

利用 F_0F_1 -ATPase分子马达生物传感器检测食品中的副溶血性弧菌

张捷¹, 顾德周¹, 张惠媛¹, 刘岩¹, 汪琦¹, 张昕¹, 王佩荣², 陶雨凤³, 范斐¹, 陈广全^{1,*}, 乐加昌²
(1.北京出入境检验检疫局, 北京 100026; 2.中国科学院生物物理研究所, 北京 100101;
3.中国合格评定国家认可委员会, 北京 100062)

摘要: 利用载体上的 F_0F_1 -ATPase分子马达生物传感器对副溶血性弧菌检测快速检测。在ATP合酶的 ϵ 亚基上连接 ϵ 亚基抗体-生物素-链霉亲和素-生物素-*toxR*探针, 将待测副溶血性弧菌标准菌株和阴性对照分别与生物传感器结合后, 比较其催化ATP合成30min后的ATP产生量, 可以对副溶血性弧菌的DNA进行检测。ATP合成的多寡可以通过环境中 H^+ 的量进行测量, 而 H^+ 的多寡通过F-DHPE所体现的荧光强度大小来获得。结果表明, *chro toxR*的质量浓度在0.156mg/mL, 副溶血性弧菌DNA质量浓度在40ng/mL时为最适检出条件。通过与实际检测样品的传统检测方法及聚合酶链式反应检测方法对照, 具有良好的符合性。

关键词: F_0F_1 -ATPase分子马达; 生物传感器; 副溶血性弧菌; 快速检测

Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Foods Using F_0F_1 -ATPase Molecular Motor Biosensor

ZHANG Jie¹, GU De-zhou¹, ZHANG Hui-yuan¹, LIU Yan¹, WANG Qi¹, ZHANG Xin¹,
WANG Pei-rong², TAO Yu-feng³, FAN Fei¹, CHEN Guang-quan^{1,*}, YUE Jia-chang²

(1. Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China;

2. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

3. China National Accreditation Service for Conformity Assessment, Beijing 100062, China)

Abstract: An F_0F_1 -ATPase molecular motor biosensor was used to rapidly detect *Vibrio parahaemolyticus* in foods. For the construction of a biosensor, a specific *toxR* probe was connected to the ϵ subunit of F_0F_1 -ATPase avidin-biotin system using an avidin-biotin system. The detection of *Vibrio parahaemolyticus* was based on differences in ATP production 30 min after separate conjugation of *Vibrio parahaemolyticus* and negative control to the constructed biosensor. ATP production was determined by measuring the H^+ amount in the environment, which was dependent on the fluorescence intensity of F-DHPE. The optimum concentrations of *chro toxR* and *Vibrio parahaemolyticus* DNA for detecting *Vibrio parahaemolyticus* were found to be 40 ng/mL and 40 ng/mL, respectively. In practical applications, the results obtained by this method were in good agreement with those obtained by traditional detection methods and PCR.

Key words: F_0F_1 -ATPase molecular motor; biosensor; *Vibrio parahaemolyticus*; rapid detection

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)24-0226-04

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种嗜盐性革兰氏阴性菌, 是一种食源性致病菌, 主要存在于贝类、虾等海产品。该菌可引起人的腹泻、恶心、发烧等典型的胃肠炎反应及食物中毒^[1]。目前, 包括我国在内的许多国家对副溶血性弧菌的检验普遍采用传统培养方法, 报告检验结果大致需4d, 加之检验方法繁琐、费时费力, 不仅成为检验部门的一项沉重负担, 而且越来越不能满足日益发展的国际贸易的需要^[2]。本研究创新性

地应用高灵敏生物传感器 F_0F_1 -ATP酶检测技术对食品中的副溶血性弧菌进行研究。 F_0F_1 -ATP酶是一旋转分子马达, 它既能利用跨膜 H^+ 梯度合成ATP, 又能水解ATP而反向转运 H^+ 。在ATP合成过程中, 质子能够从色素体膜内泵到膜外侧, 导致内膜微环境溶液 H^+ 浓度变化。研究发现, 在 F_0F_1 -ATP酶上连接负载会不同程度影响其旋转性能, 在其 ϵ 亚基上连接上特异性探针能引起质子转运速率的改变^[3-4]。基于以上两理论, 本研究在ATP酶上负载目

收稿日期: 2011-10-20

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2011HK191)

作者简介: 张捷(1965—), 男, 高级工程师, 博士, 主要从事食品检测和食品安全评估研究。E-mail: zhangjie@bjciq.gov.cn

*通信作者: 陈广全(1963—), 男, 研究员, 学士, 主要从事食品检测和食品安全评估研究。E-mail: chengq@bjciq.gov.cn

标检测物(DNA),以对pH值敏感的荧光探针的荧光强度作为信号反应负载程度,以达到检测目的。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鼠伤寒沙门氏菌*Salmonella* ATCC14028、嗜热菌*Thermomicrobium roseum* ATCC27502、副溶血性弧菌ATCC17802、霍乱弧菌ATCC14035、单增李斯特氏菌ATCC15313-1、大肠杆菌ATCC25922 美国典型菌种保藏中心;30株样品副溶血性弧菌菌株为本实验室检测分离获得。

3%氯化钠碱性蛋白胨水(APW)、科玛嘉弧菌显色培养基(OMagar)、3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂(TSA) 北京陆桥技术有限责任公司;PBS buffer、合成buffer 实验室自制;生物素(Biotin-AC5-Sulfo-Osu) 日本Dojindo公司;链球菌抗生物蛋白(Streptavidin) 美国sigma公司;荧光素酶 美国Promega;超纯水 实验室自制;DNA提取试剂盒(离心柱型)DP320 天根公司;其他试剂为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

恒温培养箱、CP100MX超速冷冻离心机、F4500荧光光谱仪 日本Hitachi公司;恒温摇床 江苏太仓实验仪器设备厂;超纯水仪 美国Thermo公司;化学发光检测仪 美国Promega公司;高压灭菌器 上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 方法

1.3.1 标准菌株的培养及DNA的提取

将副溶血性弧菌标准菌株接种到3%氯化钠碱性蛋白胨水(APW)中活化增菌,37℃培养24h。然后将副溶血性弧菌转接到科玛嘉弧菌显色培养基(CHR),37℃培养24h。最后将选择性增菌的副溶血性弧菌转接到含3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)37℃培养24h,用于DNA的提取。

沙门氏菌、霍乱弧菌、单增李斯特氏菌、大肠杆菌的标准菌株均按现行国家食品卫生微生物学检测标准进行增菌及选择性养,最后获得的菌体用于DNA的提取。

将培养获得副溶血性弧菌用DNA提取试剂盒(离心柱型)DP320进行提取,详细操作步骤见试剂盒说明书。获得的菌体的DNA提取液用作聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增时的模板以及分子马达传感器的目标检测物。该DNA提取液置于冰箱中-20℃保存,使用时置于室温自然解冻,然后用振荡器振荡混匀。

1.3.2 载色体(Chromatophore)的制备

将嗜热菌*Thermomicrobium roseum*菌种按比例1:100接种到液体培养基,60℃、150r/min,培养24h。

然后4000r/min,30min,4℃离心收集菌体。用提取Buffer(20mmol/L Tris-Cl pH8.0、100mmol/L NaCl、2mmol/L MgCl₂、1mmol/L DTT)重悬菌体,离心去上清(6000r/min,10min,4℃)。加入提取Buffer重悬菌体(约1g加入10mL Buffer),再加入终浓度1mmol/L PMSF,冰上超声破碎30min(超声5s,停8s)。将破碎菌体离心(25000×g,30min,4℃),去沉淀取上清。将上清超速离心(145000×g,1h,4℃),取沉淀即为Chromatophore。最后用提取Buffer重悬沉淀并加入终浓度50%的甘油-80℃保存。

1.3.3 探针的合成及传感器的构建

通过文献及标准的查找,确定将副溶血性弧菌特异性基因*toxR*作为目的基因片段^[5],选取*toxR*基因上游5'保守序列GTG TTC TGA CGC AAT CGT TG合成核酸探针,其中5'用biotin进行标记,此探针由上海生工公司合成。另外合成5'-GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG-3'和5'-ATACGA GTG GTT GCT GTC ATG-3'用于PCR验证。

先将F-DHPE用氯仿配成200mg/mL,分装200μL/管后用氮气吹干放于-70℃保存。从冰箱中取出一管已吹干的F-DHPE,加入200μL无水乙醇将其充分溶解。取200μL Chromatophore原液放入1.5mL进口离心管中,加入10μL F-DHPE,上下颠倒混匀5次,用铝箔纸包起后避光放在室温摇床上孵15min。用PBS补至1.3mL,30000r/min,4℃超速离心15min,收集沉淀。重复用PBS洗3次以去除多余的荧光探针,将沉淀用200μL PBS重悬备用。

取出200μL已标好F-DHPE的Chromatophore,加入40μg N-biotin标记ε亚基抗体,用PBS补加至1mL,37℃反应1h;用PBS补加至1.4mL,4℃、30000r/min超速离心10min;弃上清液,将沉淀用500μL PBS重悬;加入Avidin(2mg/mL)2μL,用PBS补加至1mL,室温摇床上(转速50~100r/min)反应10min;用PBS补加至1.4mL,4℃、30000r/min超速离心10min,弃上清液,将沉淀用500μL PBS重悬加入N-biotin标记的核酸探针(10μmol/L)50μL,用PBS补加至1mL,室温摇床上(转速50~100r/min)反应10min;每管用PBS补加至1.4mL,4℃、30000r/min超速离心10min,弃上清,用150μL含30%甘油的PBS重悬Chromatophore,在管壁上标明制作日期、连接体系、制作人等信息,放入-20℃冰箱备用。

1.3.4 分子马达检测体系的构建

取1.5mL EP管,加入样本10μL。将上述EP管放入沸水中3min,然后立即转移到冰上至完全冷却。取2μL *chro toxR*,用合成buffer稀释到一定的倍数。取稀释后的*chro* 10μL加入EP管。另取1个EP管加入10μL H₂O,置于沸水中3min,然后立即转移到冰上至完全冷却,再加入10μL合成buffer作为本底对照,短暂振荡使反应液混匀。再向2管中分别加入30μL启动buffer,振荡使反应液混匀,然

后立即短暂离心使管壁上的液滴流下。将上述反应体系放入37℃恒温摇床中温育30min，启动反应。将EP管从摇床中取出，分别加入450μL PBS缓冲液，振荡使体系混匀。取一块干净的96孔板，将2管中的最终反应体系加入其中，每个体系加3孔，每孔加样50μL，然后对每个加样孔分别加入30μL的荧光素酶溶液，用枪反复吹打几次使溶液混匀。将96孔板上机检测，读取数据，对每组数据取平均值，然后用样本数值减去本底数值即为样本的实际荧光值。

2 结果与分析

2.1 chro *toxR*特异性实验

用chro *toxR*分别检测沙门氏菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌、单增李斯特氏菌、大肠杆菌的DNA。测得chro *toxR*初始质量浓度为1.558mg/mL，本试验在chro *toxR*质量浓度0.0260mg/mL、DNA质量浓度10ng/mL、37℃条件下启动30min，检测反应终体系的荧光值，结果见图1。

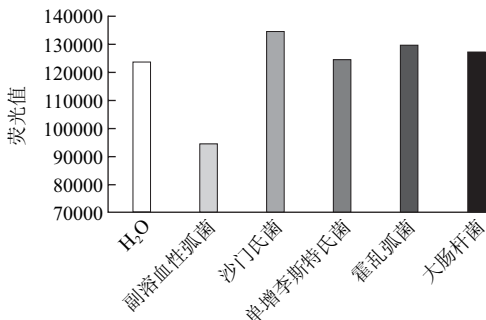


图1 chro *toxR*对副溶血性弧菌的特异性结果
Fig.1 Specificity of chro *toxR* to *Vibrio parahaemolyticus*

由图1可以看出，chro *toxR*对副溶血性弧菌具有良好的特异性，能够区分不同种属的细菌。因此在后续的研究中，继续选择*toxR*基因为目的基因。

2.2 副溶血性弧菌DNA在chro *toxR*不同稀释倍数下的检测

测得原始chro *toxR*的质量浓度为1.558mg/mL，对其进行10、20、30、40、50、60、70、80、90、100倍梯度稀释，得到对应的chro *toxR*的质量浓度分别为0.1558、0.0779、0.0519、0.0390、0.0312、0.0260、0.0223、0.0195、0.0173、0.0156mg/mL。副溶血性弧菌DNA的质量浓度分别为10ng/mL，37℃条件下启动30 min，检测最终反应体系的荧光值，结果见表1。其中，差值为水和副溶血性弧菌荧光测量值的差值的绝对值。

由表1可以看出，chro *toxR*的质量浓度在0.1558mg/mL时，最终体系的荧光值强度差值的绝对值最大。chro *toxR*在10倍稀释下的检测结果较为理想，原因为目标物与ATPase上的ε亚基结合后，ε亚基转速变慢，ATPase的

合成速率下降，H⁺在膜外积聚，对反应体系起到抑制作用，使得最终的荧光值降低；而H₂O作为阴性对照，对反应体系不产生影响，最终反应体系的荧光值比目标检测物的荧光值要高，符合理论检测效果。因此选择chro *toxR*在10倍稀释下的质量浓度作为检测质量浓度。在chro *toxR*质量浓度的选择上，一般不去稀释更小的倍数，一是由于初始chro *toxR*的量很少，获得不方便；二是chro *toxR*的质量浓度太高容易使实验中的操作误差放大，不利于对结果的判定。

表1 chro *toxR*不同质量浓度下H₂O、副溶血性弧菌的荧光检测值
Table 1 Fluorescence of H₂O and VP in the presence of chro *toxR* at various concentrations

chro <i>toxR</i> 稀释倍数	chro <i>toxR</i> 质量 浓度/(mg/mL)	H ₂ O的荧光 检测值	副溶血性弧菌的 荧光检测值	差值 (绝对值)
100	0.0156	164838	179463	14625
90	0.0173	205656	181849	23807
80	0.0195	227846	217350	10496
70	0.0223	247842	260039	12197
60	0.0260	331117	294111	37006
50	0.0312	390654	368798	21856
40	0.0390	400962	474532	73570
30	0.0519	640878	644088	3210
20	0.0779	903960	952289	48329
10	0.1558	1694445	1506873	187572

2.3 10倍稀释的chro *toxR*对不同质量浓度的副溶血性弧菌DNA的检测

在10倍稀释的chro *toxR*条件下，对DNA质量浓度分别为100、90、80、70、60、50、40、30、20、10ng/mL的副溶血性弧菌进行了检测。37℃条件下启动30min，对不同DNA质量浓度下的副溶血性弧菌进行检测得出的H₂O和副溶血性弧菌的荧光值及H₂O和副溶血性弧菌的荧光差值取绝对值见表2。

表2 不同DNA质量浓度下H₂O、副溶血性弧菌的荧光检测值
Table 2 Fluorescence of H₂O and VP under different *Vibrio parahaemolyticus* DNA concentrations

DNA质量 浓度/(ng/mL)	H ₂ O的荧光 检测值	副溶血性弧菌的 荧光检测值	差值(绝对值)
10	131286	125988	5298
20	131286	125988	5298
30	131286	129713	1573
40	131286	112506	18780
50	131286	140251	8965
60	131286	133351	2065
70	131286	138707	7421
80	131286	145539	14253
90	131286	130094	1192
100	131286	130886	400

由表2可知，当副溶血性弧菌的DNA质量浓度在40ng/mL时，差值最大，即有最佳检测效果。通过以上两组实验数据的比较，可以得知在DNA质量浓度为40ng/mL及chro *toxR*稀释10倍时有较为理想的检出效果。在此条件下进行重复实验，重复性良好。

2.4 F_0F_1 -ATPase分子马达检测技术与传统检测方法 及PCR法检测结果对比

为了验证利用 F_0F_1 -ATPase分子马达检测的效果,选取实际食品检测工作中的样本进行试验。图2显示了在DNA质量浓度为40ng/mL及chro *toxR*稀释10倍的条件下,利用 F_0F_1 -ATPase分子马达技术检测上述30株实际检测出的阳性菌株的结果。通过表3中与国标的检测方法及PCR法检测结果的对比,表明其具有良好的检出效果。

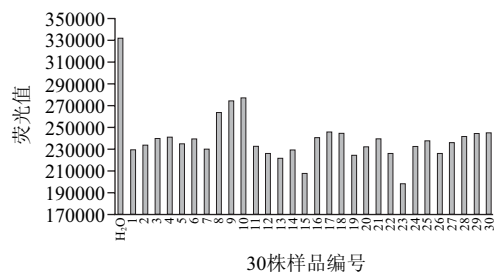


图2 利用chro *toxR*对食品样品的检测结果

Fig.2 Detection results of *Vibrio parahaemolyticus* in food samples using chro *toxR*

表3 不同检测方法结果比较
Table 3 Comparison of different detection methods

样品 编号	GB/T 4789.7-2008	PCR法	F_0F_1 -ATPase 分子马达	样品 编号	GB/T 4789.7-2008	PCR法	F_0F_1 -ATPase 分子马达
1	+	+	+	16	+	+	+
2	+	+	+	17	+	+	+
3	+	+	+	18	+	+	+
4	+	+	+	19	+	+	+
5	+	+	+	20	+	+	+
6	+	+	+	21	+	+	+
7	+	+	+	22	+	+	+
8	+	+	+	23	+	+	+
9	+	+	+	24	+	+	+
10	+	+	+	25	+	+	+
11	+	+	+	26	+	+	+
12	+	+	+	27	+	+	+
13	+	+	+	28	+	+	+
14	+	+	+	29	+	+	+
15	+	+	+	30	+	+	+

3 结 论

实验结果表明,利用 F_0F_1 -ATPase分子马达生物传感器可以对副溶血性弧菌进行检测,其检出限为能够达到10ng/mL。该方法可以满足食品微生物定性检测要求。利

用chro *toxR*对副溶血性弧菌进行检测时,其检测的特异性得到了充分的证明。采用传统方法、PCR法及分子马达检测技术对食品样品中获得的30株副溶血性弧菌进行符合性实验,结果表明:利用 F_0F_1 -ATPase分子马达生物传感器对其检测,可以达到与传统检测方法及PCR法相同的结果。由于检测使用的是96孔发光板,不仅可以实现对样品的高通量检测,还为分子分型提供了可行性。此外,由于该方法操作较为简便,所用试剂均为实验室自行配制,可以为实验室节约人力和物力。利用该方法进行实际检测可以缩短检测时间,为我国进出口食品检测领域提供了一种快速检测的途径。

由于本实验采用的是液相法,即参与反应的试剂和样本均在液相体系中进行,所以当样品不纯或含有其他杂质时,会影响结果的判定。因此,还可将分子马达生物传感器固定在膜上,当样本流过此膜时,目标物就会与传感器结合而固定在膜上,其他杂质则不与膜结合而被洗脱掉,减少了干扰^[6]。由于此方法尚处于研究的初期,因此,固相法的研究还需进一步的完善。分子马达生物传感器具有良好的特异性、高的灵敏度以及检测时间短等优点^[7],在临床诊断、工业控制、食品和药物分析(包括生物药物研究开发)、环境保护以及生物技术、生物芯片等研究中将会有更加广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] MARTINEZ-URTAZA J, LOZANO-LEON A, DEPAOLA A, et al. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(10): 4672-4678.
- [2] CAI Tanxi, JIANG Luyan, YANG Chengbo, et al. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in eastern China[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 46(2): 180-186.
- [3] 魏玲, 武会娟, 伦永志, 等. 用免疫生物传感器快速检测金黄色葡萄球菌的初步研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(6): 498-501.
- [4] ZHANG Yinghao, WANG Jun, CUI Y B, et al. Rotary torque produced by proton motive force in F_0F_1 motor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 331(1): 370-374.
- [5] YUNG B K, JUN O, CHIHO M, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene[J]. Journal Of Clinical Microbiology, 1999, 37(4): 1173-1177.
- [6] LIU Xiaolong, ZHANG Yun, YUE Jiaohang, et al. F_0F_1 -ATPase as biosensor to detect single virus[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 342(4): 1319-1322.
- [7] LIAO Jieying, YIN J Q, YUE Jiachang. A novel biosensor to detect microRNAs rapidly[J]. Journal of Sensors, 2009. DOI: 10.1155/671896.