

Rapid Detection of the Viability of BCG Vaccine Using Optical Biosensor*

LIU Xiaohong^{1,2}, ZHAO Aihua³, LUO Jinping¹, GAO Congjun⁴, TIAN Qing^{1,2},
WANG Guozhi³, CAI Xinxia^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Transducer Technology, Institute of Electronics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;
2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;
3. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;
4. Beijing North Hospital, China North Industries Group Corporation, Beijing 100089, China)

Abstract: Based on the principle of ATP bioluminescence reaction, a rapid method was developed for detecting the viability of BCG (Bacillus Calmette Guerin) vaccine which combined homemade optical biosensor. ATP (adenosine triphosphate) extraction was performed in boiling Tris-EDTA buffer in the experiments. In this study, a high correlation between the viable count of BCG and Relative luminescence intensity (RLU) was obtained with correlation coefficient of 0.9908 ($P < 0.01$) according to the linearity of ATP standard, and a low Relative Standard Deviation (RSD) of 6.17%. The ATP content of BCG was 10^{-18} mol/CFU, consistent with the results in papers. The sample volume was 30 μ L and the whole test for a sample was completed within 30 min. There was also a high correlation between homemade optical biosensor and the commercial system with correlation coefficient of 0.9676 ($P < 0.01$). With the characters of easy operation and fast responses, this method can be applied widely in routine quality control to estimate viable count of BCG and other vaccines.

Key words: optical biosensor; viable counts; bioluminescence; BCG

EEACC: 7230J

光学生物传感器用于快速检测卡介苗活菌数研究*

刘晓红^{1,2}, 赵爱华³, 罗金平¹, 高从军⁴, 田青^{1,2}, 王国治³, 蔡新霞^{1,2*}

(1. 中国科学院电子学研究所传感技术联合国家重点实验室, 北京 100190;
2. 中国科学院研究生院, 北京 100190;
3. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050;
4. 中国兵器工业集团北京北方医院, 北京 100089)

摘要: 基于三磷酸腺苷(ATP)光学反应原理, 结合实验室自制的光学生物传感器, 构建了一种快速检测卡介苗(BCG)活菌数的方法。选用加热裂解法提取 BCG 活菌内 ATP, 对 BCG 疫苗进行了检测。结果表明, BCG 活菌浓度与相对发光强度(RLU)线性相关, 相关系数为 0.9908 ($P < 0.01$), 其 ATP 含量与文献报道的结果处于同一数量级 (10^{-18} mol/CFU)。检测方法的相对标准偏差(RSD)为 6.17%。检测样品仅需 30 μ L, 检测时间小于 30 min。与国外商业化检测系统的测试结果线性相关, 相关系数为 0.9676 ($P < 0.01$)。这种方法简便快速, 在 BCG 疫苗及其他活菌疫苗质量控制方面具有广泛的应用前景。

关键词: 光学生物传感器; 活菌浓度; 生物荧光法; BCG

中图分类号: TP212.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-1699(2010)01-0001-04

卡介苗(BCG)是牛型分枝杆菌减毒活菌, 从上个世纪 20 年代就用来预防结核病^[1]。BCG 疫苗的效力取决于其活菌含量, 因此, 在 BCG 疫苗的生产 and 保存

过程中需要对 BCG 疫苗质量进行监控, 即活菌数是否达到合格标准, 要求活菌数 $> 1 \times 10^6$ 个/mg。现行的 BCG 疫苗活菌数测定方法, 普遍采用欧洲药典和

项目来源: 国家“863”高技术研究发展计划资助(2009AA03Z411); 中国科学院知识创新项目资助(KGCX2-YW-111-2); 国家科技重大专项资助课题(2008ZX10003003-02); 中国科学院优秀奖资助项目

收稿日期: 2009-08-17 **修改日期:** 2009-10-10

WHO 规程中推荐的菌落形成单位计数法 (CFU 法)^[2-3]。由于 BCG 是慢速生长细菌 (结核杆菌每繁殖一代需 18~20 h), 活菌培养需 3~4 周, 检测周期长且操作繁琐, 此外, BCG 易聚集成团, 造成 CFU 法计数不够准确, 重复性差, 从而导致疫苗在库内存放期长, 缩短了疫苗的有效期, 也影响了国家检定部门及防疫系统在监测疫苗方面的质量管理。因此, 非常有必要寻求一种快速、简单、重复性好的检测方法来替代传统方法。

目前, 国内外均有相关学者开展了 BCG 疫苗快速检测方法的研究, 主要方法有荧光染色法^[4], XTT 四唑盐法^[5-6], 生物荧光法^[1]等。相比其他方法, 生物荧光法因其操作简单、检测快速、灵敏度及准确度高等优点, 成为近年来活菌快速检测方法中的研究热点。生物荧光法是基于萤火虫发光原理, 利用三磷酸腺苷 (ATP) 与荧光素酶-荧光素反应产生的荧光可以检测 ATP^[7], 而所有活菌细胞中的 ATP 含量大致相同 (约为 10^{-18} mol/CFU)^[8-9], 所以通过生物荧光法检测 ATP 量, 就可以推算出样品中的活菌量。早在 1979 年, 法国学者 Gheorghiu^[10] 就尝试利用该法测定 BCG 活菌数。此后, 一些学者相继报道了对生物荧光法用于 BCG 活性检测的研究^[11-14], 取得一些结果, 但检测时间较长, 且相关仪器及试剂价格昂贵, 推广难度较大。本文基于生物荧光法, 利用自制的光学生物传感器及荧光检测仪对 BCG 疫苗活菌数进行了检测, 检测时间短, 且操作简单, 这在 BCG 疫苗及其他活菌疫苗质量控制方面具有广泛的应用前景。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

实验室自制光学生物传感器及荧光检测仪^[15-16], Pi-102 荧光检测仪 (Hygiena 公司)。

ATP 标准品、Pi-102 荧光检测仪配套试剂盒购自瑞典 Biothema 公司; 醋酸镁 (MgAc) 和乙二胺四乙酸二钠 (EDTA·2Na) 购自美国 Sigma 公司; 荧光素 (Luciferin) 和荧光素酶 (Luciferase, EC 1.13.12.7, 14.9 g/L) 购自美国 Promega 公司; 牛血清蛋白 (BSA)、二硫苏糖醇 (DTT)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、乙酸 (Acetate) 购自北京欣惠泽奥科技有限公司。Tris-EDTA 缓冲液 (25 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 7.8) 和发光试剂 (70 mg/L Luciferin, 35 mg/L Luciferase, 10 mmol/L MgAc, 1 g/L BSA, 0.6 mmol/L DTT) 由实验室配制。实验用水均为去离子水, 溶液皆用 Tris-EDTA 缓冲液配制。所用试剂均为分析纯。

冻干皮内注射用卡介苗 (成都、上海生物制品研究所, 中国药品生物制品检定所) 样品的配制与培养, 按照《中国生物制品规程》有关质控标准进行, 由中国药品生物制品检定所细菌一室完成。

1.2 光学传感系统结构

实验中利用实验室自制光学生物传感器及荧光检测仪^[15-16]进行检测, 该系统结构图如图 1 所示。发光试剂在微量光学反应池中与样品溶液混合, 反应产生的荧光经光电检测单元转换为可处理的电信号; 经信号放大与处理单元处理后, 得到样品的发光强度, 显示于系统的显示屏上。

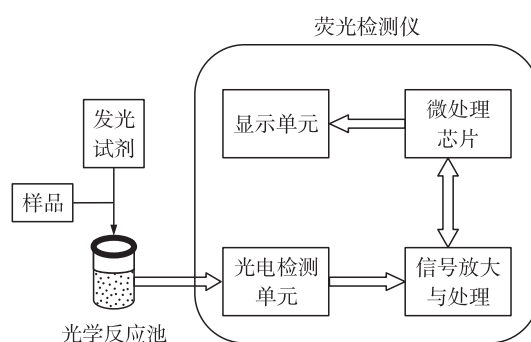


图 1 光学传感系统结构示意图

1.3 实验方法

1.3.1 ATP 标准品制备

以灭菌的超纯水将 ATP 标准品梯度稀释为 2×10^{-8} mol/L、 1×10^{-8} mol/L、 5×10^{-9} mol/L、 2.5×10^{-9} mol/L、 1.25×10^{-9} mol/L、 6.25×10^{-10} mol/L。

1.3.2 BCG 样品中 ATP 的提取

BCG 样品中 ATP 提取方法采用历史报道^[12-14]的加热法, 由中国药品生物制品检定所细菌一室完成。取 100 μ L BCG 样品加到 500 μ L 预热为 96 $^{\circ}$ C~98 $^{\circ}$ C 的 Tris-EDTA 缓冲液中, 保温 6 min 后取出样品, 使其恢复至室温, 即得到的经 ATP 提取后的 BCG 样品。

1.3.3 ATP 标准品和 BCG 样品测试方法

利用实验室自制光学生物传感器及检测仪进行检测。取 30 μ L 样品溶液与 180 μ L 发光试剂于微量光学反应池中混合, 放入荧光检测仪中检测反应光强, 10 s 后显示结果。单个 BCG 样品从 ATP 提取到加样到最后获得结果, 检测在 30 min 内完成。

2 结果与讨论

2.1 ATP 标准品测试结果

实验中对 ATP 标准溶液进行发光检测, 对每个浓度的样品测试 2 个平行样。平行样的相对光强值取平均作为最终测试结果。得到响应曲线, 如图 2 所示。结果表明, ATP 浓度在 6.25×10^{-10} mol/L ~

2×10^{-8} mol/L 范围内与其相对发光强度呈良好线性关系,得到线性回归方程为: $RLU = 3407.3[ATP] - 156.3$, 相关系数 $r = 0.9985 (P < 0.01)$ 。

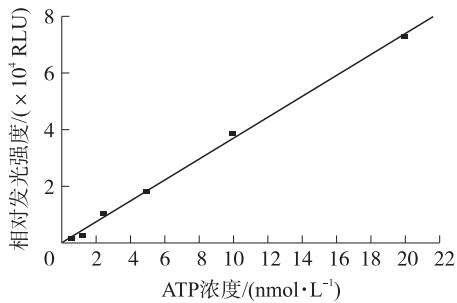


图 2 不同 ATP 浓度与相对发光强度(RLU)的拟和直线图

2.2 BCG 样品测试

考虑到在 BCG 质量控制中要求产品中活菌的浓度至少为 1.0×10^6 个/mg 才是合格产品, 如将 1 mg 样品配置成 1 mL 的检测溶液, 即要求卡介苗的活菌数浓度 $> 1 \times 10^6$ CFU/mL。因此选取浓度为 2 mg/mL (活菌浓度为 6.8×10^6 CFU/mL) 的 BCG 样品进行 2 倍梯度稀释至 0.0625 mg/mL (活菌浓度为 2.125×10^5 CFU/mL), 获得 6 个稀释度的 BCG 样品溶液。先对该系列 BCG 样品溶液检测其本底值(即测试未进行 ATP 提取前的 BCG 样品, 作为样品背景值), 再对样品进行 ATP 提取, 处理后的样品每个浓度测试 3 个平行样。平行样的相对光强值取平均后, 减去本底值作为最终测试结果。响应曲线如图 3 所示。结果表明, 在活菌浓度为 6.8×10^6 CFU/mL $\sim 2.125 \times 10^5$ CFU/mL 范围内, BCG 样品的浓度与其发光强度呈良好的线性关系, 线性回归方程为 $RLU = 0.00473CFU + 384.56$, 相关系数 $r = 0.9908 (P < 0.01)$ 。

根据 2.1 节中 ATP 标准品线性回归方程可推算

表 1 重复性测试结果

相对光强 (RLU)										均值	相对标准偏差
No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10	(AV)	(RSD, %)
34415	30421	35000	33129	30157	31609	32203	29446	29469	32117	31796.6	6.17

2.4 自制光学生物传感器及检测仪与国外商业化检测系统 Pi-102 对比

实验中对实验室自制的光学生物传感器与国外商业化仪器(Pi-102 荧光检测仪)进行了对比测试。选取浓度为 1 mg/mL 的 BCG 样品进行 2 倍稀释至 0.0625 mg/mL, 获得 5 个稀释度的 BCG 样品溶液。利用自制荧光检测系统与 Pi-102 荧光检测仪分别测试 BCG 样品发光强度, 并根据 ATP 标准曲线推算 BCG 样品中 ATP 含量。对比结果如图 4 所示。结果显示, 光学生物传感器与 Pi-102 荧光检测仪对同浓度的 BCG 样品中 ATP 含量的测试结果具有良好的线

得到 BCG 样品的 ATP 含量, 平均值为 1×10^{-18} mol/CFU, BCG 样品浓度和其 ATP 含量呈良好线性关系, 相关系数 $r = 0.9908 (P < 0.01)$ 。与 Hawronsky J M^[8-9] 等报道的活菌中 ATP 含量处于同一数量级。因此在测定 BCG 样品发光强度基础上, 根据获得的每个 CFU 中 ATP 含量, 以及图 2 所得到线性回归方程便可推算出 BCG 活菌含量。

同时对 10 批实际 BCG 样品进行了测试。利用上述方法, 可推算得到各个样品的活菌数, 与传统培养法的结果比较。本文测试的 10 批 BCG 样品活菌数平均为 $3.33 \pm 1.43 \times 10^6$ CFU/mL, 与培养法测试结果 ($3.70 \pm 0.61 \times 10^6$ CFU/mL) 处于同一数量级, pearson 相关系数为 0.529, 经 t 检验分析, 文中所测结果和传统培养法结果无显著差异, 因此文中方法适用于 BCG 疫苗活菌数检测。

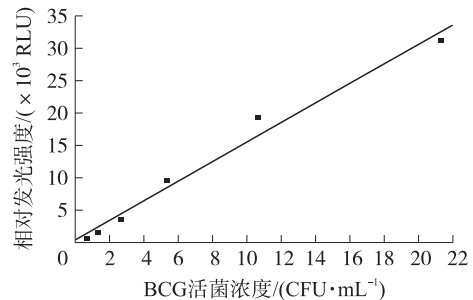


图 3 不同 BCG 样品浓度与相对发光强度(RLU)的拟和直线图

2.3 BCG 样品重复性测试

实验中选取浓度为 3×10^6 CFU/mL 的 BCG 样品, 重复测试 10 次, 考察了测试的重复性。结果见表 1。由表 1 可以看出, 检测结果的相对标准偏差为 6.17%, 具有良好的重复性。

性相关性, 相关系数 $r = 0.9676 (P < 0.01)$ 。

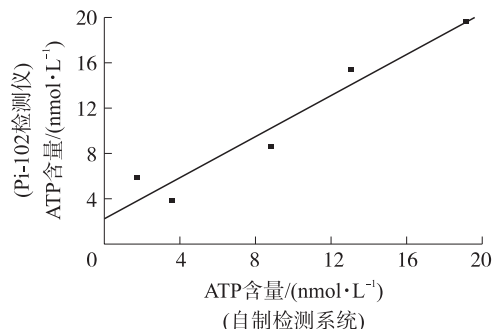


图 4 自制光学生物传感器与 Pi-102 荧光检测仪对 BCG 样品中 ATP 含量测试的对比

3 结论

接种卡介苗(BCG)是对结核病的预防和控制所采取的主要措施。BCG疫苗的质量监控主要是判断其活菌数是否达到合格标准。目前普遍采用常规培养计数法,费时费力,不利于BCG疫苗的存放与管理。本文基于ATP生物发光反应原理,利用实验室自制的台式荧光检测系统,对BCG活菌数进行了快速检测。在BCG疫苗质量标准范围内,BCG活菌浓度与其相对发光强度(RLU)具有良好的线性相关性,相关系数为0.9908,经推算,ATP含量符合历史报道的结果。对10批实际BCG样品的检测结果与传统培养法结果的pearson相关系数为0.529,经t检验分析,两组结果无显著差异。检测方法的相对标准偏差为6.17%,具有良好的重复性。单个样品从ATP提取到加样到最后获得结果,检测可在30 min之内完成。且与国外商业化检测系统的检测结果具有良好的线性相关性,相关系数为0.9676。这种基于生物荧光法的检测技术操作简单,检测速度快,可以用于对BCG疫苗快速检测,在活菌类疫苗质量监控领域具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Ho M M, Knezevic I, Roumiantzeff M. Report on a WHO Consultation on the Characterization of BCG Vaccines [R]. Vaccine, 2005, 23: 5700-5704.
- [2] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia. 3rd ed. [S], Strasbourg: Council of Europe, 1997: 442-443.
- [3] WHO Expert Committee on Biological Standardization [S]. WHO Technical Report Series, 1987, 745: 60-92.
- [4] 汤金贵,柯国芳,李伏田,等. 荧光染色法对分支杆菌活力鉴定及细菌计数的研究[J]. 中国防痨通讯,1988,10(2):71-72.
- [5] 王秉祥,胡海涛,彭玉芬,等. XTT四唑鎓盐试验快速检测卡介苗活性[J]. 微生物学免疫学进展,2000,28(3):40-43.
- [6] Kairo S K, Badwell J, Tyler P C, et al. Development of a Tetrazolium Salt Assay for Rapid Determination of Viability of BCG Vaccines [J]. Vaccine, 1999, 17: 2423-2428.
- [7] 周爱玉,罗金平,岳伟伟,等. 手持式ATP生物荧光检测仪研制[J]. 传感技术学报,2008,21(4):543-546.
- [8] Hawronsky J M, Holah J. ATP: a Universal Hygienemonitor [J]. Trends in Food Science and Technology, 1997, 8(3): 79-84.
- [9] Noriaki H, Tatsuya S, Naoki K, et al. Enhanced Microbial Biomass Assay Using Mutant Luciferase Resistant to Benzalkonium Chloride [J]. Analytical Biochemistry, 2003, 319(2): 287-295.
- [10] Gheorghiu M, Lagranderie M. Mesure Rapide de la Viabilité du BCG par Dosage de l'ATP [J]. Ann Microbiol (Paris), 1979, 130: 147-156.
- [11] 安云庆,李玉兰,程松高,等. 用生物发光测定法取代现行卡介苗活菌计数法的实验研究[J]. 首都医学院学报,1988,9(3): 189-193.
- [12] Askgaard D S, Gottschau A, Knudsen K, et al. Firefly Luciferase Assay of Adenosine Triphosphate as a Tool of Quantitation of the Viability of BCG Vaccines [J]. Biologicals, 1995, 23: 55-60.
- [13] Hoffner S, Jimenez-Misas C, Lundin A. Improved Extraction and Assay of Mycobacterial ATP for Rapid Drug Susceptibility Testing [J]. Luminescence, 1999, 14: 255-261.
- [14] Jensen S E, Hubrechts P, Klein B M, et al. Development and Validation of an ATP Method for Rapid Estimation of Viable Units in Lyophilised BCG Danish 1331 Vaccine [J]. Biologicals, 2008, 36(5): 308-314.
- [15] 岳伟伟,周爱玉,何保山,等. 基于生物发光技术的细菌总数快速检测仪[J]. 微纳电子技术,2007,8(7):387-390.
- [16] 何保山,岳伟伟,罗金平,等. 基于生物发光的高灵敏度ATP检测研究[J]. 分析化学,2008,36(10):1427-1430.



刘晓红(1984-),女,博士研究生,研究方向为生物传感器;



蔡新霞(1966-),女,博士,中国科学院电子学研究所研究员,博士生导师,研究方向为新型生化传感器、微型检测系统等方面的研究,先后主持和参与承担多项国家级科研项目,在国内外核心学术期刊和学术会议上发表论文100余篇,xxcai@mail.ie.ac.cn.