

# 磁纳米散射探针暗场超灵敏检测具核梭杆菌

都美婧, 白亚南, 侯金秀, 周昕\*

扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009

都美婧, 白亚南, 侯金秀, 周昕. 磁纳米散射探针暗场超灵敏检测具核梭杆菌[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3346-3357

Du Meijing, Bai Ya'nan, Hou Jinxiu, Zhou Xin. Ultra-sensitive detection of *Fusobacterium nucleatum* with magnetic nanoparticle probe in dark-field[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3346-3357

**摘要:** 【背景】具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)作为机会致病菌, 能够引起许多感染性疾病, 已被证实是促直肠癌发展的潜在重要危险因素, 临床检测中亟需一种快速简单检测 *F. nucleatum* 的方法。【目的】通过建立一种磁纳米探针结合暗场显微镜直接观察计数的方法, 可方便快速地检测样本中具核梭杆菌的数量。【方法】在磁纳米颗粒(magnetic nanoparticle, MNP)表面修饰制备的抗 *F. nucleatum* 抗体, 构建一种特异性结合 *F. nucleatum* 的 MNP 探针。此外, 比较 MNP 探针-暗场显微计数法与实时荧光定量 PCR (qPCR)方法检测 *F. nucleatum* 的灵敏度。【结果】该方法的检测限可低至  $3.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ , 比 qPCR 的灵敏度高 5 倍左右。在实际样本的检测中, 该方法与 qPCR 方法所检测 *F. nucleatum* 数量保持一致。【结论】本研究建立的方法用于检测 *F. nucleatum*, 操作简单、检测快速(约 30 min)、灵敏且成本低, 有应用于临床样本检测的前景。

**关键词:** 具核梭杆菌; 磁纳米探针; 暗场显微镜; 超灵敏检测

## Ultra-sensitive detection of *Fusobacterium nucleatum* with magnetic nanoparticle probe in dark-field

DU Meijing, BAI Ya'nan, HOU Jinxiu, ZHOU Xin\*

College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] *Fusobacterium nucleatum*, an opportunistic pathogen causing infectious diseases, is a risk factor for the occurrence of colorectal cancer. Simple and rapid techniques are urgently needed for the detection of *F. nucleatum* in clinical practice. [Objective] In this study, we established a direct observation and counting method to count *F. nucleatum* cells in samples with

基金项目: 国家自然科学基金(31870989)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31870989)

\*Corresponding author: E-mail: zhou\_xin@126.com

Received: 2021-12-02; Accepted: 2022-01-24; Published online: 2022-02-17

magnetic nanoparticle (MNP) probe under dark-field microscopy. **[Methods]** We prepared the MNP probe by modifying MNPs with the homemade polyclonal antibodies against *F. nucleatum*, which can bind to *F. nucleatum* specifically. Furthermore, we compared the sensitivity of our method with that of real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) for detection of *F. nucleatum*. **[Results]** The method established in this study showed the limit of detection as low as  $3.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  and the sensitivity 5 times higher than that of qPCR. For detection of the real samples, the results of counting *F. nucleatum* by our method are consistent with that by qPCR. **[Conclusion]** The established method is simple, rapid (within about 30 min), sensitive, and economical for detecting *F. nucleatum*, which has the potential to serve the detection of clinical samples.

**Keywords:** *Fusobacterium nucleatum*; magnetic nanoparticle probe; dark-field microscopy; ultra-sensitive detection

具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)属于梭杆菌科, 是一种革兰氏阴性无芽孢专性厌氧杆菌, 为口腔共生菌, 可引起人类较严重的感染性口腔疾病<sup>[1]</sup>。近年来, *F. nucleatum* 引起口腔外的感染性疾病越来越多, 包括胃肠道疾病、不良妊娠反应和心血管疾病等<sup>[2]</sup>, 尤其是结直肠癌, 引起了众多学者的广泛关注<sup>[3]</sup>。因此, 需要一种快速、灵敏、低成本的方法检测 *F. nucleatum* 的感染。

随着科学技术的发展, 对于 *F. nucleatum* 的检测方法也不断增加, 目前常用的检测方法主要有细菌的分离培养与鉴定<sup>[4-5]</sup>、16S rRNA 基因测序<sup>[6-7]</sup>、聚合酶链反应(PCR)<sup>[8]</sup>、荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR)<sup>[9-11]</sup>、环介导的等温核酸扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)<sup>[12-13]</sup>、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>[14]</sup>等。虽然这些方法已经普遍应用于检测 *F. nucleatum*, 但仍然存在费时费力、操作复杂、成本高等缺点, 因此亟需一种超灵敏、快速、简单且低成本的方法以满足现场检测。

近年来出现的磁性纳米材料引起人们的广泛关注。磁性纳米材料具有粒径小、分布均匀、良好的磁导性、优良的生物兼容性、低毒性和可

以结合各种功能分子等优势, 被广泛用于靶向药物、细胞分离、生物检测、肿瘤治疗等生物医学领域, 在生物领域和医疗领域具有很大的发展前景<sup>[15-17]</sup>。磁纳米颗粒表面化学修饰功能基团后, 偶联抗体成为特异性探针, 可以捕获病原体, 在特殊显微镜下进行点样观察<sup>[18-20]</sup>。

在生物学各领域中, 最常用的是普通光学显微镜, 根据实验需求不同选择不同的显微镜。暗场显微镜是指光线通过暗场聚光镜斜射到标本上发生散射而对标本进行观察的显微镜。当光线斜射到物体轮廓时发生散射, 使得物体的轮廓呈现明亮的形状, 在暗背景下可直接识别出物体, 而且暗视野的分辨率远高于明视野<sup>[21-24]</sup>。当纳米材料与病原体结合后, 具有强散射光特征的纳米材料聚集在病原体外周, 使病原体明亮度提高, 从而清晰易辨。目前, 基于纳米材料的暗场显微镜成像技术作为实现病原体高灵敏、低背景的检测手段已得到了广泛的应用<sup>[25-26]</sup>。

本研究基于 protein G 可以和抗体的 Fc 段特异性结合的特点, 根据细菌大小选择合适的修饰有 protein G 的磁纳米颗粒(magnetic nanoparticle, MNP), 与抗 *F. nucleatum* 多克隆抗体结合, 制备可特异性标记 *F. nucleatum* 的

MNP 探针。通过制备成功的 MNP 探针与 *F. nucleatum* 共同孵育捕获 *F. nucleatum*, 在暗场显微镜下可快速灵敏地检测该菌, 以期对防控 *F. nucleatum* 引起的疾病提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种和实验动物

各种标准菌株: 具核梭杆菌(*F. nucleatum*) ATCC25586, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) 2738 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC44300。SPF 级 6 周龄 BALB/c 小鼠和 C57BL/6J 小鼠购自扬州大学实验动物中心。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

厌氧产气袋、厌氧培养袋、脑心浸出液肉汤培养基(BHI), 青岛海博生物技术有限公司; Protein A+G Agarose (Fast Flow)预装柱、5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、考马斯亮蓝染色液, 上海碧云天生物技术有限公司; 磁纳米材料 50 nm MNP@protein G, CD 公司; 10×磷酸盐缓冲液(PBS)、TMB 显色试剂盒、蛋白 Marker, 江苏凯基生物技术股份有限公司; 吐温-20, Biosharp 公司; 10% NCM Fast PAGE 聚丙烯酰胺凝胶预混液, 新赛美生物科技有限公司; 2×Taq Master Mix、DNA Marker、ChamQ Universal SYBR RT-qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技公司; 引物由南京擎科生物有限公司合成; DNA 提取试剂盒、质粒 DNA 小量试剂盒, 康宁生命科学(吴江)有限公司。

微量紫外-可见光分光光度计, Implen 公司; 样品混合器 HulaMixer™, Life Technology 公司; 蛋白电泳仪、脱色摇床、水平凝胶电泳仪, 北京六一生物技术有限公司; Tecani 12 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM), Royal Philips 公司; 荧光定量 PCR 仪

LightCycler®480-II, Roche 公司; 暗场显微镜, Nikon 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株培养

*F. nucleatum* 接种于 BHI 液体培养基置于厌氧培养袋中在 37 °C 静置培养 8 h; *E. coli* 和 *S. aureus* 接种于 LB 液体培养基中在 37 °C、220 r/min 有氧培养 8 h。

#### 1.2.2 抗 *F. nucleatum* 多克隆抗体的制备与纯化

取对数生长期( $OD_{600}$  约为 0.6)的 *F. nucleatum*, 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, PBS 清洗 3 次, 用 0.4%的甲醛溶液灭活 48 h 后, PBS 清洗 3 次, 通过微量紫外-可见光分光光度计用 0.9%的生理盐水将浓度调整为 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  作为免疫原。经皮下多点注射免疫小鼠, 每只小鼠注射剂量为 100  $\mu\text{g}$ , 于第 0、14、28 天进行 3 次免疫, 三免结束后 7 d, 通过小鼠尾静脉采血, 分离血清后于-80 °C 保存备用。采用 ELISA 的方法测定小鼠抗体效价, 具体步骤以 *F. nucleatum* 为抗原包被 96 孔酶标板, 每孔 100  $\mu\text{g}$ 。封闭后加入稀释的抗血清 37 °C 孵育 1 h。PBST (0.05%吐温-20)缓冲液洗 3 次后加入 HRP 标记的山羊抗鼠抗体, 37 °C 孵育 45 min 后用 TMB 显色, 于酶标仪测  $OD_{450}$ ,  $P/N > 2.1$  视为阳性结果。采用 Protein A+G Agarose (Fast Flow)预装柱进行抗体纯化, 使用微量紫外-可见光分光光度计和 SDS-PAGE 测定纯化后抗体的浓度和纯度, 纯化后的抗体于-80 °C 分装保存。

#### 1.2.3 MNP 探针的制备

50 nm、protein G 修饰的 MNP 探针制备方法如下: 吸取 20  $\mu\text{L}$  MNP (浓度为 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )置于 500  $\mu\text{L}$  低吸附离心管中, 加入 200  $\mu\text{L}$  PBST 稀释混匀, 磁分离架上静置 2 min, 弃去上清液, PBST 溶液清洗 2 遍后, 用 200  $\mu\text{L}$  PBST 重悬混匀。再加入 2  $\mu\text{L}$  抗 *F. nucleatum* 多克隆抗体

(1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 用样品混合器室温振荡孵育 3 h 后, 利用磁分离架吸附结合的 MNP 探针, 并用适量的 PBST 清洗 3 次以除去未结合的抗 *F. nucleatum* 多克隆抗体, 最后用 200  $\mu\text{L}$  PBST 重悬探针, 振荡混匀后, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。制备的 MNP 探针通过 SDS-PAGE 和 TEM 进行表征。

#### 1.2.4 MNP 探针结合 *F. nucleatum* 暗场显微镜观察

吸取 50  $\mu\text{L}$  制备的 MNP 探针和 100  $\mu\text{L}$  *F. nucleatum* (浓度为  $1 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ) 混合于 500  $\mu\text{L}$  低吸附离心管中, 再加入 150  $\mu\text{L}$  的 PBST 混匀, 样品混合器室温振荡孵育 30 min 后, 利用磁分离架弃去上清液, 并用适量的 PBST 清洗 3 次, 100  $\mu\text{L}$  PBS 重悬制备样品。

取 5  $\mu\text{L}$  样品滴于洁净的载玻片中央, 静置 5 min 后以 45 $^{\circ}$ 角轻轻推盖上盖玻片, 采用暗场显微镜观察样品, 同时设置未结合 *F. nucleatum* 的 MNP 探针和 *F. nucleatum* 样品作为阴性对照。

为了检测探针标记 *F. nucleatum* 的特异性, 分别准备探针标记 *F. nucleatum* 样品、MNP、探针标记的 *E. coli* 溶液(浓度为  $1 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ )混合样品和探针标记的 *S. aureus* 溶液(浓度为  $1 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ )混合样品, 通过 TEM 观察各个样品的结合状态。

#### 1.2.5 磁纳米探针-暗场显微计数法检测 *F. nucleatum* 的灵敏度

利用 NCBI Primer-BLAST 设计 *F. nucleatum* 特异性基因 *nusG* (GenBank 登录号 AE009951.2) 用于 qPCR 定量检测的引物, 正向引物: 5'-GGGTCAGAACCAACTCCT ACAA-3'; 反向引物: 5'-GCTTGAAATGGAAGCTACAAGAG A-3', 目的基因片段的长度为 126 bp。将 *nusG* 序列及 pET28a 载体通过限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 酶切产物通过 T4 DNA 连接酶进行连接后, 得到的连接产物转化到大肠杆菌

DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 菌落 PCR 初步鉴定后进行测序, 将阳性结果采用质粒 DNA 小量试剂盒提取质粒, 作为阳性标准质粒。通过 NanoDrop 8000 测得质粒浓度, 换算成质粒拷贝数, 将已知拷贝数的重组质粒进行 10 倍梯度稀释, 共稀释 5 个梯度, 以梯度稀释的质粒作为模板进行 qPCR 检测并绘制标准曲线。分别培养 *F. nucleatum*、*E. coli* 和 *S. aureus*, 采用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, qPCR 检测 *nusG* 引物的特异性。根据不同浓度样品进行 qPCR 后的  $C_t$  值绘制标准曲线并计算检测限。

梯度稀释后的 *F. nucleatum* 各取 5  $\mu\text{L}$ , 分别加入制备好的探针工作液 20  $\mu\text{L}$  混合于 500  $\mu\text{L}$  低吸附离心管中, 随后加入 200  $\mu\text{L}$  PBST, 于样品混合器上室温孵育 30 min 后, 用磁分离架吸附, 适量的 PBST 清洗 3 次。将制备好的样品涂片于暗场显微镜下进行观察与计数, 每个梯度设置 3 个重复样品, 每次观察时随机挑选 10 个视野(5  $\mu\text{L}$  样品制备的图片面积大约是 200 个暗场视野)。将其结果与 qPCR 结果进行对比, 验证磁纳米探针-暗场显微计数法的灵敏度、准确性及效率。

#### 1.2.6 *F. nucleatum* 实际样本的检测

将 6 只健康的雌性 C57BL/6J 小鼠分为实验组(3 只)和对照组(3 只)。PBS 配制浓度为  $1 \times 10^8$  copies/ $\mu\text{L}$  的 *F. nucleatum* 溶液, 采用灌肠给菌的方式, 将 1 mL 菌液和 PBS 分别灌注到实验组和对照组小鼠的结直肠内, 每周 5 次, 共计 8 周。PCR 鉴定实验组感染 *F. nucleatum* 后, 取其结直肠组织进行冰浴研磨, 直至组织完全破碎。将组织研磨液 1 500 r/min 离心 5 min 去除沉淀, 然后 12 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 沉淀重悬于 PBS 缓冲液中。采用截留分子量为 300 kDa 的透析膜透析过夜, 收集膜内液体作为待检样本。

取 10  $\mu\text{L}$  样本与 20  $\mu\text{L}$  制备好的 MNP 探针混合后置于暗场显微镜下观察。同时将样本与已建立的 qPCR 方法进行定量检测, 与暗场定量结果作对比。

## 2 结果与分析

### 2.1 多克隆抗体的纯化结果

Protein A+G Agarose (Fast Flow) 预装柱纯化血清后, 通过微量紫外-可见分光光度计测得纯化后的抗体浓度约为 13.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , SDS-PAGE 鉴定纯化后的多克隆抗体在约 55 kDa 和 25 kDa 处有蛋白条带, 与未纯化的抗血清相比, 纯化后的抗血清中杂蛋白明显减少(图 1)。

### 2.2 ELISA 法检测多克隆抗体

如表 1 所示, 间接 ELISA 方法检测抗体血清效价为 1:128 000 ( $P/N>2.1$ ), 表明抗体制备成功。

### 2.3 MNP 探针的 SDS-PAGE 鉴定

SDS-PAGE 结果表明(图 2), 在 MNP 探针

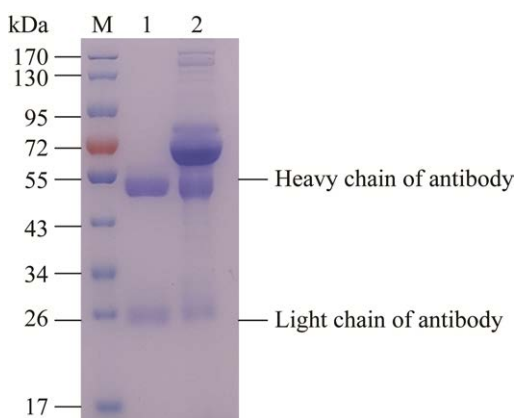


图 1 SDS-PAGE 鉴定多克隆抗体纯化效果 M: 蛋白 Marker; 1: 纯化后的抗血清; 2: 未纯化的抗血清

Figure 1 SDS-PAGE analysis of polyclonal antibody purification effect. M: Protein Marker; 1: Purified antiserum; 2: Unpurified antiserum.

表 1 血清效价检测

Table 1 Determination of serum titer

血清稀释度	阳性血清	阴性血清	$P/N>2.1$
Serum dilution	Positive serum ( $OD_{450}$ )	Negative serum ( $OD_{450}$ )	
1:2 000	1.951 3	0.125 7	15.52
1:4 000	1.570 5	0.118 9	13.21
1:8 000	1.460 2	0.123 9	11.79
1:16 000	1.141 8	0.114 3	9.99
1:32 000	0.704 5	0.125 6	5.61
1:64 000	0.528 5	0.123 6	4.27
1:128 000	0.335 0	0.115 7	2.88
1:256 000	0.226 3	0.117 8	1.92

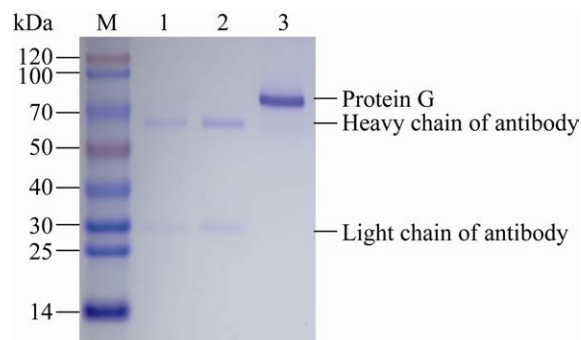


图 2 MNP 探针的 SDS-PAGE 分析图 M: 蛋白 Marker; 1: 20  $\mu\text{L}$  MNP 探针; 2: 2  $\mu\text{g}$  抗体; 3: 20  $\mu\text{L}$  MNP

Figure 2 SDS-PAGE analysis of prepared MNP probes. M: Protein Marker; 1: 20  $\mu\text{L}$  MNP probes; 2: 2  $\mu\text{g}$  antibody; 3: 20  $\mu\text{L}$  MNP.

样品中有 2 条带(一条 55 kDa 的抗体重链条带和一条约 20 kDa 的抗体轻链条带)。表明 MNP 与抗体结合, 成功制备了 MNP 探针。

### 2.4 MNP 探针的 TEM 表征

TEM 观察结果表明(图 3), 与未修饰的 MNP 相比, MNP 探针仍具有良好的分散性, 可以用来构建病原体的检测体系。

### 2.5 暗场显微镜观察探针捕获 *F. nucleatum*

纯的 *F. nucleatum* 样品由于散射光弱, 在暗场显微镜下则呈现出微亮的梭状结构(图 4A); 50 nm 的磁纳米颗粒在单分散状态下散射光很

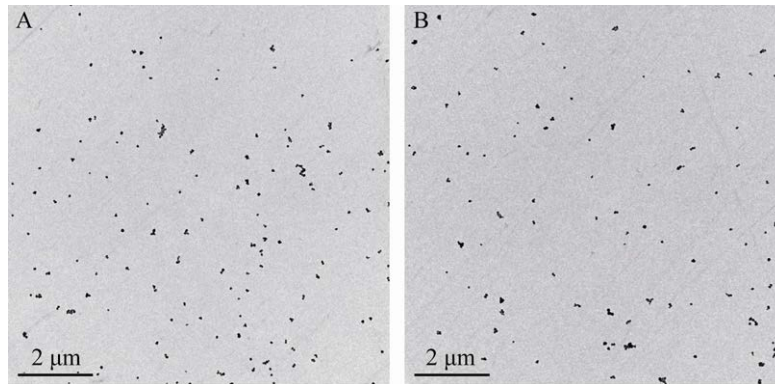


图3 TEM表征MNP探针 A: MNP; B: MNP探针

Figure 3 TEM of MNP probes. A: MNP; B: MNP probes.

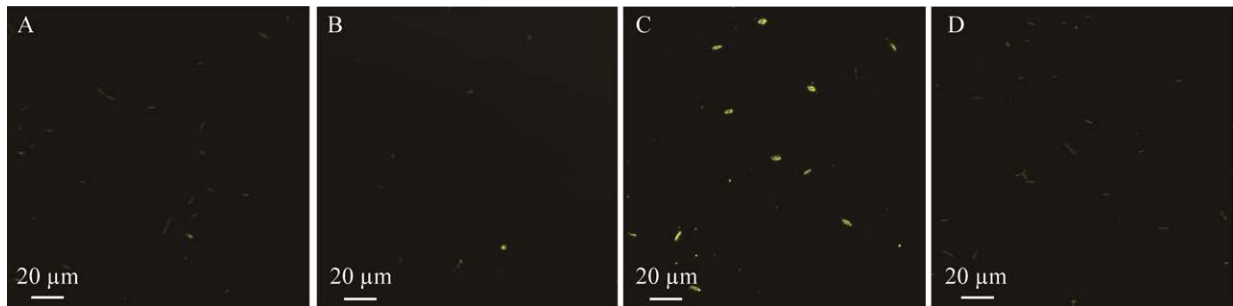


图4 暗场显微镜表征探针捕获的 *F. nucleatum* A: *F. nucleatum*; B: MNP 探针; C: MNP 探针结合 *F. nucleatum*; D: MNP 与 *F. nucleatum* 的混合液

Figure 4 Dark field microscope observation of probe capture of *F. nucleatum*. A: *F. nucleatum*; B: MNP probes; C: MNP probes binded with *F. nucleatum*; D: MNP mixed with *F. nucleatum*.

弱, 暗场显微镜下不易观察到, 可能由于团聚会出现发光点(图4B)。MNP探针与 *F. nucleatum* 特异性结合后, 探针会紧紧包裹在 *F. nucleatum* 周围, 在暗场显微镜下会呈现出明亮的金黄色梭状结构(图4C), 明显区别于暗场背景和阴性对照(图4D)。

## 2.6 TEM观察探针标记 *F. nucleatum* 的特异性结果

TEM表征结果显示, 制备的MNP探针紧紧围绕在 *F. nucleatum* 周围(图5A), 而未结合抗体的MNP不能与 *F. nucleatum* 结合(图5B), 表

明MNP与 *F. nucleatum* 不存在特异性吸附现象。将MNP探针与 *E. coli* 和 *S. aureus* 混合后, 可以看到 *E. coli* 和 *S. aureus* 表面未结合任何探针颗粒, 而是散落在菌体周围(图5C和图5D)。结果表明, 制备的MNP探针可以特异性结合 *F. nucleatum*。

## 2.7 qPCR检测 *F. nucleatum* 的灵敏度结果

### 2.7.1 特异性引物设计和标准曲线的构建

以 *F. nucleatum* 和阴性对照组 *E. coli*、*S. aureus* 细菌基因组DNA为模板进行qPCR检测, 结果显示仅 *F. nucleatum* 组有扩增(图6A), 有且仅有1个特异性吸收峰(图6B), 表明引物特

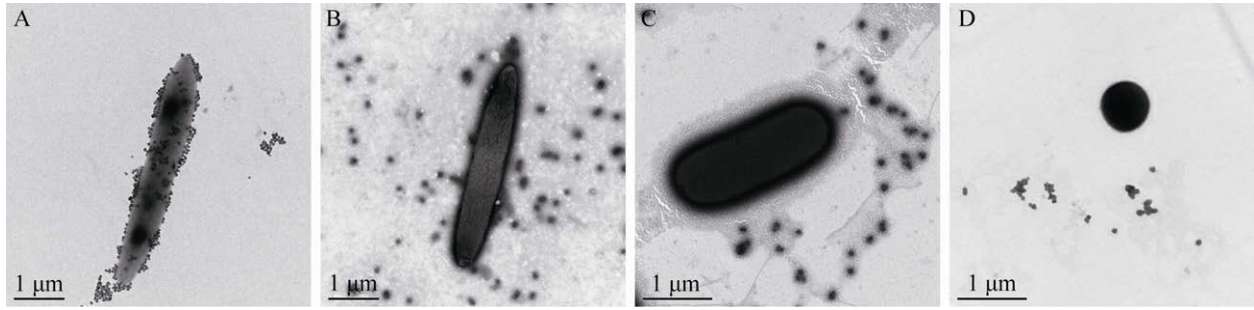


图5 TEM表征MNP探针的特异性 A: MNP探针结合*F. nucleatum*样品; B: MNP与*F. nucleatum*混合; C: MNP探针与*E. coli*混合; D: MNP探针与*S. aureus*混合

Figure 5 TEM images for specificity of MNP probes. A: MNP probes binded with *F. nucleatum*; B: MNP mixed with *F. nucleatum*; C: MNP probes mixed with *E. coli*; D: MNP probes mixed with *S. aureus*.

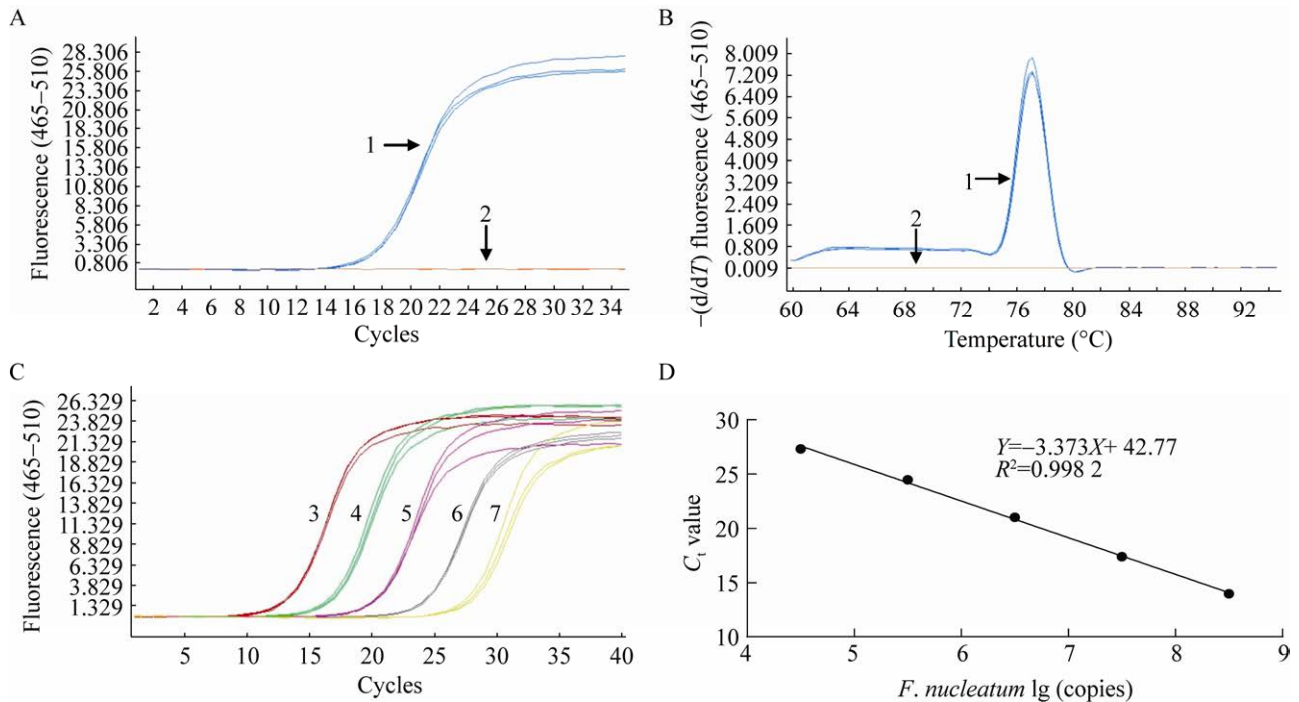


图6 qPCR标准曲线的构建 A: *F. nucleatum*、*E. coli*和*S. aureus*的扩增曲线; B: *F. nucleatum*、*E. coli*和*S. aureus*的溶解曲线; C: *F. nucleatum*基因的扩增曲线; D: *F. nucleatum*的标准曲线。1: *F. nucleatum*基因组; 2: *E. coli*和*S. aureus*基因组(两条曲线重合); 3-7: 质粒浓度依次为 $3.54 \times 10^8$ 、 $3.54 \times 10^7$ 、 $3.54 \times 10^6$ 、 $3.54 \times 10^5$ 、 $3.54 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$

Figure 6 Construction of qPCR standard curve. A: Amplification curve of *F. nucleatum*, *E. coli* and *S. aureus*; B: High resolution solution curve of *F. nucleatum*, *E. coli* and *S. aureus*; C: Amplification curve of *F. nucleatum* gene; D: Standard curve of *F. nucleatum*. 1: *F. nucleatum* genome; 2: *E. coli* genome and *S. aureus* genome; The plasmid concentrations of 3-7 were:  $3.54 \times 10^8$ ,  $3.54 \times 10^7$ ,  $3.54 \times 10^6$ ,  $3.54 \times 10^5$ ,  $3.54 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ .

异性好。通过 NanoDrop 8000 测得质粒核酸浓度, 换算成质粒拷贝数为  $3.54 \times 10^{10}$  copies/ $\mu\text{L}$ , 10 倍倍比梯度稀释 5 组, 即  $3.54 \times 10^4$ – $3.54 \times 10^8$  copies/ $\mu\text{L}$  进行 qPCR。由图 6C 所示, 各种梯度的扩增曲线为标准的“S”型,  $C_t$  值随着质粒浓度的降低而升高。通过计算得到标准曲线方程  $Y = -3.373X + 42.77$ , 相关系数  $R^2 = 0.9982$  (图 6D), 表明标准曲线线性关系良好。结果表明构建的 qPCR 检测体系有很高的特异性。

### 2.7.2 qPCR 法检测限的测定结果

将 *F. nucleatum* 样品及 10 倍倍比梯度稀

释后的 *F. nucleatum* 样品以 1  $\mu\text{L}$  为模板, 通过建立的 qPCR 进行定量检测, 得到  $C_t$  值代入标准曲线方程, 计算得出 *F. nucleatum* 样品的 DNA 浓度为  $2.14 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ 。经计算发现在拷贝数为  $2.14 \times 10^4$  copies 及以下时, 通过标准曲线代入  $C_t$  值计算得出的样品浓度与实际浓度有显著差异(图 7A)。接下来将已知浓度的 *F. nucleatum* 样品梯度稀释, 当样品浓度为  $3.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  时, 样品结果的  $C_t$  值与阴性对照( $C_t > 35$ )无差异。结果表明 qPCR 的检测限约为  $1.71 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$  (图 7B)。

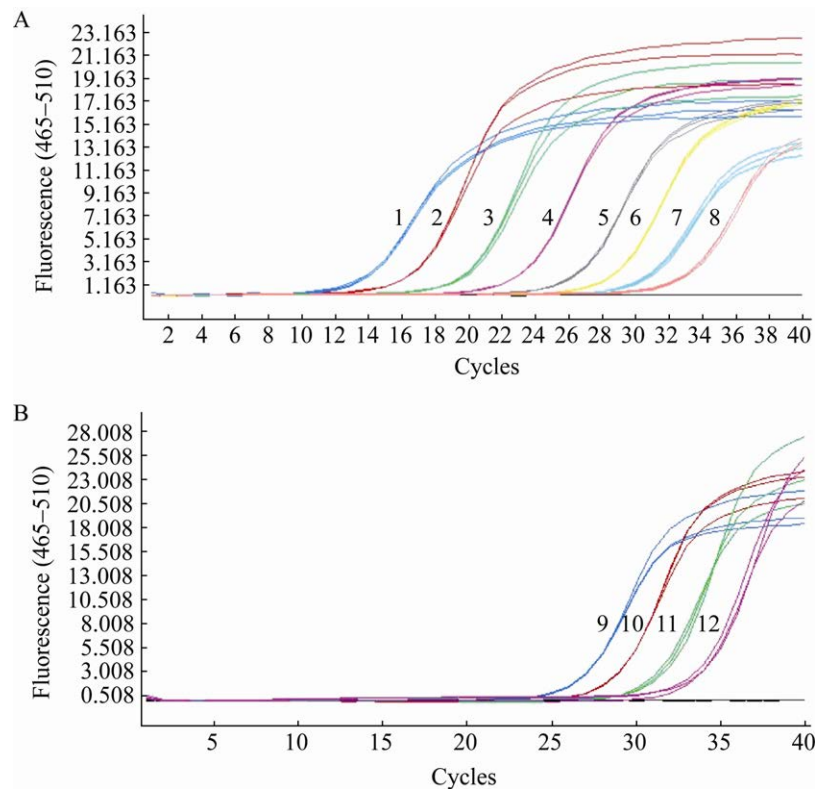


图 7 不同浓度 *F. nucleatum* 的 qPCR 扩增曲线 A: 1–8: *F. nucleatum* 样品 10 倍倍比梯度稀释浓度依次为:  $2.14 \times 10^9$ 、 $2.14 \times 10^8$ 、 $2.14 \times 10^7$ 、 $2.14 \times 10^6$ 、 $2.14 \times 10^5$ 、 $2.14 \times 10^4$ 、 $2.14 \times 10^3$  和  $2.14 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ; B: 9–13: *F. nucleatum* 浓度依次为:  $2.14 \times 10^4$ 、 $4.28 \times 10^3$ 、 $8.56 \times 10^2$ 、 $1.71 \times 10^2$  和  $3.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$

Figure 7 Amplification curves of qPCR with different concentrations of *F. nucleatum*. A: The concentrations of 1–8 *F. nucleatum*:  $2.14 \times 10^9$ ,  $2.14 \times 10^8$ ,  $2.14 \times 10^7$ ,  $2.14 \times 10^6$ ,  $2.14 \times 10^5$ ,  $2.14 \times 10^4$ ,  $2.14 \times 10^3$ ,  $2.14 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ; B: The concentrations of 9–13 *F. nucleatum*:  $2.14 \times 10^4$ ,  $4.28 \times 10^3$ ,  $8.56 \times 10^2$ ,  $1.71 \times 10^2$ ,  $3.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ .



## 2.8 磁纳米探针-暗场显微计数法检测 *F. nucleatum* 灵敏度的结果

采用磁纳米探针-暗场显微计数法检测 *F. nucleatum* 溶液, 暗场结果显示随着菌体浓度越来越低, 暗场显微镜下观察到明亮的梭形结构数量越来越少。结果表明, 当菌体浓度为  $4.28 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$  (图 8A)、 $8.56 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$  (图 8B) 和  $1.71 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$  (图 8C) 时, 视野中会出现许多明亮的单分散梭形结构, 通过计数

发现其数量明显随着浓度变小而变少; 当菌体浓度为  $3.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  时(图 8D), 在一定视野内也会出现单个明亮的梭形结构, 而且与实际计数结果无明显差异。因此, 磁纳米探针-暗场显微计数法的检测限为  $3.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

## 2.9 磁纳米探针法与 qPCR 法对 *F. nucleatum* 计数的结果对比

通过 2 种方法对 3 个重复样品进行计数, 表 2 结果表明在 *F. nucleatum* 样品浓度极低时

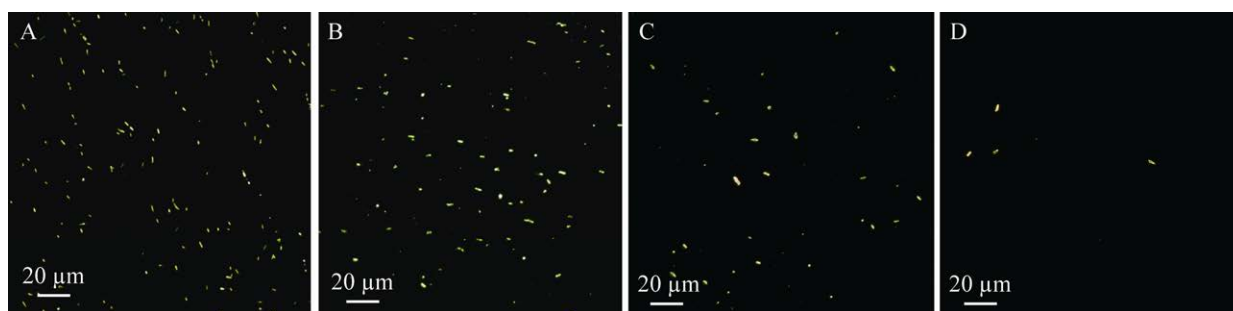


图 8 不同浓度 *F. nucleatum* 与 MNP 探针结合的暗场显微镜观察

Figure 8 Representative dark-field images of *F. nucleatum* at four concentrations. A: The *F. nucleatum* of  $4.28 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ; B: The *F. nucleatum* of  $8.56 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ; C: The *F. nucleatum* of  $1.71 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ; D: The *F. nucleatum* of  $3.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ .

表 2 磁纳米探针法与 qPCR 法计数的结果对比

Table 2 Detection of different dilution *F. nucleatum* solution by qPCR and MNP probe-based counting strategy

Sample No.	Number of qPCR (copies/ $\mu\text{L}$ )				Number of MNP-labeled dark-field count (copies/ $\mu\text{L}$ )			
	2#	3#	4#	5#	2#	3#	4#	5#
Theoretical concentration	$4.28 \times 10^3$	$8.56 \times 10^2$	$1.71 \times 10^2$	$3.42 \times 10^1$	$4.28 \times 10^3$	$8.56 \times 10^2$	$1.71 \times 10^2$	$3.42 \times 10^1$
No. 1	4 265	1 175	282	—	4 329	879	178	35
No. 2	5 495	1 047	229	—	4 258	867	165	42
No. 3	4 466	1 122	268	—	4 423	886	182	38
Mean	4 742	1 114	259	—	4 336	877	175	38
Standard deviation	538	52	22	—	67	8	7	3

注: 2#:  $4.28 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$  *F. nucleatum*; 3#:  $8.56 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$  *F. nucleatum*; 4#:  $1.71 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$  *F. nucleatum*; 5#:  $3.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  *F. nucleatum*。—:  $C_t > 35$  结果忽略不计

Note: 2#: The *F. nucleatum* of  $4.28 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 3#: The *F. nucleatum* of  $8.56 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 4#: The *F. nucleatum* of  $1.71 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 5#: The *F. nucleatum* of  $3.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ ; —:  $C_t > 35$ , results ignored.

(低于  $4.28 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L), 磁纳米探针-暗场显微计数法相对 qPCR 方法误差较低、准确性更高, 具有一定优势。

### 2.10 *F. nucleatum* 实际样本的检测结果

经 PCR 鉴定小鼠感染 *F. nucleatum* 后, 通过 MNP 探针结合暗场显微镜定量检测样本中的 *F. nucleatum*。结果显示, 实验组的样本在暗场显微镜下可以清楚地看到明亮的梭状结构(图 9A), 而对照组看不到(图 9B)。本研究建立的方法对实际样本的计数结果与 qPCR 对比显示, 2 种方法的检测结果保持一致(表 3), 证明了磁纳米探针法应用于实际样本检测的可行性和准确性。

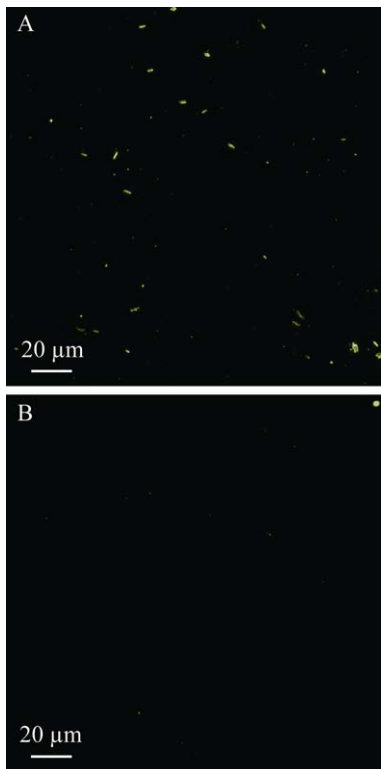


图 9 暗场显微镜下观察探针捕获实际样本中的 *F. nucleatum* A: 实验组样本; B: 对照组样本  
Figure 9 Detection of *F. nucleatum* by MNP probe-based counting strategy dark-field images of MNP probes *F. nucleatum* capture in real samples. A: Experimental samples; B: Control samples.

表 3 磁纳米探针法与 qPCR 法检测实际样本的结果对比

Table 3 Comparison of the results between the qPCR and MNP probe-based counting strategy for the detection of real samples

Samples	Number of MNP-labeled dark-field count (copies/ $\mu$ L)	Number of qPCR (copies/ $\mu$ L)
Sample No. 1	857	870
Sample No. 2	1 193	1 230
Sample No. 3	1 175	1 122
Control	—	—

Note: —: No detected.

## 3 讨论与结论

早期发现病原体是预防医学的一个重要问题。由于厌氧菌难以培养, 其检测方法很长时间一直未受到应有的关注。近年来, *F. nucleatum* 作为一种厌氧的机会致病菌, 其检测手段引起了广泛的关注。然而, 传统的检测方法操作烦琐、耗时长、成本高、专业性强且容易出现假阳性的结果。

Chen 等<sup>[27]</sup>利用金纳米颗粒在暗场显微镜下的光散射特性, 对肺炎衣原体进行肉眼计数, 结果证实金纳米颗粒标记的暗场计数策略快速方便且灵敏度高。Xu 等<sup>[28]</sup>提出了一种基于暗场显微镜的单纳米颗粒识别与统计分析相结合的方法, 用于检测样品中超灵敏生物毒素, 结果表明该检测方法简单高效。因此, 在本研究中, 我们提出了一种 MNP 标记的暗场计数法来准确定量 *F. nucleatum*, 通过在暗场显微镜下用肉眼观察到梭状结构, 以识别单个 *F. nucleatum*。

*F. nucleatum* 的 TEM 表征结果显示病原体大小在 5–10  $\mu$ m 之间, 通过对粒径大小及材料属性的筛选, 最终选择了适用于标记 *F. nucleatum* 的 50 nm 的磁纳米颗粒, 该纳米材料具有良好的分散性, 在暗场显微镜下可以产生强烈的光

散射,方便观察梭状结构并计数。其表面预修饰有 protein G,利用 protein G 与抗体的 Fc 区域特异性结合这一特征,可以与制备的抗 *F. nucleatum* 多克隆抗体结合,制备特异性识别 *F. nucleatum* 的 MNP 探针。此外,MNP 探针需有较高的特异性和稳定性,才能在暗场视野中观察到明亮的梭状结构。通过 SDS-PAGE 结果并结合灰度值对比,20  $\mu\text{L}$  MNP 粒子可以结合 1  $\mu\text{g}$  抗体分子,MNP 探针能够达到高特异性和稳定性要求。

MNP 探针-暗场显微计数方法的灵敏度理论上可以达到 1 copies/10  $\mu\text{L}$ ,但考虑到实际检测的便利性,本研究中检测限为  $3.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ ,而且可以计数到  $4.28 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$  左右,无需稀释即可覆盖大量的 *F. nucleatum* 样品。因此,本研究的检测方法对 *F. nucleatum* 的检测是一种有效的计数技术。为了证明本研究方法的灵敏度,与传统的 qPCR 检测方法进行了比较。结果显示,qPCR 的检测限为  $1.71 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ,而 MNP 探针-暗场显微计数方法的检测限为  $3.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ ,比 qPCR 方法的灵敏度高 5 倍左右。通过对真实样品的检测,本研究所建立的方法也表现出良好的准确性。这种新型的检测方法具有灵敏度高、操作简单、检测快速(仅需要 30 min)、对设备要求低(只需要一台便携式显微镜)且不需要专业人员操作等优点,有可能成为一种通用平台,用于现场检测各种大小从数百纳米到微米的病原体。

综上所述,本研究通过纳米散射探针暗场超灵敏检测技术方法的优化,建立了 MNP 探针-暗场显微计数方法高灵敏度、高效率、检测快速,对于指导疑似 *F. nucleatum* 引起疾病的现场检测和相关疾病的临床检测具有重要意义,但仍存在一定的问题,需要进一步完善。

## REFERENCES

- [1] Han YW, Shi W, Huang GT, Kinder Haake S, Park NH, Kuramitsu H, Genco RJ. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(6): 3140-3146
- [2] Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen[J]. *Current Opinion Microbiology*, 2015, 23: 141-147
- [3] Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, Barnes R, Watson P, Allen-Vercoe E, Moore RA, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma[J]. *Genome Research*, 2012, 22(2): 299-306
- [4] Brazier JS, Citron DM, Goldstein EJ. A selective medium for *Fusobacterium* spp.[J]. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1991, 71(4): 343-346
- [5] Walker CB, Ratliff D, Muller D, Mandell R, Socransky SS. Medium for selective isolation of *Fusobacterium nucleatum* from human periodontal pockets[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1979, 10(6): 844-849
- [6] Burns MB, Lynch J, Starr TK, Knights D, Blekhman R. Virulence genes are a signature of the microbiome in the colorectal tumor microenvironment[J]. *Genome Medicine*, 2015, 7(1): 55
- [7] Amitay EL, Werner S, Vital M, Pieper DH, Höfler D, Gierse IJ, Butt J, Balavarca Y, Cuk K, Brenner H. *Fusobacterium* and colorectal cancer: causal factor or passenger? results from a large colorectal cancer screening study[J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(8): 781-788
- [8] Feng Q, Liang SS, Jia HJ, Stadlmayr A, Tang L, Lan Z, Zhang D, Xia H, Xu X, Jie Z, et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6528
- [9] Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano HO, Sugai T, An B, et al. *Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma[J]. *Cancer Research*, 2014, 74(5): 1311-1318
- [10] Noshio K, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, Igarashi H, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(2): 557-566

- [11] Mehta RS, Nishihara R, Cao Y, Song M, Mima K, Qian ZR, Nowak JA, Kosumi K, Hamada T, Masugi Y, et al. Association of dietary patterns with risk of colorectal cancer subtypes classified by *Fusobacterium nucleatum* in tumor tissue[J]. *JAMA Oncology*, 2017, 3(7): 921-927
- [12] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): e63
- [13] Huang S, Yang Z, Zou DY, Dong D, Liu A, Liu W, Huang L. Rapid detection of *nusG* and *fadA* in *Fusobacterium nucleatum* by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2016, 65(8): 760-769
- [14] Wang HF, Li LF, Guo SH, Zeng QY, Ning F, Liu WL, Zhang G. Evaluation of antibody level against *Fusobacterium nucleatum* in the serological diagnosis of colorectal cancer[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 33440
- [15] Moayeri A, Darvishi M, Amraei M. Homing of super paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) labeled adipose-derived stem cells by magnetic attraction in a rat model of Parkinson's disease[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 1297-1308
- [16] Moghimi H, Zohdiaghdam R, Riahi Alam N, Behrouz Kia Z. The assessment of toxicity characteristics of cellular uptake of paramagnetic nanoparticles as a new magnetic resonance imaging contrast agent[J]. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2019, 18(4): 2083-2092
- [17] Mokkath JH. Size and chemical order dependence of magnetic-ordering temperature and spin structure in Fe@Ni and Ni@Fe core-shell nanoparticles[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2020, 22(11): 6275-6281
- [18] Niemirowicz-Laskowska K, Mystkowska J, Łysik D, Chmielewska S, Tokajuk G, Misztalewska-Turkiewicz I, Wilczewska AZ, Bucki R. Antimicrobial and physicochemical properties of artificial saliva formulations supplemented with Core-Shell magnetic nanoparticles[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(6): 1979
- [19] Papapaskeva G, Dinev MM, Krasia-Christoforou T, Turcu R, Porav SA, Balanean F, Socoliuc V. White magnetic paper with zero remanence based on electrospun cellulose microfibrils doped with iron oxide nanoparticles[J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(3): 517
- [20] Parsian M, Mutlu P, Yalcin S, Gunduz U. Characterization of gemcitabine loaded polyhydroxybutyrate coated magnetic nanoparticles for targeted drug delivery[J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2020, 20(10): 1233-1240
- [21] Liu X, Huang Y, Kang JU. Dark-field illuminated reflectance fiber bundle endoscopic microscope[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(4): 046003
- [22] Liu MM, Chao J, Deng SH, Wang K, Li K, Fan CH. Dark-field microscopy in imaging of plasmon resonant nanoparticles[J]. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 2014, 124: 111-117
- [23] Hu M, Novo C, Funston A, Wang HN, Staleva H, Zou SL, Mulvaney P, Xia YN, Hartland GV. Dark-field microscopy studies of single metal nanoparticles: understanding the factors that influence the linewidth of the localized surface plasmon resonance[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2008, 18(17): 1949-1960
- [24] Kuhlmann AV, Houel J, Brunner D, Ludwig A, Reuter D, Wieck AD, Warburton RJ. A dark-field microscope for background-free detection of resonance fluorescence from single semiconductor quantum dots operating in a set-and-forget mode[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2013, 84(7): 073905
- [25] 雷刚, 何彦. 单个等离子体纳米颗粒在生化分析和生物成像中的应用[J]. *物理化学学报*, 2018, 34(1): 11-21
- Lei G, He Y. Applications of single plasmonic nanoparticles in biochemical analysis and bioimaging[J]. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2018, 34(1): 11-21 (in Chinese)
- [26] 郝锦蕊. 复合纳米材料的合成及单分子成像技术在化学检测中的应用研究[D]. 长沙: 湖南大学硕士学位论文, 2014
- Hao JR. Synthesis of composite nanomaterials and applications in chemical detection based on single molecule imaging[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan University, 2014 (in Chinese).
- [27] Chen FL, Di T, Yang CT, Zhang TY, Thierry B, Zhou X. Naked-eye enumeration of single *Chlamydia pneumoniae* based on light scattering of gold nanoparticle probe[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(4): 1140-1148
- [28] Xu SH, Guo LH, Chen LF, Luo F, Qiu B, Lin ZY. Dark field microscope-based single nanoparticle identification coupled with statistical analysis for ultrasensitive biotoxin detection in complex sample matrix[J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187(7): 1-9