

亚微米级免疫磁球及其在细菌分离中的应用

牛 牧¹, 杜美红², 邓 奕^{1,2}, 高明远¹

(1. 中国科学院化学研究所, 北京 100190; 2. 北京市理化分析测试中心, 北京 100089)

摘要 以亚微米级的单分散磁性微球为基础, 制备了表面包覆沙门氏菌抗体的免疫磁球. 利用表面电位、荧光光谱和酶联免疫(ELISA)等方法研究了抗体在磁性微球表面的吸附行为. 在沙门氏菌磁分离实验中, 通过调节投料抗体的浓度, 研究了免疫磁球表面抗体浓度和磁分离效率的相关性, 与微米级商品化免疫磁球相比, 亚微米级的免疫磁球表现出了更高的磁分离效率.

关键词 亚微米; 免疫磁球; 沙门氏菌; 磁分离效率

中图分类号 O648

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2011)02-0322-05

免疫磁性微球是指表面包覆抗体的磁性微球, 可与含有相应抗原的靶物质特异性地结合. 通过在磁性复合微球表面偶联或者吸附上特定抗体, 形成免疫磁性微球^[1]. 20 世纪 80 年代, Ugelstad 等^[2~4] 利用“激活溶胀”法成功制备了单分散的磁性微球, 并在磁性微球表面连接上抗体制备出免疫磁性微球, 在细胞分离领域取得了良好的分离效果. 随着以此技术为基础制备的商品化产品 Dynabeads 种类的不断丰富, 近年来免疫磁性微球在核酸分析、蛋白质分离和纯化以及靶向药物载体等领域都得到了广泛应用^[5~11]. 此外, 免疫磁球在食品卫生检测领域也得到了应用^[12,13], 利用免疫磁性分离技术不仅大大缩短了检测时间, 更有助于提高检测的灵敏度^[14,15].

目前, 商品化的免疫磁性微球粒径通常都是微米级, 从理论上讲, 微米级免疫磁球之间的排斥力不足以抵消重力作用的影响, 因而在体系中容易沉淀, 不利于免疫识别和捕获过程, 但是能够快速磁分离的优势使得微米级免疫磁球得到了广泛应用^[15]. 针对目前微米级免疫磁球存在的问题, 如果能够将免疫磁球的粒径减小到亚微米级, 不仅有助于提高其胶体稳定性, 而且随着其比表面积的增长有利于提高反应活性. 但是, 磁分离过程是外加磁场克服微球之间相互斥力的过程, 胶体稳定性的提高意味着微球之间的相互排斥力增强, 在一定程度上会降低微球的磁响应性. 为了解决这一问题, 本课题组通过前期的研究工作^[16], 成功地制备了具有良好胶体稳定性与磁响应性的亚微米级磁性微球, 并在细菌分离的初步实验中取得了良好的分离效果^[17].

本文在前期研究工作基础上^[18], 对亚微米级免疫磁球的制备过程进行详细研究, 进一步完善了磁分离捕获沙门氏菌的相关工作.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

苯乙烯(北京化学试剂公司)使用前减压蒸馏; 偶氮二异丁基脒二盐酸盐(V50, 纯度 97%, Sigma-Aldrich 公司); 无水乙醇和聚乙烯基吡咯烷酮(PVP, K30)等均为分析纯试剂; 参考文献[18]方法制备 PVP 包覆 Fe_3O_4 纳米粒子, 粒径大小约为 5.8 nm; 商品化磁球 Dynabeads[®] anti-Salmonella (规格为 5 mL, Invitrogen 公司); 牛血清白蛋白(BSA, Sigma-Aldrich 公司); 异硫氰酸荧光素(FITC, F3651-100 mg, Sigma-Aldrich 公司); 四乙基罗丹明(RB200, 283924-100 mg, Sigma-Aldrich 公司); 羊抗兔和羊抗

收稿日期: 2010-11-01.

基金项目: 国家卫生部重大专项(批准号: 2008ZX10001-014)和中国科学院知识创新工程(批准号: KJCX2-YW-M15)资助.

联系人简介: 高明远, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事无机纳米材料的制备及其生物应用研究.

E-mail: gaomy@iccas.ac.cn

鼠 IgG 抗体(北京博奥森生物技术有限公司);沙门氏菌多克隆 IgG 抗体(1 mg/mL, 美国 KPL 公司);沙门氏标准菌株(*Salmonella* sp., 菌株编号: 1. 1552, 中国科学院微生物研究所);实验过程中所用水均为去离子水.

Model 680 型酶标仪(BIO-RAD 公司, 美国);Cary Eclipse 型荧光分光光度计(VARIAN 公司, 美国);JEM-100CX II 透射电子显微镜(日本).

1.2 磁性微球的制备

参考文献[17]方法, 将 1.8 mL 苯乙烯单体、90 mg V50、300 mg PVP、25 mL 乙醇和 3 mL 去离子水加入到 50 mL 三颈瓶中, 在 70 °C 条件下进行聚合反应, 反应开始 2 h 后, 将 PVP 包覆的 Fe_3O_4 纳米粒子的乙醇溶液分批加入到反应体系中, 9 h 后停止反应, 用乙醇反复离心清洗磁性微球 3 次, 最后将微球置于去离子水中保存, 取适量样品进行 TEM 表征.

1.3 免疫磁球的制备

利用在碱性条件下 FITC 的碳酰胺键可与抗体赖氨酸的 ϵ 氨基共价结合的特点, 制备标记有 FITC 的羊抗兔 IgG 抗体. 利用激光动态光散射扫描仪对自制的磁性微球进行粒径和表面电位的表征. 取 200 μg 磁性微球与 50 μg 标记有 FITC 的羊抗兔 IgG 抗体分散在 1 mL 1 $\times$ PBS 溶液中, 于常温混合振荡 2 h 后, 进行磁分离, 得到上清液 1; 然后再将制得的免疫磁球分散在 1 mL PBS 缓冲液中, 常温振荡 2 h 后, 进行磁分离, 得到上清液 2; 重复这一过程, 得到上清液 3. 测定上清液 1~3 的荧光光谱. 同时, 对清洗 3 次后得到的免疫磁球粒径和表面电位进行表征. 用未标记 FITC 的抗体重复上述实验, 将得到的上清液用酶联免疫(ELISA)法再次测定各个上清液中的抗体浓度.

将制备得到的免疫磁球用质量分数为 1% 的 BSA 溶液封闭 1 h 后, 与 RB200 标记的羊抗鼠 IgG 抗体混合 0.5 h, 磁分离后比较上清液中的 RB200 标记的羊抗鼠 IgG 的荧光变化.

1.4 免疫磁球的细菌分离实验

取 200 μg 磁性微球, 用无菌去离子水清洗 3 次, 分散在 1 mL 1 $\times$ PBS 溶液中, 分别加入 50, 10, 5 和 0.5 μg 沙门氏菌多克隆 IgG 抗体, 常温振荡混合 2 h, 磁分离, 清洗. 将制备的磁性微球用质量分数为 1% 的 BSA 溶液封闭得到免疫磁性微球, 依次记为免疫磁球 1~4. 然后, 用 ELISA 法标定免疫磁球表面的抗体含量. 将得到的表面具有不同抗体量的免疫磁性微球与浓度为 10^4 cfu/mL 的沙门氏菌液混合, 常温轻微振荡 30 min 后, 磁分离. 最后, 用微生物平板计数法对 4 个样品的上清液进行菌落计数, 同时对原始的沙门氏菌液对照样品计数并计算出磁分离效率.

为了考察免疫磁球粒径对磁分离效率的影响, 选择粒径更大的商品化产品 Dynabeads 作为对照样品. 首先, 各取 200 μg 免疫磁球 1 和 Dynabeads 产品分别加入至 1 mL 浓度为 10 和 10^4 cfu/mL 的沙门氏菌溶液中, 常温混合 30 min, 磁分离后用微生物平板计数法对 4 个不同样品的上清液和磁分离液进行菌落计数, 同时对原始的沙门氏菌液对照样品计数. 参考 Dynabeads 说明书提供的磁分离条件, 降低免疫磁球的浓度, 各取 50 μg 的免疫磁球 1 和 Dynabeads 产品分别加入至 1 mL 浓度为 10 和 10^4 cfu/mL 的沙门氏菌溶液中, 常温混合 30 min, 磁分离后用微生物平板计数法对 4 个不同样品的上清液进行菌落计数, 同时对原始的沙门氏菌液对照样品计数并计算出磁分离效率.

2 结果与讨论

2.1 磁性微球

利用透射电镜对磁性微球形貌进行表征, 结果见图 1. 可以看出磁性微球具有良好的单分散性, 粒径尺寸约为 (402 ± 18) nm, 与动态水合尺寸相一致, 从图 1 插图的放大照片可以看出, 磁性纳米粒子与聚苯乙烯能很好地复合在一起. 而微球之间未发生相互聚集, 制备的磁性微球水溶液可以稳定放置 12 h 而不出现沉淀, 在 0.5 T 的外加磁场条件下, 30 min 就可以将全部磁性微球分离出来.

2.2 免疫磁性微球

IgG 类蛋白分子的等电点大都在 5~8 之间, 因此部分 IgG 抗体在中性条件下, 蛋白质表面带有负电荷, 而所制备的磁性微球表面带有较强的正电荷, 因此, 某些 IgG 可以通过静电作用吸附在微球表

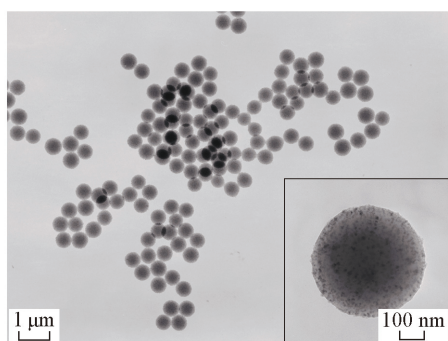


Fig. 1 TEM image of the submicron magnetic beads

Inset shows an enlarged single bead.

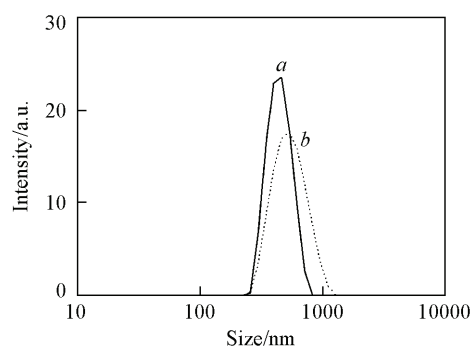


Fig. 2 Distribution profiles of the submicron magnetic beads before (a) and after (b) absorbed IgG

面. 实验结果表明, 吸附抗体后磁性微球表面电位从 $+32.7$ mV 变为 -13.5 mV, 验证了我们的理论假设. 从动态光散射结果(图2)可以看出, 磁性微球在吸附抗体前水合尺寸约为 429.6 nm(多分散指数 $PDI = 0.027$), 吸附后的粒径增大到 488.4 nm($PDI = 0.177$), 没有任何聚集峰的出现, 说明吸附抗体后的磁性微球仍然保持了很好的分散性和稳定性.

传统快速检测抗体浓度的方法是通过测定蛋白质在 280 nm 处的吸收来标定抗体浓度的. 但是, 在本研究体系中, 由于磁性微球本身在 280 nm 处有很强的吸收, 另外磁球对可见光有较强的散射, 即使上清液中少量残存的微球都会对蛋白质的吸光值带来较大影响. 相比之下, 如果将抗体标记上荧光分子, 通过荧光方法间接测定抗体浓度, 不仅可以极大提高测定的灵敏度, 也避免了磁球散射的影响. 为了建立一种快速的检测方法, 我们将 FITC 荧光分子标记到 IgG 抗体上, 通过对比原始溶液和各个上清液的荧光光谱研究抗体在微球表面的吸附和脱附行为, 结果如图3所示. 从上清液1荧光光谱强度的下降可以看出, 磁性微球对 IgG 抗体具有明显的吸附作用; 上清液2和3的荧光强度极其微弱, 表明几乎没有抗体在微球表面脱附, 说明这种吸附是一种不可逆的吸附. 表明制备的免疫磁球可以满足进一步的生物应用. 上清液1在 520 nm 处的峰强度下降为原来的约 60% , 也说明大约有 40% 的抗体被吸附在磁性微球表面.

ELISA 方法是一种灵敏度高和特异性强的测定方法, 与荧光方法相比, ELISA 方法虽然耗时稍长, 但是测试结果更能真实地反映出体系中具有免疫学活性抗体的浓度. 用 ELISA 方法对免疫磁球制备过程中上清液抗体的浓度进行了重复测定, 从测试结果可知, 上清液1中剩余抗体浓度为 31.1 $\mu\text{g/mL}$, 剩余比例为 62.2% , 这与由荧光光谱得到的数据相互印证, 也说明了上清液1中剩余的抗体活性基本得到了全部保留, 上清液2抗体浓度仅为 1.62×10^{-3} $\mu\text{g/mL}$, 上清液3的抗体含量为 0 也同样证实了抗体是可以在磁性微球表面稳定存在的.

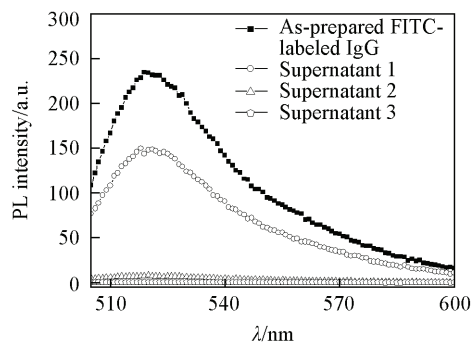


Fig. 3 Photoluminescence (PL) spectra of the as-prepared FITC-labeled IgG solution and the supernatants obtained during different purifying cycles

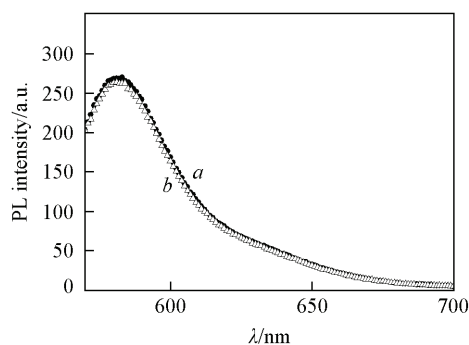


Fig. 4 Photoluminescence spectra of the RB200-labeled IgG solution (a) and the remaining supernatant (b) obtained after magnetic collection of the BSA-blocked magnetic beads 30 min post-incubation

为了考察 BSA 对免疫磁球的封闭效果, 将 BSA 封闭好的免疫磁球与另一种荧光标记的不相关抗体混合, 其荧光光谱见图 4. 混合前后 RB200 标记的羊抗鼠 IgG 的荧光值几乎没有发生变化, 说明 BSA 很好地封闭掉了不相关的活性位点.

2.3 免疫磁球在细菌分离中的应用

为了研究抗体投料量与吸附量的关系及其对最终磁分离效率的影响, 首先选择不同抗体浓度与相同量的磁性微球进行吸附, 结果列于表 1 中. 当抗体浓度小于 10 $\mu\text{g/mL}$ 时, 吸附在微球表面的抗体浓度随着投料浓度的增加而增加, 二者有较好的线性关系. 但是当投料抗体浓度增大到 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 吸附效率仅为 63%, 导致吸附效率下降的原因可能是抗体在磁性微球表面存在饱和吸附, 达到饱和吸附值前, 95% 以上的投料抗体可以被吸附在微球表面. 而当投料抗体浓度超过饱和吸附值时, 过量的抗体无法吸附在微球表面, 依据实验结果, 可认为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的磁性微球的饱和抗体吸附值约为 31.3 $\mu\text{g/mL}$.

Table 1 Amounts of IgG adsorbed on submicron immunomagnetic beads (IMBs) and leftover in supernatant

IMB	$c(\text{IgG})/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	
	Adsorbed on magnetic beads	Remaining in supernatant
IMBs-1	31.3	18.7
IMBs-2	9.6	0.4
IMBs-3	4.8	0.2
IMBs-4	0.475	0.025

选取免疫磁球 1~4 分离浓度为 (19375 ± 125) cfu/mL 的沙门氏菌液, 考察免疫磁球表面抗体不同吸附量对磁分离效率的影响. 结果表明, 免疫磁球 1~3 的磁分离捕获效率分别为 99.8%, 96.7% 和 95.1%, 免疫磁球 4 的磁分离效率相对较低仅为 32.9%. 分离捕获效率是随着免疫磁球表面抗体吸附量的提高而增大. 在免疫微球粒径尺寸相同的情况下, 分离捕获效率主要取决于免疫微球表面免疫活性位点的数目, IgG 抗体为“Y”型构象, 其具备免疫识别的区域位于上端的 Fab 段, 在制备免疫磁球的过程中, 将更多的 Fab 段暴露在外侧有利于提高其免疫活性. 当抗体吸附量很低时, Fc 段与磁性微球表面的疏水作用使得抗体在微球表面发生各种取向, 不利于其活性位点暴露在外侧, 而随着吸附量的提高, 有更多的抗体在微球表面趋向于直立排列, 从而使更多的 Fab 段暴露在外侧, 使免疫磁球表现出更高的免疫活性, 合理解释了分离效率随着表面抗体吸附量的提高而增大的结论.

为了研究免疫微球粒径尺寸对分离捕获效率的影响, 选择免疫磁球 1 和商品化的微米级产品 Dynabeads 进行对照实验, 结果列于表 2. 从表 2 可以看出, 当免疫磁球 1 在用量仅为 Dynabeads 产品 1/4 的情况下仍表现出较高的分离捕获效率. 在磁分离实验中, 免疫识别过程是分离效率高低的关键, Dynabeads 的免疫磁球虽然具有很好的磁响应性, 但是其直径约为 2.8 μm , 比表面积较小, 并且很容易受到重力的作用而沉降出来, 无法充分与反应体系中的待捕获物进行

Table 2 Comparison of capturing efficiencies between IMBs-1 and Dynabeads

Concentration of <i>Salmonella</i> sp/(cfu·mL ⁻¹)	IMBs-1		Dynabeads	
	50 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
10	84%	100%	32%	89%
10 ⁴	97%	99%	61%	91%

免疫识别. 而免疫磁球 1 的粒径不到 500 nm, 其比表面积是 Dynabeads 产品的 6 倍, 在保持了很好的胶体稳定性的同时也具有更高的免疫反应活性, 即使在磁球浓度较低的情况下, 免疫磁球 1 仍有充分的时间和反应位点与沙门氏菌表面的抗原发生免疫识别, 从而表现出更高的磁分离效率.

综上所述, 以亚微米级的单分散磁性微球为基础, 制备出了具有良好磁分离捕获效率的免疫磁球. 在制备免疫磁球的过程中, 利用荧光光谱法实现了对抗体浓度的快速检测. 研究了免疫磁球表面抗体吸附量对磁分离捕获效率的影响, 结果表明, 随着抗体吸附量的增大, 抗体在磁球表面的排列取向有利于提高其免疫活性, 磁分离效率也随之提高. 与微米级的商品化磁球相比, 亚微米级的免疫磁球由于具有更大的比表面积和更好的分散性, 在分离沙门氏菌的实验中表现出了更高的磁分离效率.

参 考 文 献

[1] Safarik I., Safarikova M.. J. Chromatogr. B[J], 1999, 722(1/2): 33—53
[2] Ugelstad J., Kaggerud K. H., Hansen F. K., Berge A.. Macromol. Chem. [J], 1979, 180(3): 737—744

- [3] Ugelstad J. , Berge A. , Ellingsen T. , Schmid R. , Nilsen T. N. , Mork P. C. , Stenstad P. , Hornes E. , Olsvik O. . Prog. Polym. Sci. [J], 1992, **17**(1): 87—161
- [4] Ugelstad J. , Stenstad P. , Kilaas L. , Prestvik W. S. , Herje R. , Berge A. , Hornes E. . Blood Purificat. [J], 1993, **11**(6): 349—369
- [5] Chatterjee J. , Haik Y. , Chen C. J. . J. Magn. Magn. Mater. [J], 2001, **225**(1/2): 21—29
- [6] Krizova J. , Spanova A. , Rittich B. , Horak D. . J. Chromatogr. A [J], 2005, **1064**(2): 247—253
- [7] Ma Z. Y. , Guan Y. P. , Lu H. Z. . React. Funct. Polym. [J], 2006, **66**(6): 618—624
- [8] Prikryl P. , Horak D. , Ticha M. , Kuderova Z. . J. Sep. Sci. [J], 2006, **29**(16): 2541—2549
- [9] Wilson R. , Spiller D. G. , Prior I. A. , Bhatt R. , Hutchinson A. . J. Mater. Chem. [J], 2007, **17**(41): 4400—4406
- [10] Horak D. , Rittich B. , Spanova A. , Benes M. J. . Polymer [J], 2005, **46**(4): 1245—1255
- [11] TAO Lei(陶磊), JIN Wei(金伟), ZHANG Ying(张莹), YAN Fei(闫飞), WANG Lin-Lin(王琳琳), MU Ying(牟颖), JIN Qin-Han(金钦汉). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2009, **30**(5): 882—885
- [12] Hallier-Soulier S. , Guillot E. . Fems Microbiol. Lett. [J], 1999, **176**(2): 285—289
- [13] Skjerve E. , Olsvik O. . Int. J. Food Microbiol. [J], 1991, **14**(1): 11—17
- [14] LIU Hui-Jie(刘慧杰), TENG Ying-Qiao(滕瑛巧), ZHANG Xin-Ai(张新爱), FU Ying(符莹), ZHANG Wen(张文), JIN Li-Tong(金利通). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2010, **31**(6): 1131—1136
- [15] Tu S. I. , Reed S. , Gehring A. , He Y. P. . Food Anal. Method [J], 2009, **2**(1): 14—22
- [16] Yang Y. H. , Tu C. F. , Gao M. Y. . J. Mater. Chem. [J], 2007, **17**(28): 2930—2935
- [17] Niu M. , Du M. H. , Gao Z. Y. , Yang C. H. , Lu X. Y. , Qiao R. R. , Gao M. Y. . Macromol. Rapid Commun. [J], 2010, **31**(20): 1805—1820
- [18] Lu X. Y. , Niu M. , Qiao R. R. , Gao M. Y. . J. Phys. Chem. B [J], 2008, **112**(46): 14390—14394

Preparation and Application in Capturing Bacteria of Submicron Immunomagnetic Beads

NIU Mu¹, DU Mei-Hong², DENG Yi^{1,2}, GAO Ming-Yuan^{1*}

(1. Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

2. Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China)

Abstract Based on the submicron monodispersed magnetic beads, the immunomagnetic beads covered with anti-*Salmonella* antibody were obtained. The adsorption behavior of IgG on the surface of magnetic beads was investigated through surface electric potential, fluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. In the immunoassay experiment, by adjusting the initial concentration of IgG, the relativity between surface concentration of IgG on magnetic beads and magnetic capture efficiency was also investigated. Finally, comparison with commercial Dynabeads, the submicron immunomagnetic beads represents higher capture efficiency for *Salmonella*.

Keywords Submicron; Immunomagnetic beads; *Salmonella*; Magnetic capture efficiency

(Ed.: V, Z)