1.1758* 和荧光假单胞菌的反应.

Note: A1-F1: Reaction of control ascites with vibrios (*Vp 1.1997*、*Va 1.1587*、*Vh 1.1593*、*Van SM*、*Vv 1.1758* and *Pseudomonas fluorescens*); A2-F2: Reaction of mAb (S5C10) with vibrios (*Vp 1.1997*、*Va 1.1587*、*Vh 1.1593*、*Van SM*、*Vv 1.1758* and *Pseudomonas fluorescens*).

于 10^4 cells/mL 的样品,FCM 可用于定量分析,检测值可信度较高。对于浓度范围低于 10^3 cells/mL 的样品 1,两种方法的检测结果具有一定的误差(19.3%)。

2.5 流式细胞术检测弧菌的精密度

精密度(Precision)又称为可重复性,是指对同一样本重复测定时,每次测定结果与平均值的

接近程度,即重复测定值之间的符合程度,常用变异系数来表示。按 1.2.5 所述的方法,对 1 号、2 号样品每天进行一次 FCM 分析,每次做 3 个平行,一共测试 5 d,结果分析见表 1。每个浓度下的变异系数较小,均小于 7%,表明该方法具有较好的精密度和稳定性。

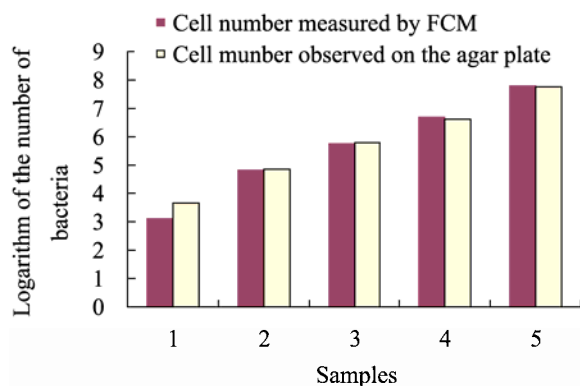


图5 FCM检测值与平皿菌落计数值的对比图
Fig. 5 Comparison of the cell number measured by FCM with those on the agar plate

表1 流式细胞术检测弧菌的精密度
Table 1 Precision of vibrio detection by FCM

样品 Samples	平均值 $\bar{x} \pm s$	变异系数 Coefficient of variation (%)
1	36 837±2 504	6.8
2	436 885±17 912	4.1

3 讨论

目前常用的对病原弧菌的检测技术包括传统的生理生化鉴定法和分子生物学方法。这些方法检测过程繁琐、费时,难以适应快速检测的需求^[9]。近几年,流式细胞术不仅在医疗检测领域中得到了很大的发展,而且已经拓展到微生物和植物研究领域。在微生物学领域里,FCM主要运用于细菌、真菌和病毒的快速检测^[10-12]。

本文建立了基于单克隆抗体的多元弧菌流式细胞术检测方法,优化了一抗(单抗)的反应浓度和时间,在优化条件下,弧菌细胞染色率高达97.1%,该方法检测时间可控在2h之内。当菌浓在 10^4 – 10^7 cells/mL范围时,FCM检测法与平皿菌落计数值显著相关($P < 0.01$),相关系数 $r = 0.992 0$ 。而对于细胞浓度在 10^3 cells/mL以下的样品,误差达19.3%,由于间接荧光标记法操作步骤较多,

增加了细胞的丢失及破碎,导致检测结果具有较大的误差。但是作为半定量检测,以所建立的FCM技术平台,对含不同菌体浓度的样品进行重复检测,变异系数CV值均在7%以内。

基于单克隆抗体可特异性识别单一抗原决定簇,避免交叉反应带来的假阳性,因此具备较高的检测准确性。所建立的FCM检测技术中mAb(S5C10)可特异性识别并能有效检测出5种病原弧菌(副溶血弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、创伤弧菌、鳗弧菌),对于非弧菌,则无检测信号。mAb对其它弧菌和非弧菌等病原性菌株的特异性检测的延伸,正在研究中。本工作建立了基于单抗的FCM多元弧菌检测技术,操作简单,耗时较短,特异性高,具有较好的准确性和稳定性,为多元病原弧菌的检测和防治提供了一种新的检测方法。

参考文献

- [1] 陈梅. 弧菌 (*Vibrio*) 与渔业生物及与人类病害评述[J]. 海洋湖沼通报, 1999, 77(1): 61–68.
- [2] 吴后波, 潘金培. 病原弧菌的致病机理[J]. 水生生物学报, 2003, 27(4): 422–426.
- [3] 刘新华. 创伤弧菌 FJ03-X2荚膜多糖的提取和免疫原性分析[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2008.
- [4] 王世杰, 杨杰, 谭志强, 等. 1994–2003年我国766起细菌性食物中毒分析[J]. 中国预防医学杂志, 2006, 7(3): 180–185.
- [5] 刘秀梅, 陈艳, 王晓英, 等. 1992–2001年食源性疾病暴发资料分析-国家食源性疾病监测网[J]. 卫生研究, 2004, 33(6): 729–731.
- [6] 闫茂仓, 陈少波, 单乐州, 等. 海水养殖动物致病弧菌的研究进展[J]. 水产科学, 2009, 28(8): 475–481.

- [7] 鄢庆枇, 纪荣兴, 苏永全, 等. 大黄鱼弧菌病的荧光抗体快速诊断研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2001, 6(4): 292-296.
- [8] 王军, 鄢庆枇, 苏永全, 等. 溶藻弧菌的间接荧光抗体快速检测[J]. 海洋科学, 2002, 26(7): 1-4.
- [9] 赵现方, 陈林海, 李宗义, 等. 流式细胞术及其在微生物学中的应用[J]. 河南农业科学, 2005(6): 5-9.
- [10] Laplace-Builhé C, Hahne K, Hunger W, et al. Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries[J]. Biology of the Cell, 1993, 78(1/2): 123-128.
- [11] Gunasekera TS, Attfield PV, Veal DA. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 1228-1232.
- [12] Fuchs BM, Zubkov MV, Sahn K, et al. Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques[J]. Environmental Microbiology, 2000, 2(2): 191-201.

2012 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表 (2-2)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
13	“生化工程模型与控制专业委员会”庆祝中国微生物学会成立 60 周年年会	中国微生物学会生化工程模型与控制专业委员会	8 月	100	上海	夏建业 庄英萍 021-64251946
14	第 9 届海洋生物技术与创新药物论坛	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	8 月	200	内蒙古	焦炳华 缪辉南 王梁华 021-81870975
15	第十五次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	9 月	500	辽宁大连	蒋建东 025-84395326
16	第二届全国芽胞杆菌研究与应用学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10 月	100	福建福州	刘波 laeptb@163.com
17	第三届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	10 月 10-15 日	400	浙江杭州	张丹 13777216902
18	2012 年全国微生物毒素与脓毒症学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10 月 下旬	350	湖北武汉	张庆红 010-66867398
19	第四届全国微生物资源学术研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	10 月	200	四川成都	阮志勇 13301101231
20	兽医微生物学青年学术论坛	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	10 月	150	北京	丁家波 13683505108
21	纪念中国微生物学会成立六十周年暨 2012 年学术年会	中国微生物学会	10 月 26-30 日	600	江苏南京	王旭 010-64807200
22	首届中国放线菌生物学大会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	11 月	150	上海	覃重军 021-54924171
23	第七届全国芽胞杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	11-12 月	100	湖南长沙	夏立秋 xialq@hunnu.edu.cn