

学校编码：10384  
学号：20520120153470

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_  
UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

超高灵敏流式检测技术在细菌  
检测中的应用

The Applications of High Sensitivity Flow Cytometry in the  
Detection of Bacteria

黄天逊

指导教师姓名：颜晓梅 教授

专 业 名 称：化学生物学

论文提交日期：2015 年 月

论文答辩时间：2015 年 月

学位授予日期：2015 年 月

答辩委员会主席：\_\_\_\_\_

评 阅 人：\_\_\_\_\_

2015 年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
<b>第一章 绪论 .....</b>	<b>1</b>
1.1 引言 .....	1
1.2 流式细胞术及其在微生物检测分析方面的应用 .....	1
1.2.1 流式细胞仪构成及检测参数.....	1
1.2.2 流式细胞术在细菌检测分析方面的应用.....	4
1.2.3 流式细胞术在细菌检测方面的局限性.....	7
1.3 超高灵敏流式检测技术及其在微生物检测分析中的应用 .....	8
1.3.1 超高灵敏流式检测装置（HSFCM） .....	8
1.3.2 HSFCM 在细菌检测分析方面的应用 .....	9
1.4 本论文的选题思路以及研究内容 .....	13
参考文献 .....	15
<b>第二章 单细菌水平低拷贝的<math>\beta</math>-半乳糖苷酶的检测.....</b>	<b>25</b>
2.1 引言 .....	25
2.2 材料与方法 .....	28
2.2.1 仪器与设备.....	28
2.2.2 实验材料与试剂.....	29
2.2.3 实验部分.....	31
2.3 实验结果与讨论 .....	34
2.3.1 <i>E. coli</i> BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3)中低拷贝 $\beta$ -半乳糖苷酶的检测原理 .....	34
2.3.2 $\beta$ -半乳糖苷酶染色条件的优化 .....	36
2.3.3 HSFCM 检测 <i>E. coli</i> BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3)中 $\beta$ -半乳糖苷酶的表达 .....	41
2.3.4 使用 MUG 法对细菌表达的 $\beta$ -半乳糖苷酶进行定量分析.....	44
2.4 本章小结 .....	52
参考文献 .....	53

<b>第三章 HSFCM 应用于混合菌中少量耐药细菌的检测 .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 引言 .....</b>	<b>59</b>
<b>3.2 材料与方法 .....</b>	<b>63</b>
3.2.1 仪器与设备.....	63
3.2.2 实验材料与试剂.....	64
3.2.3 实验部分.....	65
<b>3.3 实验结果与讨论 .....</b>	<b>69</b>
3.3.1 耐药菌双荧光检测的原理.....	69
3.3.2 荧光染料的选择.....	70
3.3.3 抗体检测细菌耐药性的可行性分析.....	71
3.3.4 耐药菌抗体和核酸染色可行性分析.....	72
3.3.5 耐药菌和敏感菌的混合样品的检测.....	75
3.3.6 使用头孢硝噻吩对混合菌中少量耐药菌的检测.....	76
3.3.7 K-B 药敏纸片实验法检测混合菌中低比例的耐药菌.....	78
3.3.8 临床样品中耐药菌的检测.....	79
<b>3.4 本章小结 .....</b>	<b>84</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>85</b>
<b>第四章 HSFCM 应用于牛奶中细菌的检测.....</b>	<b>90</b>
<b>4.1 引言 .....</b>	<b>90</b>
<b>4.2 材料与方法 .....</b>	<b>94</b>
4.2.1 仪器与设备.....	94
4.2.2 实验材料与试剂.....	95
4.2.3 实验部分.....	96
<b>4.3 实验结果与讨论 .....</b>	<b>98</b>
4.3.1 牛奶中细菌中总菌的检测原理.....	98
4.3.2 生奶中活菌的检测原理.....	98
4.3.3 HSFCM 检测牛奶中总菌的条件优化.....	100
4.3.4 牛奶中总菌浓度的检测.....	101
4.3.5 牛奶中死菌和活菌的检测可行性分析.....	103
4.3.6 生奶中活菌的检测.....	105
4.3.7 不同的储存温度对生奶中活菌浓度的影响.....	107

4.4 本章小结 .....	110
参考文献 .....	111
<b>第五章 总结与展望 .....</b>	<b>114</b>
5.1 总结 .....	1144
5.2 展望 .....	115
在学期间发表的论文 .....	117
致 谢.....	119

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Contents

<b>Abstract (in Chinese)</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract (in English)</b> .....	<b>III</b>
<b>Chapter1. Preface</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 FCM and its applications in microbiology</b> .....	<b>1</b>
1.2.1 Structure and principle of FCM and detection parameter.....	1
1.2.2 Applications of FCM in bacteria detection and anagnosis.....	4
1.2.3 Limitation of FCM in bacteria detection .....	7
<b>1.3 HSFCM and its applications in microbiology</b> .....	<b>8</b>
1.3.1 Introduction of HSFCM.....	8
1.3.2 Applications of HSFCM in bacteria detection and analysis .....	9
<b>1.4 Objectives and main contents of this dissertation</b> .....	<b>13</b>
<b>References</b> .....	<b>15</b>
<b>Chapter 2. Application of HSFCM in detection of low copy number</b>	
<b><math>\beta</math>-galactosidase at sigle bacterial cells level</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1 Introduction</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2 Materials and methods</b> .....	<b>28</b>
2.2.1 Instruments.....	28
2.2.2 Materials and reagents .....	29
2.2.3 Experimental section.....	31
<b>2.3 Results and discussion</b> .....	<b>34</b>
2.3.1 Principle of low copy number $\beta$ -gal detection in <i>E. coli</i> BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3) by HSFCM.....	34
2.3.2 Optimization of experimental condition for $\beta$ -gal staining .....	36
2.3.3 Detection of $\beta$ -gal in <i>E. coli</i> BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3) by HSFCM.....	41
2.3.4 Quantification of $\beta$ -gal in <i>E. coli</i> BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3) by MUG assay .....	44

Conclusion .....	52
References .....	53
<b>Chapter 3. Detection of minority populations of resistant bacterial cells by HSFCM at the Single Bacterial cell Level .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 Introduction .....</b>	<b>59</b>
<b>3.2 Materials and methods.....</b>	<b>63</b>
3.2.1 Instruments.....	63
3.2.2 Materials and reagents .....	64
3.2.3 Experimental section.....	65
<b>3.3 Results and discussion.....</b>	<b>69</b>
3.3.1 Principle of the antibiotic bacterial cells detection by HSFCM .....	69
3.3.2 Selection of fluorescent dye.....	70
3.3.3 Feasibility of bacterial drug resistance detection of antibody staining.....	71
3.3.4 Feasibility of bacterial drug resistance detection of antibody and nucleic acid dye dual-staining .....	72
3.3.5 Analysis of the mixture of antibiotic resistant and sensitive bacterial cells	75
3.3.6 Detection of resistant bacteria in a mix sample using traditional colometric substrate nitrocefin.....	76
3.3.7 Detection of resistant bacteria in a mix sample using the disc diffusion test (K-B method).....	78
3.3.8 Detection of resistant bacteria of clinical samples.....	79
<b>3.4 Conclusion.....</b>	<b>84</b>
<b>References .....</b>	<b>85</b>
<b>Chapter 4. Application of HSFCM in detecion of viable bacteria in raw milk .....</b>	<b>90</b>
<b>4.1 Introduction .....</b>	<b>90</b>
<b>4.2 Materials and methods.....</b>	<b>94</b>
4.2.1 Instruments.....	94
4.2.2 Materials and reagents .....	95
4.2.3 Experimental section.....	96
<b>4.3 Results and discussion.....</b>	<b>98</b>



4.3.1 Principle of total bacterial concentration detection in milk .....	98
4.3.2 Principle of viable bacterial concentration detection in raw milk .....	98
4.3.3 Optimization of experimental condition of bacteria detection by HSFCM .....	100
4.3.4 Bacterial concentration detection by HSFCM .....	101
4.3.5 Feasibility of viable bacteria detection in milk .....	103
4.3.6 Viable bacteria detection in raw milk .....	105
4.3.7 Influence of storage temperature to raw milk .....	107
<b>4.4 Conclusion .....</b>	<b>110</b>
<b>References .....</b>	<b>111</b>
<b>Chapter 5. Summary and prospects.....</b>	<b>114</b>
<b>5.1 Summary .....</b>	<b>114</b>
<b>5.2 Prospects.....</b>	<b>115</b>
<b>Publications .....</b>	<b>117</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>119</b>

## 摘要

自然界中存在着许多微纳米尺寸的生物颗粒，比如细菌、病毒、分子组装体和生物大分子等。其中细菌具有体形微小、繁殖迅速、容易变异及环境适应能力强等特点，对人们的日常生活与生产具有诸多影响。一方面经过基因改造的工程菌在生物、医学、医药、工农业生产、环境治理等众多领域发挥着重要的应用。另一方面，各种致病菌的存在严重威胁着人类的生存和健康：不仅影响食品的质量和食品安全，而且带有耐药性的致病菌往往容易导致疾病治疗的失败。然而，传统的细菌检测方法操作复杂、检测周期长，难以满足实际需求。因此，发展快速、灵敏、特异的细菌检测分析方法对食品安全、环境监测、疾病机理及诊断治疗和生物恐怖袭击的防范等方面具有重要意义。

流式细胞术（Flow Cytometry, FCM）是一种对单个细胞或细胞大小的颗粒进行快速定量分析和分选的先进技术。细菌个体微小，内部结构简单，表达的生物分子相对较少，由于检测灵敏度的限制，传统流式细胞仪对细菌的检测依然存在较大的局限。本实验室于 2009 年研制成功一台超高灵敏流式检测装置（HSFCM），其检测灵敏度比传统流式细胞仪高几百倍甚至上千倍，已经被开发应用于众多化学生物学体系的研究中。在本论文中，将利用 HSFCM 具有的超高灵敏度特性，建立一个在单细菌水平进行多参数检测分析的平台。

本论文主要包括以下几个方面的内容：

在细菌中，存在许多低拷贝的重要的蛋白和转录因子，发展高灵敏的检测分析方法对于低拷贝蛋白的检测具有重要的意义。 $\beta$ -半乳糖苷酶是一种在原核和真核微生物体系中最成熟、最常用的报告分子。第二章主要对本底表达的低拷贝的 $\beta$ -半乳糖苷酶的进行检测分析。实验采用基因组含有 *lacZ* 基因的大肠杆菌 *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) 作为检测模型。通过 MUG 定量法确定每个细菌在不同浓度诱导剂 IPTG 存在的条件下所表达的 $\beta$ -半乳糖苷酶的平均拷贝数。利用跨膜荧光染料 C<sub>12</sub>FDG 对细菌中低拷贝的 $\beta$ -半乳糖苷酶染色，可以获得不同浓度诱导剂下 $\beta$ -半乳糖苷酶的荧光分布统计直方图，并经过换算最终得到 $\beta$ -半乳糖苷酶拷贝数的分布直方图。通过该方法，最终测得最低为 21 个 $\beta$ -半乳糖苷酶拷贝数的本底表

达。

临床上,经常会存在多种耐药菌共存于病人体内的情况,并且可能含有极低比例的耐药菌存在,如果给药不当,可能会导致原本比例极低的耐药菌成为优势菌,进而影响疾病的治疗。第三章主要介绍使用 HSFCM 对细菌耐药性的检测,尤其是混合菌中少量耐药菌的检测。实验选择大肠杆菌 *E. coli* JM109 作为敏感菌模型,大肠杆菌 *E. coli* JM109/pUC19 作为耐药菌模型。通过荧光抗体与核酸染料进行双荧光染色,实现单细菌水平细菌耐药性的免疫荧光检测。并且通过所建立的检测平台,实现对混合样品中耐药菌的相对含量的定量检测,所测得的结果与理论值有良好的一致性,并且混合样品中当耐药菌比例低至 0.1 % 也能被准确检测。通过与传统的药敏实验对比,我们的结果可靠并且检测速度快,同时检测结果优于传统药敏纸片和使用头孢硝噻吩作为显色底物检测的方法。另外结合 PCR 验证的方法,所建立的耐药菌免疫荧光检测的方法能够对 PCR 筛选得到的阳性临床样本中的耐药菌进行检测。

未经灭菌处理的生奶中会有活菌存在,而活菌的浓度会直接影响生奶的质量。第四章主要介绍 HSFCM 对牛奶中活菌浓度进行检测的应用。通过使用核酸染料对细菌进行染色,使用 HSFCM 同时对细菌的散射光和核酸染色信号进行检测。首先采用大肠杆菌 *E. coli* ER2738 作为模型菌验证 HSFCM 检测牛奶中细菌浓度的准确性,其结果与传统的基于平板培养的方法具有良好的一致性。然后使用该方法结合鉴别死菌活菌的核酸染料 SYTO 9/PI 对生奶中的所有细菌进行染色,使用 HSFCM 对这两种核酸染料的检测信号进行检测,可检测得到生奶中的活菌浓度。

**关键词:** 超高灵敏流式检测装置; 单细菌水平;  $\beta$ -半乳糖苷酶; 细菌耐药性; 生奶细菌检测

## **Abstract**

There are a wide variety of biological particles which fall into the nanometer to sub-micron scale such as bacteria, viruses, molecular assemblies and biomacromolecules. Having the characteristics like small size, propagation rapidly, variation easily and strong adaptability of environmental, bacteria could affect the people's daily lives and production. The engineered bacteria play an important role in the field of bio-engineering, medicine, pharmaceutical, industrial and agricultural production and environmental governance and so on. What's more the pathogenic bacteria not only influence the quality of food but also lead to therapeutic failures of disease if the bacteria carried resistant gene. However, the traditional methods of bacteria detection are it is labor-intensive, time-consuming, and of limited usage in certain circumstances and difficult to meet the actual needs. Rapid, sensitive and specific detection of bacteria is vital to food safety, environmental monitoring, pathogenesis, diagnosis and treatment of diseases and prevention of bioterrorism.

Flow cytometry is a well-established technology widely used for the analysis and sorting of individual biological cells or cellsize particles in a rapid, quantitative, and multiparameter manner. However, due to the small size, simple internal structure, and the low copy numbers of specific biomolecule, it is still a great challenge for the commercial flow cytometer for bacteria detection at present. In our laboratory, we have built a high sensitivity flow cytometer (HSFCM) in 2009, which is 2-3 order of magnitudes more sensitive than commercial flow cytometers. HSFCM have been successfully applied in the analysis of some chemical biological systems.such as bacteria and mitochondria. In this dissertation, we attempted to develop a versatile and multiparameter platform for the bacteria detection at the single bacterial cell level. This dissertation consists of the following sections:

As many essential proteins and most transcription factors are produced at a low copy number, analytical tools with superior sensitivity to enable the analysis of low

abundance proteins in single cells are in high demand.  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) has been the standard cellular reporter for gene expression in both prokaryotic and eukaryotic cells. chapter two describes the detection of low copy number  $\beta$ -galactosidase of bacteria. The *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3) which genome contained *lacZ* gene was chosen as a model system and the  $\beta$ -gal expressed was detected by HSFCM. The average copy number of  $\beta$ -gal could be acquired by the Quantitative MUG fluorometric assay at different IPTG concentration. The distribution of the copy number of  $\beta$ -gal could be converted by the fluorescence histogram of by the C<sub>12</sub>FDG staining. Upon this method, the copy number of  $\beta$ -gal at the basal level is 21.

In clinical settings, individuals could be simultaneously infected with multiple strains and antibiotic-resistant strains may represent only a very small fraction of the total bacterial population. However, if antibiotics is inappropriately prescribed, antibiotic-resistant pathogens could outcompete susceptible strains and become the dominant population. chapter three describes the application of HSFCM in antibiotic resistance especially for the minority resistant bacteria detection at the single bacterial cell level. The *E. coli* E. coli JM109 and *E. coli* JM109/pUC19 which encodes TEM-1  $\beta$ -lactamase were used as models of antibiotics sensitive and resistant strains. By dual-staining bacteria with both the nucleic acid dye (SYTO 62) and the fluorescent  $\beta$ -lactamase antibody, the proportions of antibiotic resistant cells in the mixture can be quantitatively measured by HSFCM. Minority populations as low as 0.1 % of the resistant bacteria can be accurately detected in a mixture, demonstrating the superiority of HSFCM for the detection of rare resistant cells on the top of a large population of sensitive cells. And the disc diffusion test (K-B method) and the analysis of nitrocefin were also used to compare with the method we developed. Combined with PCR assay, clinical samples which contained TEM-1  $\beta$ -lactamase could be detected by HSFCM.

There are some viable bacteria exist in raw milk and influence the quality of milk. chapter four describes the application of HSFCM in viable bacteria detection in milk. The *E. coli* ER2738 was chosen as a model strains, by staining with nucleic acid dye PicoGreen, the total bacteria we added in UHT milk could be detected and good

correlations between the results measured by HSFCM enumeration and the traditional plate-counting method were obtained. Then the other two nucleic acid dyes (SYTO 9 & PI) for live and dead bacteria detection were used for the viable bacteria in raw milk.

**Keywords:** HSFCM; single bacterial level;  $\beta$ -galactosidase; antibiotic resistance of bacteria; bacteria detection in raw milk.

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 绪论

### 1.1 引言

流式细胞术 (Flow Cytometry) 是一种对悬液中的细胞或生物颗粒进行单细胞水平快速定量检测分析和分选的技术, 能够实现对细胞的大小、内部结构、核酸、蛋白质等多项物理、化学及生物参数的测定。结合单克隆抗体标记和荧光定量分析等技术, 流式细胞术在细胞生物学、分子遗传学、分子生物学、微生物学、免疫学以及临床肿瘤学、血液学等许多方面发挥着重要的应用。

### 1.2 流式细胞术及其在微生物检测分析方面的应用

从第一台流式细胞仪 (Flow Cytometer, FCM) 问世至今, 研究者不断对其进行发展和完善, 其应用领域从细胞生物学扩大到肿瘤学、血液学、免疫学、药理学、临床检验等诸多方面。其特点有: 1) 快速, 每秒最高可检测数万个细胞; 2) 多参数, 能同时实现细胞的物理、化学及生物性质的多参数测定; 3) 通量高, 短时间内可得到大量数据, 获得细胞性状的统计分布直方图以及参数间大量的相关信息等。目前, 流式细胞仪已经成为日益完善的细胞分析和分选的重要工具<sup>[1]</sup>。

#### 1.2.1 流式细胞仪构成及检测参数

无论是临床型、科研型还是最新型流式细胞仪, 其内部结构的组成基本相同。基本结构主要包括以下 5 个部分: 第一部分为流动室及液流驱动系统, 核心部件为流动室 (Flow Chamber 或 Flow Cell), 待检测样品在此与激光相交; 第二部分为激光光源和光束成形系统, 目前常用的光源是各类不同波长的激光器, 比如常用的 375、488、532、647 nm 波长的激光器, 样品流被激光照射后可以检测到散射光或者标记的荧光信号; 第三部分为光学系统, 包括透镜、滤光片等, 这部分系统主要负责将信号收集并分解成不同的检测波长同时除去干扰的信号; 第四部分为信号检测、存储、显示和分析系统, 这部分系统主要是将得到的信号进行采集整理并进行后续分析; 第五部分为细胞分选系统, 具备分选功能的仪器才有此

系统，主要包括喷嘴和电偏转板以及捕获管等<sup>[1; 2]</sup>。流式细胞仪主要用于检测悬浮液中的单细胞或颗粒的信号。图 1.1 所示的为流式细胞仪的光路结构示意图，通常是将需要检测的细胞或颗粒进行荧光标记染色后制成悬液样本，在一定气压下将待测样品压入到流动室，用不含细胞或颗粒的缓冲液(鞘液)在高压下从鞘液管喷出，鞘液管的入口方向与待测细胞或颗粒的样品流成一定角度，使鞘液环绕着细胞或颗粒高速流动，形成一圆形并与样品流互相平行的互不干扰的流束(即鞘流)，样品流在鞘液的作用下被流体力学聚焦，待测细胞形成单行排列，依次逐个通过流式细胞仪的检测区域。流式细胞仪使用激光作为激发光源，经过聚焦整形后的光束垂直照射在样品流上，使得被荧光染色的细胞或颗粒在激光束的照射下产生散射光和激发荧光，通过不同的滤光片后信号可以被不同的检测通道所收集。

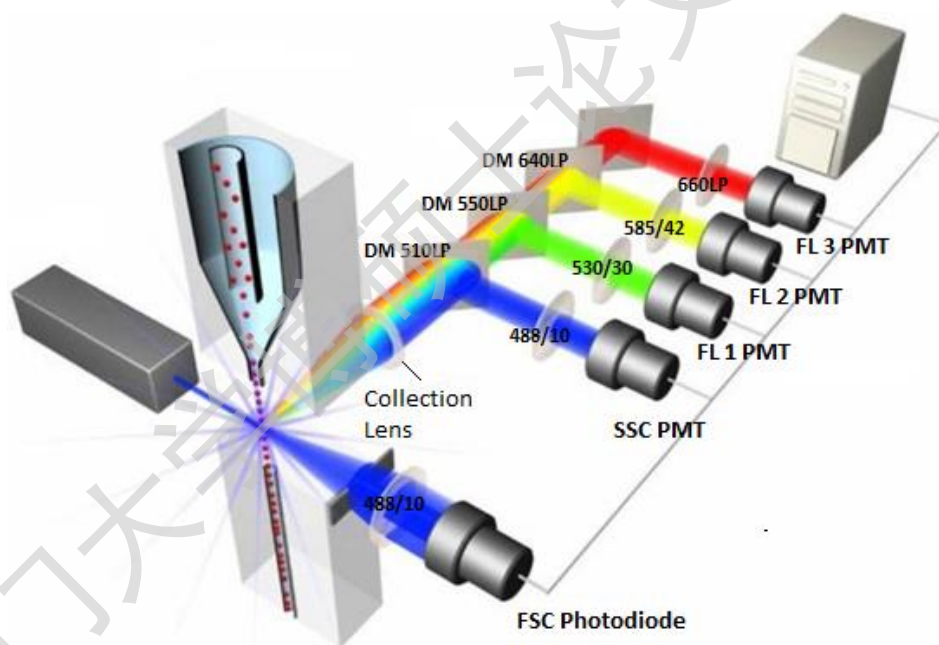


图 1.1 流式细胞仪的光路结构示意图<sup>[3; 4]</sup>

Fig 1.1 The optics system of the FCM. The optical elements include lens, long-pass filter, short-pass filter and band-pass filter<sup>[3; 4]</sup>.

流式检测获得的信号主要分为散射光和荧光信号，其中散射光分为前向角散射（Forward Scatter, FSC）和侧向角散射（Side Scatter, SSC），散射光不依赖任何细胞样品的制备技术（如染色），因此被称为细胞的物理参数或固有参数，前向角散射与被测细胞或者颗粒的大小有关，如图1.2所示，确切说与细胞直径密切相关，通常选取FSC作为阈值，来排除样品中的各种碎片及鞘液中的小颗粒的



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库