

## 电感耦合等离子体质谱仪

作者：

Mariko Ikehata  
Jennifer Woolcock  
Michael E. P. Murphy

不列颠哥伦比亚大学生命科学中心微生物  
与免疫学系，加拿大不列颠哥伦比亚省温  
哥华市

Ruth Merrifield  
Chady Stephan

PerkinElmer, Inc.,  
加拿大安大略省伍德布里奇镇

## 利用 SC-ICP-MS 法测 定单个细菌细胞中的 铁含量

### 引言

铁是细菌细胞内部进行各种生物过程所必须的金属辅助因子。通常，铁作为一种可抑制细菌生长的营养元素，细胞中的总铁含量限额取决于细胞的生长状态

和代谢需要。细菌已进化出复杂的系统来调节细胞中铁含量。<sup>1</sup> 细胞内多余的可溶性铁是有毒的，这是由于过量的可溶性铁产生会损伤细胞组分的活性氧，这意味着必须严格控制细胞中的铁含量。然而，目前我们尚无法确定单个细胞内及整个细胞群内铁含量的调节情况。在确定细胞生长条件和应激反应的影响时，包括因使用抗生素产生的应激反应，在近乎实时地测定细菌细胞中的铁含量可提供关于细菌中铁耐受限值的信息。有趣的是，某些具有杀菌作用的粘土矿物和粘土提取物中的可溶性铁含量很高，这可能会破坏细菌细胞内的铁平衡，导致细菌死亡。<sup>2</sup> 此外，监测单个细胞内的铁含量还可了解细胞中铁的分布情况，从而确定细胞群的同质性。

ICP-MS 法可以分析成批培养的细菌细胞中的总金属含量，然后根据测得的细胞总数平均算出单个细菌细胞的铁含量。<sup>3</sup> 由于平板计数法无法计算死亡细胞或未被培养的完整细胞，导致计数出现误差。然而，由于仪器的限制，目前还未见有方法可直接分析单个细菌细胞中的铁含量。

基于单细胞 ICP-MS (SC-ICP-MS) 分析技术取得的重大进展，使得直接测定单个细胞内金属含量成为现实。PerkinElmer 公司专利的 Asperon™ 单细胞雾化器将单个完整细胞引入 ICP-MS 的等离子体中，结合 NexION® 系列 ICP-MS 质谱仪瞬时采集速度快的优势，可确定单个细菌细胞内的铁含量。在本次实验中，我们利用 SC-ICP-MS 法分别测定了三种菌株的单个细胞的铁含量。这三个菌株分别是**大肠杆菌 B 株 (Eco)**、**枯草芽孢杆菌 168 株 (BAC)** 和**红球菌 RHA1 株 (RHA)**。SC-ICP-MS 技术可直接测定单个细胞的铁含量，并确定每种菌株的铁含量分布情况。铁含量与细菌的细胞大小相关，即最大菌株 (RHA) 单个细胞的平均铁含量最高，而最小菌株 (Eco) 单个细胞的平均铁含量最低。

## 实验

### 细菌培养物

本次实验分析了三种非致病性菌株，即**大肠杆菌 B 株 (Eco)**、**枯草芽孢杆菌 168 株 (BAC)** 和**红球菌 RHA1 株 (RHA)**。根据以前的文献报道，上述菌株的细胞尺寸分别约为 2 μm、4 μm 和 10 μm ± 2。<sup>4,6</sup> 在本次实验中，平板分离的单克隆菌落分别接种于 3 个 5mL 的 LB 培养基试管中培养，然后在振荡培养箱中以 200 rpm 速度，37°C 过夜培养大肠杆菌 B 株和枯草芽孢杆菌 168 株；在振荡培养箱中以 200 rpm 速度，于 30°C 过夜培养红球菌 RHA1 株。

从每种过夜培养物中取一份等分样本 (1 mL)，接入到已经预热的含有 250 mL LB 培养基的烧瓶中，并将烧瓶放回振荡培养箱中，使得菌落在上述条件下继续生长。定期从每个烧瓶中取等分样本 (1 mL)，使用 Cary 50 Bio 紫外可见分光光度计 (Varian) 监测光密度 (OD<sub>600</sub>)。大肠杆菌 B 株和枯草芽孢杆菌 168 株持续生长，直至进入后期对数生长期，最终 OD<sub>600</sub> 分别为 1.7 和 1.4。红球菌 RHA1 株持续生长，直至进入后期稳定期，最终 OD<sub>600</sub> 为 2.3。

培养物被等分成 1 mL 样本，并储存在 50% 的甘油中于 -20°C 保存，然后进行 SC-ICP-MS 分析。菌落密度使用平板计数法进行单位体积菌落数统计。

表 1 SC-ICP-MS 分析细菌细胞样品。

样品名称	说明	细胞浓度 (CFU/mL)	测试细胞长度 (μm)
大肠杆菌 B 株	LB 培养基中的大肠杆菌 B 株和 50% 甘油	6.0 x 10 <sup>8</sup>	2
枯草芽孢杆菌 168 株	LB 培养基中的枯草芽孢杆菌 168 株和 50% 甘油	8.5 x 10 <sup>7</sup>	4
红球菌 RHA1 株	LB 培养基中的红球菌 RHA1 株和 50% 甘油	9.5 x 10 <sup>7</sup>	10
空白样品	LB 培养基和 50% 甘油	n/a	n/a

### SC-ICP-MS 分析

将细菌细胞样品 (表 1) 放入 35°C 水浴中解冻 1min，然后将样品置于冰袋，使用 1% 磷酸盐缓冲液 (PBS) 将样品稀释至含有 100,000 个细胞 /mL-1 的样品稀释液后立即上机 SC-ICP-MS 分析。样品在使用前应单独解冻，以防止细菌随着时间推移而降解。SC-ICP-MS 以 dwell time 50 μs (停留时间)，每个样品分析时间 1min，重复测定三次。测试将消耗 100 μL 样品。通过采用 ICPMS 的纯氦气通入反应池的模式 (反应模式)，消除 ArO<sup>+</sup> 对 <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> 的干扰。SC-ICP-MS 工作条件见表 2。

表 2 NexION ICP-MS 质谱仪工作条件

参数	数值
样品摄取速率	19.5 μL/min
雾化器	HEN MEINHARD® 玻璃同轴雾化器
雾化室	Asperon 单细胞雾化室
中心管	内径 2.0 毫米石英中心管
射频功率	1500 W
雾化气流量	0.34 L/min
辅助气流量	0.7 L/min
待测物	<sup>56</sup> Fe
反应模式	氦气通入速率 0.35 mL/min, RPq=0.5
传输效率	33%

本次实验利用浓度为 50,000 part/mL 的 NIST 60 nm (8013) 金纳米颗粒标准物质，和浓度为 33,000 part/mL 的含有镧系金属 (Ce、Eu、Ho 和 Lu) 的 Fluidgim 2.5 μm 聚苯乙烯微球来测试方法传输效率 (TE)。使用浓度分别为 1、2 和 3 ppb 的 Fe 离子标准液进行溶解离子校准。所有校准标准液的基质均与样品基质匹配，均使用 1% PBS 制备。

### ICP-MS 分析

对于 SC-ICP-MS 分析，大肠杆菌 B 株、枯草芽孢杆菌 168 株和红球菌 RHA1 株均生长至具有相同的光密度，并离心至一个细菌细胞聚合体上。然后，立即将样品冷冻、冷冻干燥并混匀。称取制备好的样品 (10 - 30 mg) 放入 Savillex® PFA 中。加入 Optima® 级浓硝酸在电热板上进行密闭消解。消解后将样品加热至近干，复溶于 5 mL 的 0.05 M HNO<sub>3</sub> 中。加拿大国家研究院的 NRCC 龙虾肝胰脏 (TORT-1) 作为标准参考物质。使用纯氦气的反应模式分析 <sup>56</sup>Fe (ICP-MS 质谱仪的工作条件见表 2)。

## 结果与讨论

### 对照样本

本次试验还分析了 1% 的 PBS 控制样品和 50% 的甘油 LB 培养基空白样品（上述样本均按照细菌细胞样品进行相同处理）。图 1 表示 1% PBS 控制样品和空白基质样品的扫描结果，这两份样品均按照与细菌样品相同的步骤进行处理。在这两个样品中，并未发现铁的信号。

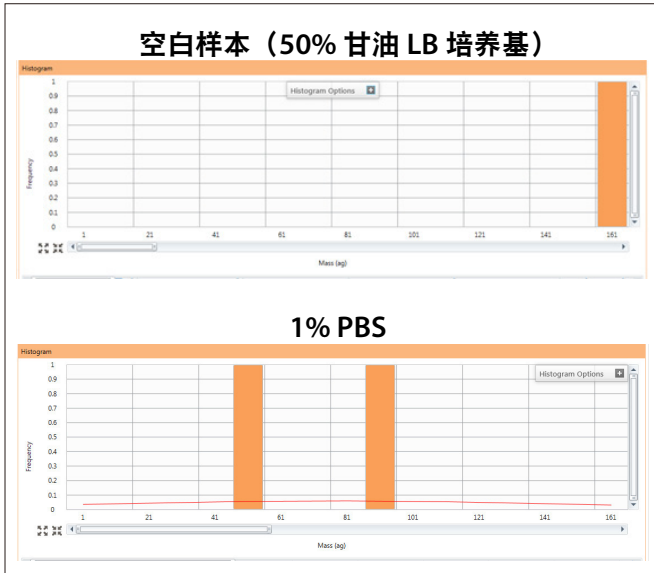


图 1. 按照细菌样品进行相同处理的 50% 甘油 LB 培养基空白样品的  $^{56}\text{Fe}$  信号扫描图和 1% PBS 空白样品的  $^{56}\text{Fe}$  信号扫描图。

### 细菌测试

图 2 表示细胞浓度为 50,000 个细胞 / mL 时，大肠杆菌 B 株、枯草芽孢杆菌 168 株和红球菌 RHA1 株的  $^{56}\text{Fe}$  的信号扫描图。结果表明，每种菌株的单个细菌细胞中  $^{56}\text{Fe}$  平均含量不同，其中，大肠杆菌 B 株细胞中的  $^{56}\text{Fe}$  含量最低，而红球菌 RHA1 株细胞中的  $^{56}\text{Fe}$  含量最高。四种细菌单个细胞中 Fe 含量的百分比变化均相似。分裂旺盛的细胞群的差异性造成细胞长度和每个细胞中铁含量分布存在差异的原因。在细胞培养中，大多数细胞处于成熟的单细胞状态，仅少数细胞经历细胞分裂。在准备分裂时，细胞变大，从而将一个细胞分裂成两个细胞。细胞群内的差异可能导致上述结果，其中大部分细胞处于正常范围内，仅一小部分细胞变得更长且铁含量更高。此外，红球菌 RHA1 株细胞更易“聚集成群”，从少数的单细胞测定结果中可发现有二个或以上细胞聚集成群。由此，在 160-170 ag 标记处显示的第二个分布正对应两个细胞聚集体。

细菌细胞经系列稀释后进行测定，以测试细胞重叠现象（即两个或以上细胞同时进入等离子体）。图 3A 和 3B 表明，将细菌细胞稀释至 100,000、75,000 和 50,000 个细胞 / mL 浓度时，单个细胞的铁平均含量并没有发生变化，反而每次稀释后，细胞数量呈线性变化，结果表明，细胞浓度对细胞重叠无显著影响。

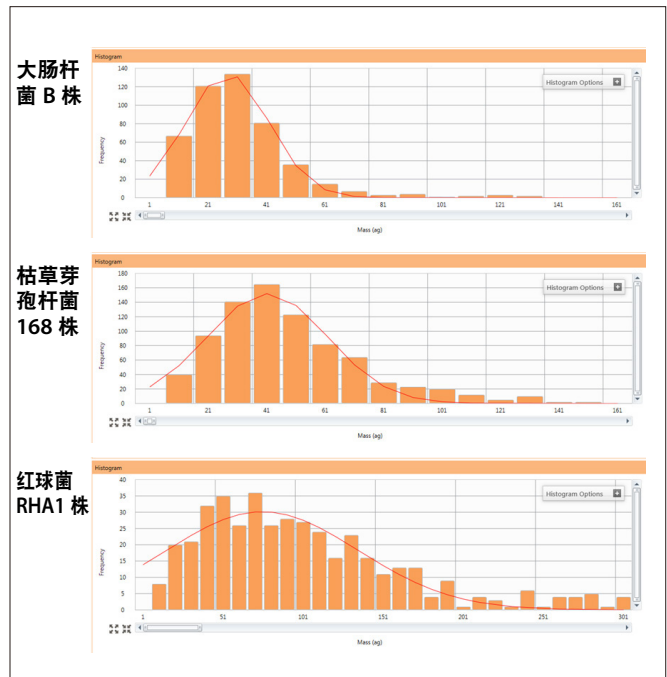


图 2. 表示细胞浓度为 50,000 个细胞 / mL 时，大肠杆菌 B 株、枯草芽孢杆菌 168 株和红球菌 RHA1 株的  $^{56}\text{Fe}$  的信号扫描图，表明了单个细胞中铁含量的分布情况。图中显示含有定量铁（平均含量）的大肠杆菌 B 株、枯草芽孢杆菌 168 株和红球菌 RHA1 株的细胞频率，其中大肠杆菌 B 株的单个细胞平均铁含量最低，而红球菌 RHA1 株的单个细胞平均铁含量最高。

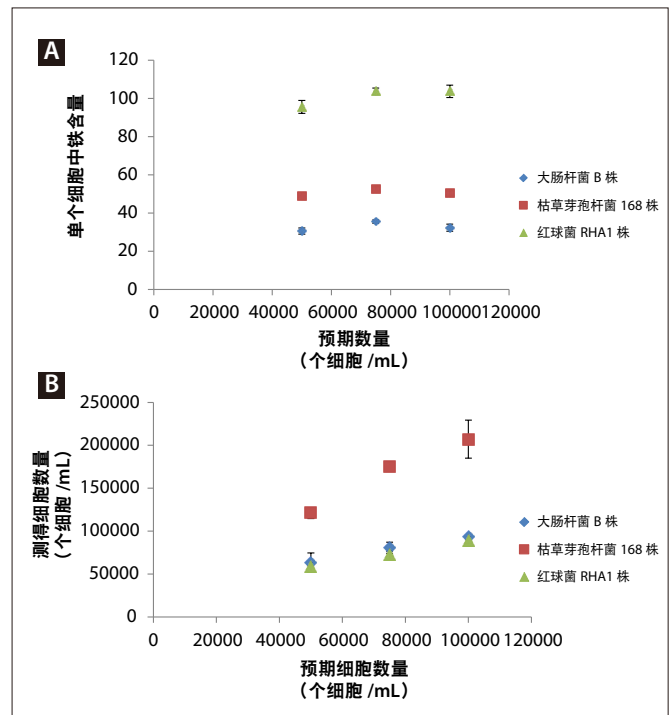


图 3. (A) 表示三种细菌样品（大肠杆菌 B 株、枯草芽孢杆菌 168 株和红球菌 RHA1 株）分别在 100,000、75,000 和 50,000 个细胞 / mL 稀释液中，其预期细胞数量与单个细胞中铁含量之间的关系。对于这三种细菌测试的所有样品，样品的细胞数量对单个细胞中铁的含量几乎没有影响。(B) 100,000、75,000 和 50,000 个细胞 / mL 稀释液中预期细胞数量与各稀释液中实际测得的细胞数量之间的关系。在有三种细菌的所有样品中，给定稀释液中预期细胞数量与实际测得的细胞数量呈线性关系。

## 铁含量与细菌长度之间的关系

以三种菌株中细胞内平均铁含量对每种菌株的测试长度作图。菌株长度可用作衡量细菌数量的指标。图 4 表明了细菌细胞中铁含量与其长度之间呈线性关系。

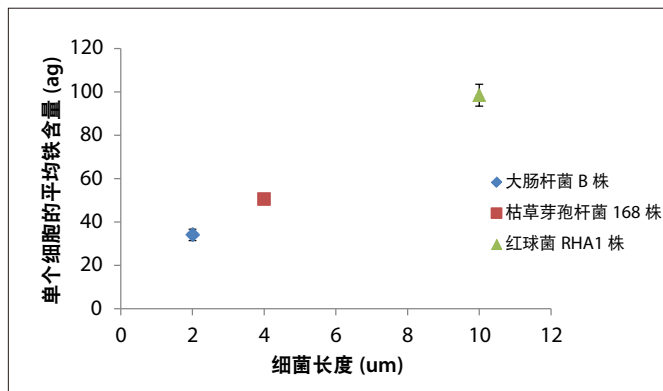


图 4. 以单个细菌细胞长度对应测得的单个细胞平均铁含量作图。从图上可看出，细胞长度与测得的单个细胞内铁含量之间呈正相关，其中长度最长的细菌（红球菌 RHA1 株），其细胞内铁含量最高，而长度最短的细菌（大肠杆菌 B 株）中，其细胞内铁含量最低。

## 结论

本次试验证明，单细胞 ICP-MS 法可以准确定量单个细菌细胞中的铁含量。此外，此方法还可以提供细菌培养物中的单个细胞内铁分布信息。所建立的分析方法可以为严格控制细菌细胞的总铁含量提供支持。SC-ICP-MS 法还可用于在不同应激条件下生长的细菌细胞中铁含量分布的测定。

## 参考文献

1. Loutet S.A., Chan A.C.K., Kobylarz M.J., Verstraete M.M., Pfaffen S., Ye B., Arrieta A.L., and Murphy M.E.P. "The Fate of Intracellular Metal Ions in Microbes." Trace Metals and Infectious Diseases. Ed. J.O. Nriagu, Ed. E.P. Skaar. Cambridge: MIT Press, 2015. Print.

2. Morrison K.D., Misra R., and Williams L.B. "Unearthing the Antibacterial Mechanism of Medicinal Clay: A Geochemical Approach to Antibiotic Resistance." Nature Scientific Reports 6.19043 (2016): 1-13.
3. Outten C.E. and O'halloran T.V. "Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis." Science 292.5526 (2001): 2488-2492.
4. Reshes, G., et al. "Cell shape dynamics in Escherichia coli." Biophysical journal 94.1 (2008): 251-264.
5. Allen, C.S., et al. "Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore-based technique." Applied microbiology and biotechnology 98.2 (2014): 855-862.
6. Patrauchan, M.A., et al. "Proteomic analysis of survival of Rhodococcus jostii RHA1 during carbon starvation." Applied and environmental microbiology 78.18 (2012): 6714-6725.
7. Bratbak, G., and Dundas, I. "Bacterial dry matter content and biomass estimations." Applied and environmental microbiology 48.4 (1984): 755-757.
8. Neidhardt, F.C. Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology. Vol 1. pp. 14, ASM Press 1996.
9. Carrera M., Zandomeni R.O., and Sagripanti J-L. "Wet and dry density of Bacillus anthracis and other Bacillus species." Journal of applied microbiology 105.1 (2008): 68-77.

## 使用的耗材

组件	说明	货号
雾化室废液管	橙色 / 红色 (直径 1.30 mm)、PVC 材质、扩口泵管、一组 12 个	N0773111
铁离子储备液	1000 ppm 铁离子溶液, 125 mL	N9303771
50 nm 金纳米粒子	1e7 粒子 /mL, 25 mL	N8151035
PFA 样本瓶	1 mL, 一组 10 个 2 mL, 一组 10 个	N0777403 N0777404

珀金埃尔默企业管理（上海）有限公司  
地址：上海 张江高科技园区 张衡路 1670 号  
邮编：201203  
电话：021-60645888  
传真：021-60645999  
www.perkinelmer.com.cn



查看完整的全球办事处名单，请访问 [www.perkinelmer.com/ContactUs](http://www.perkinelmer.com/ContactUs)

©2018, PerkinElmer, Inc. 版权所有。保留所有权利。PerkinElmer® 是 PerkinElmer, Inc. 公司的注册商标。所有其他商标均为其各自所有者的财产。