文章编号:1000-5404(2009)10-0887-04

论著

微流控免疫芯片富集/捕获肠出血性大肠杆菌O157:H7的研究

管 潇[1],张惠静[1],毕颖楠[1],张 莉[1],郝敦玲[1],韦劲宇[2] (第三军医大学:[1]医学检验系分析化学教研室,[2]学员旅3队,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨基于免疫微珠的微流控芯片识别捕获EHEC O157:H7的效率。**方法** 采用化学共价连接的方法将抗EHEC O157:H7抗体固定于粒径为50 μm的玻璃微珠上,再将微珠填充于PDMS/玻璃复合芯片中,建立由流体控制、免疫反应构成的细菌分选芯片;通过对进样流速、冲洗流速及冲洗时间的优化,在降低芯片对细菌的非特异性吸附的同时,增加芯片的特异性捕获效率。**结果** 在10 μl/min和5 min的最佳冲洗流速和冲洗时间下,该芯片在10 min内可完成对EHEC O157:H7的捕获,捕获效率达到40.00%~63.96%,且实验组与对照组有统计学差异($P<0.01$)。**结论** 本研究构建的EHEC O157:H7识别芯片具有较高的捕获效率。

关键词: 微流控芯片;免疫微珠;细菌捕获
中图法分类号: R318.04;R378.21;R392-33 **文献标识码:** A

A microfluidic chip to concentrate and capture EHEC O157:H7

GUAN Xiao[1], ZHANG Hui-jing[1], BI Ying-nan[1], ZHANG Li[1], HAO Dun-ling[1], WEI Jin-yu[2] ([1]Department of Analytical Chemistry, College of Laboratory Medicine, [2]3rd Student Team, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the efficiency of concentration and capture of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 by a self-made microfluidic chip based on microbead. Methods The anti-EHEC O157:H7 antibody was first attached on the microbeads by direct covalent linkage, then the microbeads were filled into microfluidic chip. Thus, the bacteria capture chip was set up. Totally 1.6×10^9 CFU fluorescence labeled bacteria flowed into the chip at a sampling speed of 1, 2 and 5 μl/min respectively, and the elution speed of 0.5, 2, 5, 10 and 20 μl/min. The specific capture efficiency of the chip was strengthened through the optimization of sampling speed, elution speed and time. Results The best sampling speed, elution speed and time were 5 μl/min, 10 μl/min and 5 min respectively. There was significant difference between the test group and the control group ($P<0.01$). Conclusion Our self-made bacteria capture chip is of high catching efficiency, which lay a good base for the construction of rapid detection microfluidic system of bacteria.

Key words: microfluidic chip; microbead; bacteria capture

肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*,EHEC)是一种致病性大肠杆菌。O157:H7是EHEC最主要的血清型,致病力强,最低感染剂量少于10个病原菌,在世界各地多次发生暴发性感染,对人类健康形成巨大的威胁。发展快速、敏感、特异的检测方法是预防和控制EHEC O157:H7传播和流行的重要手段[1,2]。在致病菌的检测中,用常规方法检测含量较低的样品时,为了达到检测方法所要求的检测限,往往需要对样品进行预富集处理。以细菌增殖为主的富集过程耗时过长,操作过程复杂,易存在操作误差;对复杂样品中的目标致病菌的特异性筛选技术则进一步增加分析的复杂性和检测费用。近年来,迅速发展的微流控芯片分析技术在细菌富集/分选中较传统方法有着突出的优势,其灵活可控的单元集成模式和微尺度结构不但能提高分析速度、增加分析通量、降低试剂及样品的消耗量,还可实现样品处理、分选和检测的一体化。芯片通道间的相互独立也避免了样本的交叉干扰,降低了操作者被感染的危险性。目前,已有相关微流控芯片技术针对细菌分析检测的研究报道[1-7]。本

基金项目: 全军医学科研"十一五"面上项目(06MB248)
Supported by the Research Project the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA(06MB248)
作者简介: 管 潇,女,湖北省襄樊市人,硕士研究生,助理实验师,主要从事生物分析化学方面的研究。电话:(023)68752306
通信作者: 张惠静,电话:(023)68752306
收稿日期: 2009-02-16;**修回日期:** 2009-03-02

研究构建1个基于免疫识别捕获EHEC O157:H7的微流控芯片,探讨了该芯片对细菌的捕获效率并进行了捕获条件的优化,旨在为下一步微流控芯片细菌快速检测系统的构建奠定前期工作基础。

1 材料与方法

1.1 细菌及试剂

1.1.1 细菌 EHEC O157:H7 Sakai株,由第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室赠与,常规方法培养。

1.1.2 试剂 184 Silicone Elastomer Kit(Dow Corning),LB培养基(HyClone),0.01 mol/L PBS缓冲液,0.1 mol/L PBS缓冲液,兔抗EHEC O157:H7多克隆抗体(宁波良瑞抗体生物技术公司),N-烃基磺基琥珀酰亚胺(NHS,Sigma),碳二亚胺盐酸盐(EDC,Sigma),3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES,Sigma),MES缓冲液:0.1 mol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES,Sigma)+0.5 mol/L NaCl,pH=6.0,吖啶橙(AO,国药集团化学试剂有限公司)。

1.1.3 主要仪器设备 Eclipse 80i型荧光显微镜(Nikon),TS-60型注射泵(保定兰格恒流泵有限公司),真空干燥箱(上海恒温设备厂)。

1.2 方法

1.2.1 芯片制作 按照文献[8]中方法制作具有芯片图案的SU-8胶阳模,芯片的构型为直通道中央有一免疫微珠富集腔。将PDMS基质/固化剂按10:1比例混合均匀后真空脱气15 min,再将PDMS预聚物浇注于经硅烷化处理后的SU-8阳模上,然后置于100 ℃干燥箱中热处理15 min,待PDMS固化后从SU-8模板上剥离,即形成具有微通道的PDMS盖片。将盖片置于紫外灯下照射3 h,对其进行表面改性[9]。然后将改性后的PDMS盖片与洁净的载玻片进行不可逆封接。芯片微通道长4 cm,宽200 μm,深70 μm,芯片装置见图1。



图1 微流控芯片装置图

1.2.2 微珠的抗体修饰 准确称取10 mg直径50 μm玻璃微珠于离心管中,用清洗液(H_2SO_4:H_2O_2=3:1)浸泡过夜后,再用无菌超纯水洗净,然后置于70 ℃干燥30 min。在离心管中加入2% APTES反应1 min,依次用丙酮和无菌超纯水清洗数次。在10 μl 1 mg/ml抗体工作液中加入50 μl MES缓冲液、8 μl 4 mg/ml EDC和12 μl 4 mg/ml NHS,室温反应15 min后,加入120 μl 0.1 mol/L PBS缓冲液终止NHS-抗体活化酯形成反应,即得到抗体浓度为50 μg/ml的反应液。将反应液加入上述装有微珠的离心管中,室温反应2 h。

1.2.3 芯片的预处理 依次用75%酒精、无菌超纯水清洗芯片微通道后,用1%小牛血清白蛋白(BSA)封闭30 min,然后用0.01 mol/L PBS清洗。最后将处理后的微珠加入已注满0.01 mol/L PBS的芯片微通道储液池内,再用注射泵以20 μl/min流速正压驱动填充入微通道。通道以填充有抗体修饰微珠的芯片为实验组,填充有用BSA封闭微珠的芯片为对照组。

1.2.4 芯片上细菌的捕获

1.2.4.1 细菌培养 将EHEC O157:H7用LB培养基37 ℃细菌培养16 h。

1.2.4.2 细菌捕获 在1 ml 1.6×10^9 CFU/ml的菌液中加入一定量的荧光染料吖啶橙,使其终浓度为5 μg/ml。室温下放置1 h后,用0.01 mol/L PBS清洗5次。取上述菌液1 μl,利用注射泵以5 μl/min流速驱动加入芯片内,再以10 μl/min流速用0.01 mol/L PBS冲洗5 min,然后置于荧光显微镜下定性观察。

对增菌后的菌液进行梯度稀释后,分别取1 μl菌液,用注射泵以5 μl/min流速驱动加入芯片内,再用0.01 mol/L PBS以不同流速冲洗,然后分别对进样前的菌液以及实验组、对照组的冲洗液进行平板培养计数,计算芯片的捕获效率。

1.2.4.3 进样流速的优化 分别以1、2、5 μl/min的流速将1 μl荧光染色的细菌样品传输入富集腔内,并在荧光显微镜下观察,计算从进样开始至细菌荧光颗粒完全进入富集腔内的时间。

1.2.4.4 冲洗流速的优化 以1.2.4.3中所得最佳流速将细菌样品传输入富集腔内,用0.01 mol/L PBS分别以0.5、2、5、10、20 μl/min的流速对芯片冲洗5 min,采集废液池中的冲洗液进行平板培养计数,根据公式[捕获率=(原液细菌数-冲洗液细菌数)/原液细菌数×100%]计算实验组和对照组对细菌的捕获率,再以实验组和对照组捕获率的差值作为实验组芯片的实际捕获率。

1.2.4.5 冲洗时间的优化 以1.2.4.3中所得最佳流速进样后,再用0.01 mol/L PBS以1.2.4.4中所得最佳流速进行冲洗,并分别在冲洗5、10、15、20 min后采集废液池中的冲洗液进行平板培养计数,按照1.2.4.4中的公式计算实验组芯片的实际捕获率。

1.2.4.6 不同浓度细菌的捕获率 将增菌后的细菌梯度稀释,以1.2.4.3中所得最佳流速将细菌样品传输入富集腔内,再用0.01 mol/L PBS以1.2.4.4中所得最佳流速冲洗5 min,按照1.2.4.4中的公式计算实验组芯片的实际捕获率。

1.3 统计学分析

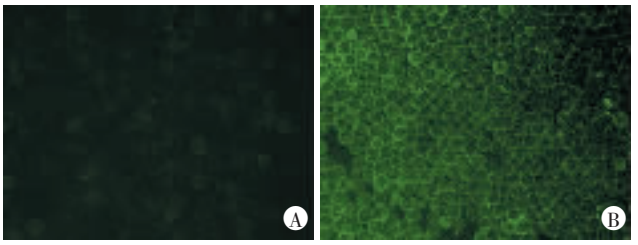
结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用SPSS 13.0统计软件对不同进样浓度和不同冲洗流速下的实验组、对照组捕获率及实际捕获率进行配对 t 检验。

2 结果

2.1 定性鉴定

通过荧光显微镜观察,样品组中的微珠可在样品进入的瞬间迅速捕获经荧光染色的细菌,而对照组芯片荧光强度明显较

低。见图 2。



A:对照组　用未经抗体修饰的微珠对经荧光染色的 EHEC O157: H7 的捕获实验;B:实验组　用经 50 μg/ml 抗 EHEC O157: H7 多抗修饰的微珠对经荧光染色的 EHEC O157: H7的捕获实验

图 2　芯片富集腔内的细菌捕获

2.2　细菌捕获及冲洗条件的优化

2.2.1　进样流速的优化　　实验表明,流速越快,进样时间越短,但平板培养计数结果显示,进样流速对捕获效率未见显著影响。因此选择耗时最短的流速 5 μl/min 作为最佳进样流速。

2.2.2　冲洗流速的优化　　实验表明,以(1.15 ~ 1.80) × 10^5 CFU/μl 细菌浓度进样,在 10 μl/min 流速下可获得最大实际捕获率,因此最佳冲洗流速为 10 μl/min。见表 1。

表 1　不同冲洗流速下芯片的捕获率(%,n = 6,$\bar{x} \pm s$)

流速(μl/min)	对照组	实验组	实际捕获率
0.5	82.24 ± 4.92	90.87 ± 0.56	8.63 ± 6.98
2	52.87 ± 5.68	78.42 ± 0.82	25.55 ± 5.83
5	48.08 ± 5.49	91.2 ± 0.24[b]	49.18 ± 5.73
10	23.86 ± 7.90	83.07 ± 0.60[a]	59.97 ± 6.90[b]
20	36.34 ± 1.48	84.58 ± 3.51[b]	48.24 ± 5.00

a: P < 0.01, b: P < 0.05, 与对照组比较

2.2.3　冲洗时间的优化　　随着冲洗时间的延长,芯片捕获率未见明显降低。因此,为了缩短分选时间,选择 5 min 作为最佳冲洗时间。

2.2.4　不同浓度细菌的捕获率　　结果表明在 1.66 × 10^3 ~ 2.70 × 10^6 CFU/μl 的进样浓度范围内,芯片的实际捕获率为 40.00% ~63.96%。见表 2。

表 2　芯片对不同浓度细菌的捕获率(%,n = 6,$\bar{x} \pm s$)

细菌浓度(CFU/μl)	对照组	实验组	实际捕获率
(1.02 ~ 2.70) × 10^6	18.52 ± 0.28	58.52 ± 6.58[b]	40.00 ± 5.81
(1.15 ~ 1.80) × 10^5	23.86 ± 7.90	83.07 ± 0.60[a]	59.97 ± 6.90[b]
(1.60 ~ 3.00) × 10^4	24.83 ± 12.10	84.37 ± 2.28[a]	59.54 ± 10.70[b]
(1.66 ~ 3.40) × 10^3	19.05 ± 7.33	83.01 ± 0.66[a]	63.96 ± 7.12[b]

a: P < 0.01, b: P < 0.05, 与对照组比较

3　讨论

本研究运用基于免疫微珠的微流控芯片成功地实现了对 EHEC O157: H7的特异性捕获。现有研究表明,以简单构型的通道作为固定抗体的载体,由于有限的三维结构空间和比表面积,其免疫捕获效率受到较大限制[10]。因此,为了提高芯片的捕获效率,本研究采用了具有微米级粒径的玻璃微珠作为抗体固定的载体填充于芯片内,可提高抗体固定载体的比表面积和抗原抗体反应的接触面积,还可通过缩小微珠的粒径,进一步增加芯片内抗体修饰的固相表面积,为进一步提高免疫分选效率提供了可能。微珠易于更换和填充,既可增加芯片的利用率,又可通过填充经不同抗体修饰的微珠来实现对不同目标致病菌的分选;将微珠的抗体修饰这一步骤在芯片外完成后再将其填充入微通道中,可避免抗体吸附于非细菌捕获区域,使芯片的各集成单元功能更加分明。

芯片壁、微珠间隙可能会对细菌产生非特异性吸附或残留,细菌也能在通道和富集腔内因重力作用而自然沉降,因此利用非特异性吸附力较抗原-抗体结合力小这一特征,通过优化细菌捕获后的冲洗流速和冲洗时间,以降低芯片的非特异性吸附,保证其对靶细菌的特异性捕获效率[11]。本研究中的最佳进样流速、冲洗流速、冲洗时间分别为 5、10 μl/min 和 5 min。实验结果显示,随着冲洗流速的增加,芯片对细菌的特异性捕获率也逐渐增加,但在 20 μl/min 流速下捕获率却降低,这是由于过大的流速会导致富集腔内微珠的堆砌,堆砌的微珠会增加细菌在芯片内的非特异性残留,从而降低了芯片对细菌的实际捕获率。

芯片在最优条件下对 1.66 × 10^3 ~ 2.70 × 10^6 CFU/μl 浓度范围内细菌的实际捕获率为 40.00% ~ 63.96%,细菌的富集/捕获在芯片上在线完成。其中 10^6 CFU/μl 浓度细菌实际捕获率仅为 40%,可能是注入的细菌量已超过微珠表面抗体位点的数量而达到饱和,导致捕获率降低。在目前的微流控细菌检测芯片的研究中,大多数是在芯片外对细菌进行富集/捕获,如 Xia 等[12]在芯片外用常规磁分选装置捕获 *E. coli* (HB101 K-12),再将捕获有细菌的磁珠混合于红细胞溶液中注入微流控芯片,利用芯片的双“Y”字型微通道和微型高梯度磁场集中器(HGMC)将细菌从混合液中分离出来,分离效率达到 44% ~86%,但芯片结构较复杂,磁珠价格昂贵,而且细菌的富集/捕获并未在芯片上在线进行。也有少数研究在芯片上实现了对细菌的捕获,如 Yang 等[10]用结合了介电电泳的直通道免疫微流控芯片对单增李斯特菌进行捕获,但捕获率仅为 20.7%。

用本芯片进行样品分选时,包括进样和冲洗时间在内,整个细菌的富集/捕获时间可控制在 10 min 以内,较需要数小时完成的常规免疫方法具有显著的速度优势。而且芯片装置简单、造价低廉,所需样品及试剂耗量仅在微升级,易于发展成为便携式、微缩化的致病菌快速检测装置。本研究对芯片富集/捕获目标致病菌的条件进行了探索和优化,提高了芯片的捕获效率,为下一步发展高灵敏度的致病菌快速检测系统奠定了前期实验基础。

参考文献：

[1] Deisingh A K, Thompson M. Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 in foods[J]. J Appl Microbiol, 2004, 96(3): 419 – 429.

[2] Jing G, Polaczyk A, Oerther D B, *et al*. Development of a microfluidic biosensor for detection of environmental mycobacteria[J]. Sens Actuators B Chem, 2007, 123(1): 614 – 621.

[3] Chen Z, Mauk M G, Wang J, *et al*. A microfluidic system for saliva-based detection of infectious diseases[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1098: 429 – 436.

[4] Ikeda M, Yamaguchi N, Tani K, *et al*. Rapid and simple detection of food poisoning bacteria by bead assay with a microfluidic chip-based system[J]. J Microbiol Methods, 2006, 67(2): 241 – 247.

[5] Beyor N, Seo T S, Liu P, *et al*. Immunomagnetic bead-based cell concentration microdevice for dilute pathogen detection[J]. Biomed Microdevices, 2008, 10(6): 909 – 917.

[6] Lee W C, Lien K Y, Lee G B, *et al*. An integrated microfluidic system using magnetic beads for virus detection[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008, 60(1): 51 – 58.

[7] Lee S J, Park J S, Im H T, *et al*. A microfluidic ATP-bioluminescence sensor for the detection of airborne microbes[J]. Sens Actuators B Chem, 2008, 132(2): 443 – 448.

[8] 刘长春，崔大付，王 利. 聚二甲基硅氧烷微流体芯片的制作技术[J]. 传感器技术，2004，23(7)：77 – 80.

[9] 孟 斐，陈恒武，方 群，等. 聚二甲基硅氧烷微流控芯片的紫外光照射表面处理研究[J]. 高等学校化学学报，2002，23(7)：1264 – 1268.

[10] Yang L, Banada P P, Chatni M R, *et al*. A multifunctional micro-fluidic system for dielectrophoretic concentration coupled with immunocapture of low numbers of Listeria monocytogenes[J]. Lab Chip, 2006, 6(7): 896 – 905.

[11] 黄 辉，郑小林，蒲晓允. 微流控芯片技术在生物学中的应用[J]. 重庆医学，2006，35(10)：950 – 952.

[12] Xia N, Hunt T P, Mayers B T, *et al*. Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow[J]. Biomed Microdevices, 2006, 8(4): 299 – 308.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2009)10-0890-01

类风湿性关节炎肺损伤合并侵袭性肺曲霉病1例

席学莉[1]，卢冰冰[2]，高占成[2]（[1]贵阳医学院附属医院呼吸内科，贵阳 550004；[2]北京大学人民医院呼吸内科，北京 100044）

患者，男性，68岁。因间断咳嗽30 d，发热14 d于2007年3月7日入院。患者8年前被我院确诊为“类风湿关节炎”，半年前曾服“来氟米特、甲氨碟呤”等免疫抑制剂治疗。查体：双肺呼吸音清，未闻及干湿啰音，双侧尾指和无名指第1指间关节压痛，关节无明显肿胀，左侧手腕屈伸活动减弱，余各系统检查无异常。辅助检查：血常规示白细胞 16.61×10^9/L，中性粒细胞77.11%，血沉81 mm/h，结核菌素试验阳性。免疫学检查：抗环瓜氨酸肽抗体阳性，抗角蛋白抗体可疑阳性，类风湿因子175 IU/ml（正常值0～30 IU/ml），中性粒细胞细胞质抗体（ANCA）阴性，C反应蛋白151 mg/L（正常值<7.90 mg/L）。多次痰查结核杆菌阴性，支气管镜示左上叶支气管黏膜炎症改变，未见其他异常。

入院胸部CT示双肺上叶感染，左上肺坏死性肺炎，考虑感染性发热，予亚胺培南治疗5 d，仍发热、咳嗽、咳痰，复查胸部CT示左上肺大片实变，左上肺空洞形成。患者逐渐出现明显喘憋，胸片左肺呈“白肺”，右肺病变也明显加重，动脉血气分析（FiO_2 50%）示pH 7.49，$p(CO_2)$ 31 mmHg，$p(O_2)$ 47 mmHg，HCO_3^- 23.6 mmol/L，SaO_2 86%，氧合指数96 mmHg，病情进展为“急性呼吸窘迫综合征（ARDS）”，给予有创机械通气，抽血送检北大医院做半乳甘露聚糖抗原（GM）试验阳性，诊断侵袭性肺曲霉病，给予两性霉素B脂质体抗真菌治疗（150 mg/d），体温逐渐降为正常，呼吸窘迫改善，血气分析示氧合指数明显改善。机械通气中，多次支气管镜检查均可吸出大量脓痰，痰培养示金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌，痰真菌培养阴性，诊断为“呼吸机相关性肺炎”，根据药敏选用抗生素治疗。经抗真菌、抗细菌治疗，患者一般状态明显改善，氧合指数360 mmHg，肺内病灶明显吸收，遂脱机。撤机1周后，患者再次出现发热、咳嗽、喘弊加重，复查胸部CT示双肺弥漫渗出性改变，结合患者出现多关节疼痛，考虑风湿免疫肺损伤。给予激素治疗，上述症状明显改善。由于患者合并真菌性肺炎，激素剂量宜小，甲泼尼龙24 mg/d，加用环磷酰胺（CTX）200 mg/d，静脉滴注隔日治疗，继续两性霉素B治疗，上述症状好转，序贯口服甲泼尼龙、CTX和伏立康唑联合治疗，随访病情稳定，胸部CT仅左上肺残留空洞，双肺的渗出性病变基本吸收。

讨论

自从1935年Hamman和Rich 2位学者首次描述弥漫性特发性肺间质纤维化以来，目前已发现有200多种与间质性肺病相关的病因，其中主要有结缔组织病，如类风湿关节炎、系统性硬化症、原发干燥综合征等。由于长期或大剂量使用糖皮质激素、免疫抑制剂和细胞毒药物，免疫功能低下，很容易发生肺部感染。研究表明肺间质病变有免疫功能低下者，感染因素占第

（下转909页）

作者简介：席学莉，女，河南省洛宁县人，副主任医师，主要从事呼吸系统疾病方面的研究。E-mail：xixueli2664@sina.com

通信作者：高占成，E-mail：gaozhancheng5446@163.com

收稿日期：2009-02-02；修回日期：2009-03-01