细菌的流式检测

Flow Cytometric Analysis of Bacteria

闵娟，关武祥*

中国科学院武汉病毒研究所，武汉，湖北省

*通讯作者邮箱: guanwx@wh.iov.cn

引用格式：闵娟，关武祥. (2019). 细菌的流式检测. *Bio-101* e1010317. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010317.

How to cite: Min, J. and Guan, W. X. (2019). Flow Cytometric Analysis of Bacteria. *Bio-101* e1010317. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010317. (in Chinese)

摘要：传统的细菌检测（如平板法和显微技术）耗时长、误差大、操作繁琐并且无法提供细菌种属和生物学状态信息。近年来，随着荧光染料、结构光学和流式细胞检测仪自身的不断发展，利用流式细胞术（FCM）检测细菌等微生物成为可能。与传统细菌检测方法相比，FCM 具有灵敏、快速、精确、高效的优势，同时结合其多参数数据采集特点，FCM 可提供多种细菌的生物学信息，在实验室研究、临床诊断、工业生产、环境监测等众多领域极具应用前景。本方案以污水中的大肠杆菌（*E. coli*）为例，介绍如何利用 FCM 分析零价铁基微球（A-mZVI）对其灭活去污效果。

关键词：细菌，大肠杆菌，零价铁基微球，流式细胞仪

材料与试剂

1. 零价铁基微球（自制）
2. *E. coli* (Coli Genetic Stock Center)
3. 无水氯化亚铁 (FeCl_2 ，国药集团，catalog number: XW77589431)
4. 乙二胺 (EDA，国药集团，catalog number: 10009518)
5. 硼氢化钠 (NaBH_4 ，国药集团，catalog number: 80115816)
6. 氩气 (武汉祥云化工有限公司)
7. 无水乙醇 (EtOH ，国药集团，catalog number: XW00641752)
8. 去离子水 ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ，由 Milli-Q Gradient System 制取)
9. LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen, catalog number: L-13152)

10. 0.85% NaCl 缓冲液

11. LB 培养基

12. PBS 溶液

仪器设备

1. 高压灭菌锅 (Zealway)
2. N52 NdFeB 磁铁 (K&J Magnetism)
3. 流式细胞仪 (BD, model: FACS AriaIII)
4. 恒温振荡器 (倍英, model: THZ-D)
5. 细菌培养箱
6. 比浊仪 (上海昕瑞, model: WGZ-2XJ)
7. 隔水式恒温培养箱 (GNP-9160)
8. 离心机
9. 低温冰箱

软件

1. FlowJo 软件

实验步骤

一、零价铁基微球 (A-mZVI) 的制备

1. 氩气氛围下, 将 75 ml 0.9 M 的 EDA 加入到 300 ml 的 FeCl_2 水溶液中 (0.075 mol/L) 中, 剧烈搅拌 3 分钟。
2. 往上述溶液中加入 75 ml 1.6 M 的 NaBH_4 水溶液, 继续搅拌 25 分钟, 直至溶液中不再有气泡产生为止。
3. 离心收集黑色沉淀 ($4,000 \times g$, 30 min), 先后用去离子水和无水乙醇反复洗涤三次, 经红外灯干燥后获得最终产物 (A-mZVI)。

二、含 *E. coli* 污水的制备

1. 将 -70°C 冷冻干燥保存的 *E. coli* 菌株接种于高压蒸汽处理过的 LB 培养基中, 置

于 37 °C 恒温培养箱中继续过夜。

2. 利用比浊仪 (OD₆₀₀) 检测细菌是否处于对数生长期 (OD 值为 0.35~0.6 之间)。
3. 将处于对数生长期的细菌离心分离 (10,000 × g, 10 分钟), 洗涤 3 次后重悬于 0.85% NaCl 的水溶液中。

三、流式细胞术分析 A-mZVI 对 *E. coli* 的灭菌效果

1. 取一定量的 A-mZVI 与 50 ml 含 *E. coli* 的菌液共孵育。
2. 在不同时间间隔, 取 5 ml 上述混合液, 通过 N52 NdFeB 磁铁分离后取出上清液, 用于后续流式分析其中 *E. coli* 的数量和存活状态。
3. 样本用 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit 进行染色处理。按照厂家说明书将试剂盒中组分 A: SYTO 9 (3.34 mM) 和组分 B: PI (20 mM) 按照 1:1 比例混合于适当体积的无菌 PBS 溶液中, 摇匀, 取 0.8 ml 上述混合液加到含 *E. coli* 的上清液中, 在黑暗环境下室温孵育 15 min, 无菌 PBS 洗涤 3 次后重悬于 0.5 ml 无菌 PBS 溶液中, 完成实验组样本的制作。
4. 取未经 A-mZVI 处理的菌体 PBS 悬液不进行任何染色, 作为双阴性对照; 未经处理的细菌生物用 SYTO 9 单独染色作为单阳性对照; 75%酒精处理 30 min 的细菌用 PI 单独染色作为另一单阳性对照。
5. FCM 检测: FCM 检测光源为氩灯 (激发光波长 488 nm)。设前向角 (FSC) 和侧向角 (SSC) 的信号值为对数放大, FSC 反映了细胞直径的大小, SSC 反映了细胞内颗粒的复杂程度。建立双参数 FSC/SSC 散点图和双参数 SYTO9-A/PI-A 散点图, 根据其信号调节光电倍增管电压, 得到合适的 FCM 图。重悬的菌液浓度为 $2 \times 10^5 \sim 10^7$ 个/ml, 其中收集 10,000 个细菌作流式分析。在双参数 FSC/SSC 散点图中找到细菌最集中的区域设门, 圈出所需要分析的细菌。FITC 通道检测波长 530/30 nm, PE 通道检测波长 586/15 nm, FITC 通道收集 SYTO 9 的绿色荧光, PE 通道收集 PI 的红色荧光, 获取 FITC/PE 散点图, 并用 FlowJo 软件进行数据分析。

结果与分析

零价铁 (A-mZVI) 作为一种新型处理剂常用于水处理修复, 其具有低价无毒、来源广泛、制备方法简便、反应速度较快的优势。对于微生物污染物而言, A-mZVI 可发生芬

顿反应，产生具有强氧化性的活性氧自由基 (ROS)，致使微生物发生氧化损伤，进而实现高效灭活的目的 (Lv 等，2017；Sun 等，2019)。

流式细胞术 (FCM) 在污水细菌监测中具有测定精准、样品前处理简单、可快速的对多参数数据进行采集，以及可对多元数据进行分析等优点。因此，我们利用 FCM 分析模拟的污水中 *E. coli* 的数量和存活状态，以此评价 A-mZVI 对 *E. coli* 的灭菌效果。如图 1 所示，初始菌液 (图 1A，未经 A-mZVI 处理组) 中，绝大部分细菌 (90%) 处于活菌状态，加入 A-mZVI 处理后，细菌存活率急剧下降。其中，加入 A-mZVI 处理 1 小时后，*E. coli* 存活率下降至 32.6% (图 1B)；2 小时后，*E. coli* 存活率下降至 19.5% (图 1C)。结果表明，A-mZVI 具有优异的抗菌效果，且呈时间依赖性。

图 1. *E. coli* 经 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit 染色后的流式细胞分析结果. A. 空白组； B. A-mZVI 处理 1 小时； C. A-mZVI 处理 2 小时。细胞被分为四个子集：左下、右下、左上和右上象限依次代表阴性背景、活细菌、死细菌和损伤细菌。

失败经验

1. 因细菌比较小，在流式检测时为减少杂信号的影响，通常会加入 FSC-H 和 FSC-A 的散点图去除粘连。
2. 细菌浓度需要控制。实验中，我们发现制备 1×10^7 个/ml 浓度的细菌进行染色后，测出的流式结果比较好。
3. 除了大肠杆菌，其他菌种 (如：乳酸菌、趋磁细菌、化脓性链球菌、球芽孢杆菌、草生欧文氏菌等) 也可利用流式细胞术，分析细菌浓度、细菌活力、种属、群体分化等相关指标。

致谢

本文实验方案改编自 Sun 等 (2019), 所述零价铁基微球和含菌污水由华中师范大学化学学院提供, 相关流式细胞检测方法由中科院武汉病毒所分析测试中心建立并完成。

参考文献

1. Lv, Y., Niu, Z., Chen, Y. and Hu, Y. (2017). [Bacterial effects and interfacial inactivation mechanism of nZVI/Pd on *Pseudomonas putida* strain.](#) *Water Res* 115: 297-308.
2. Sun, H., Wang, J., Jiang, Y., Shen, W., Jia, F., Wang, S., Liao, X. and Zhang, L. (2019). [Rapid Aerobic Inactivation and Facile Removal of *Escherichia coli* with amorphous zero-valent iron microspheres: indispensable roles of reactive oxygen species and iron corrosion products.](#) *Environ Sci Technol* 53(7): 3707-3717.