

# 基于分子马达生物传感器技术的副溶血性 弧菌分子分型方法的初步研究

张捷<sup>1Δ</sup> 李兆杰<sup>2Δ</sup> 王煜<sup>3</sup> 张惠媛<sup>1</sup> 陆琳<sup>1</sup> 王静<sup>2\*</sup> 刘岩<sup>1</sup> 顾德周<sup>1</sup> 汪琦<sup>1</sup>  
张昕<sup>1</sup> 王佩荣<sup>4</sup> 乐加昌<sup>4</sup> 陈广全<sup>1</sup>

- (1. 北京出入境检验检疫局 北京 100026)
- (2. 威海出入境检验检疫局 山东 威海 264205)
- (3. 中国合格评定国家认可中心 北京 100062)
- (4. 中国科学院生物物理研究所 北京 100101)

**摘要:**【目的】建立基于分子马达技术的简便快速的分子分型方法,对携带和非携带毒力基因的副溶血性弧菌进行快速分类。【方法】以  $F_0F_1$ -ATPase 为核心构建分子马达,以副溶血性弧菌毒力基因 *tdh*、*trh* 和种特异性基因 *tlh*、*toxR* 为靶基因设计 4 个探针。通过生物素-亲和素系统将探针与分子马达连接构建  $F_0F_1$ -ATPase 分子马达生物传感器,对 10 株副溶血性弧菌分离株进行分类,并与 PCR-电泳-凝胶成像结果进行比较;同时对生物传感器的检测灵敏度和特异性进行研究。【结果】10 株试验菌株中 10 株 *tdh* 阳性,0 株 *trh* 阳性,而 10 株菌都携带 *tlh* 和 *toxR*,与 PCR-电泳-凝胶成像结果一致;分子马达生物传感器的最低检测限为 1 pg/反应体系,且能够对副溶血性弧菌特异性识别,PCR-电泳-凝胶成像方法的最低检测限为 10 pg/PCR 反应体系。【结论】建立了基于分子马达的分子分型方法,能够对副溶血性弧菌的致病性进行快速诊断,检测灵敏度比 PCR-电泳-凝胶成像方法高了 10 倍,而且特异性非常高。该方法简便、快速、省时、省力,适用于地方疾控部门和口岸检疫部门的基层实验室开展副溶血性弧菌监测和流行病学溯源工作。

**关键词:** 副溶血性弧菌, 分子马达, 分子分型, 毒力基因

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(No. 2011HK191, 2012IK179)

\*通讯作者: Tel: 86-10-58619231; 信箱: wangjing7548@sohu.com

Δ并列第一作者

收稿日期: 2012-09-10; 接受日期: 2013-02-22

# A preliminary study on molecular typing method for *Vibrio parahaemolyticus* based on molecular motor biosensor

ZHANG Jie<sup>1Δ</sup> LI Zhao-Jie<sup>2Δ</sup> WANG Yu<sup>3</sup> ZHANG Hui-Yuan<sup>1</sup> LU Lin<sup>1</sup>  
WANG Jing<sup>2\*</sup> LIU Yan<sup>1</sup> GU De-Zhou<sup>1</sup> WANG Qi<sup>1</sup> ZHANG Xin<sup>1</sup>  
WANG Pei-Rong<sup>4</sup> YUE Jia-Chang<sup>4</sup> CHEN Guang-Quan<sup>1</sup>

(1. Beijing Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

(2. Weihai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Weihai, Shandong 264205, China)

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

(4. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** [Objective] To establish a simple and rapid molecular typing method for *Vibrio parahaemolyticus* carrying and non-carrying virulence genes based on molecular motor. [Methods] Four probes specific to virulence genes *tdh* and *trh*, species-specific genes *tlh* and *toxR* of *V. parahaemolyticus* were synthesized, and four molecular motor biosensors were constructed by connecting probes to F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase molecular motors through biotin-streptavidin system, respectively. Ten strains of *V. parahaemolyticus* were classified by the biosensors, and the results were compared with PCR-Electrophoresis-Gel imaging results. Further more, the detection sensitivities and specificities of the molecular motor biosensors were studied. [Results] There were ten strains carrying *tdh* and none carrying *trh*, while all ten strains carry *tlh* and *toxR*, which was consistent with the results of PCR-Electrophoresis-Gel imaging. The detection limits of molecular motor biosensors for *tlh*, *toxR*, *tdh* and *trh* were estimated to be 1 pg/reaction system, and the detection limits of PCR-Electrophoresis-Gel imaging for *tlh*, *toxR*, *tdh* and *trh* were estimated to be 10 pg/reaction system. The molecular motor biosensors could recognize *tlh*, *toxR*, *tdh* and *trh* of *V. parahaemolyticus* specifically. [Conclusion] A molecular typing method was constructed based on molecular motor biosensors and was used to diagnose the pathogenicity of *V. parahaemolyticus* rapidly and specifically. The detection limits was 10 times higher than those of PCR-Electrophoresis-Gel imaging. The method is easy, rapid, time-saving and labor-saving, especially suitable for the basic laboratories of CDC and port quarantine departments to perform surveillance and epidemiological traceability of cholera.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, Molecular motor, Molecular typing, Virulence gene

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus* 或 *Vp*), 弧菌属, 是一种革兰氏阴性嗜盐菌, 是沿海地区常见的一种食源性致病菌, 可导致患者腹泻、肠痉挛、恶心、呕吐、发烧等典型胃肠炎反应<sup>[1]</sup>。同时也能感染鱼、虾、

蟹类以及甲壳类等多种水产动物, 给海水养殖业带来危害<sup>[2-3]</sup>。近年来, 副溶血性弧菌引起的食物中毒事件在世界各地频繁发生, 特别是沿海城市。1988 年以来的报道显示, 副溶血性弧菌引发食物中毒的发生规模及人群暴露规模呈明显上

升趋势, 已超过沙门氏菌, 跃居首位<sup>[4]</sup>。因此, 副溶血性弧菌的危害性不容忽视。

尽管大多数的副溶血性弧菌不会导致人类生病, 但仍有一定特征的副溶血性弧菌可以引起人类的疾病。已有研究表明, 致病性的副溶血性弧菌都能产生一种溶血素, 即耐热性溶血毒素(Thermostable direct hemolysin, TDH)或 TDH 相关溶血毒素(TDH related hemolysin, TRH)或两者都有, 分别由 *tdh* 和 *trh* 基因编码<sup>[5]</sup>。分子流行病学证据支持 *tdh* 和 *trh* 与肠胃炎的关系, 证明 *tdh* 和 *trh* 都是副溶血性弧菌的毒力基因<sup>[6]</sup>。因此, 对这两种基因的检测研究对于了解副溶血性弧菌的流行趋势、预防与治疗食物中毒具有重要意义。另外, 不耐热溶血素基因 *tth* 及 *toxR* 普遍存在于临床和环境中的副溶血性弧菌中, 很多研究将其作为检测副溶血性弧菌的种特异性基因<sup>[7-8]</sup>。

为了便于进行临床诊断、流行病学调查、食品中微生物检测及医院感染监控, 微生物的分型与检测研究是必不可少的内容。目前, 随着分子生物学的发展以及与流行病学的密切结合, 分子分型技术以其敏感性高、特异性强、分型率和分辨率高等优点<sup>[9]</sup>, 在流行病学调查、食物中毒的预警和溯源、食源性疾病的诊断以及微生物的检测等方面发挥了重要的作用, 并逐步替代了传统的生化分型和血清学分型技术, 如重复序列 PCR (rep-PCR)、随机扩增多态性 DNA 分析技术(RAPD)、限制性片段长度多态性分析(RFLP)、多位点序列分析(MLST)、脉冲场凝胶电泳(PFGE)等。然而, 上述方法操作起来都比较繁琐, 程序比较复杂。因此, 在上述分子分型方法的优点基础上, 开发一种操作简便、价格低廉的分子分型方法将具有重要意义。本研究以  $F_0F_1$ -ATPase 为核心构建分子马达, 以副溶血性弧菌毒力基因 *tdh*、*trh* 和种特异性基因 *tth*、*toxR* 为靶基因设计 4 个探针。通过生物素-亲和素系统将探针与分子

马达连接构建  $F_0F_1$ -ATPase 分子马达生物传感器, 对致病性副溶血性弧菌进行分型及检测研究, 从而建立致病性副溶血性弧菌的分子马达分子分型方法, 为副溶血性弧菌的快速分型和溯源提供技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

**1.1.1 菌株:** 10 株副溶血性弧菌从食品中分离得到; 副溶血性弧菌 ATCC 17802、玫瑰红嗜热菌(*Thermomicrobium roseum*) ATCC 27502、宋内氏志贺氏菌 ATCC 51334、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028、肠炎沙门氏菌 ATCC 50041、单增李斯特氏菌 ATCC 15313、甲型副伤寒沙门氏菌 CMCC 50093 购自美国典型菌种保藏中心(ATCC)。

**1.1.2 培养基和试剂:** 3% NaCl 碱性蛋白胨水(APW)、硫代硫酸钠-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖(TCBS)琼脂平板、3% NaCl 胰蛋白胨大豆(TSA)琼脂平板培养基, 北京陆桥技术有限责任公司; PBS、合成缓冲液(0.1 mmol/L Tricine, 10% 甘油, 5 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , pH 9.0)、启动缓冲液(0.1 mmol/L Tricine, 10% 甘油, 5 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , ADP 0.35 mmol/L, NADH 2 mmol/L, pH 9.0)、提取缓冲液(20 mmol/L Tris-Cl, 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 1 mmol/L DTT, pH 8.0)、超纯水, 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)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、二磷酸腺苷(ADP), 美国 Sigma 公司;  $\epsilon$  亚基抗体, F-DHPE 荧光探针, 美国 Invitrogen 公司; DNA 提取试剂盒(离心柱型) DP320, 天根生化科技有限公司; 其他试剂为国产分析纯。

**1.1.3 设备:** 恒温培养箱, 3M 公司; 恒温摇床, 江苏太仓实验仪器设备厂; 超速冷冻离心机 CP100MX、F4500 荧光光谱仪, 日本 HITACHI

公司; PCR 仪 PTC-200, 美国伯乐公司; 凝胶成像系统 BIO-PRINT, 法国 VILBER 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌的培养及 DNA 的提取: 将 10 株副溶血性弧菌及标准菌株副溶血性弧菌 ATCC 17802 接种到含 3% NaCl 的 APW 中活化增菌, 36 °C±1 °C 培养 24 h。然后划线接种 TCBS 平板培养基, 36 °C±1 °C 培养 24 h。最后挑取可疑菌落转接到含 3% NaCl 的 TSA 平板培养基上, 36 °C±1 °C 培养 24 h, 用于 DNA 的提取。

将培养获得的副溶血性弧菌用 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。最后离心管中获得的液体就是菌体的 DNA 提取液, 用作 PCR 扩增时的模板以及分子马达传感器的目标检测物。DNA 提取液用核酸蛋白分析仪测定其浓度, 置于-20 °C 保存, 使用时置于室温自然解冻, 然后用振荡器振荡混匀。

采用上述方法分别提取宋内氏志贺氏菌 ATCC 51334、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028、肠炎沙门氏菌 ATCC 50041、单增李斯特氏菌 ATCC 15313、甲型副伤寒沙门氏菌 CMCC 50093 的 DNA。-20 °C 保存备用。

1.2.2 载色体(Chromatophore)的制备: 载色体的制备参照 Suzuki 等<sup>[10]</sup>及 Cui 等<sup>[11]</sup>的方法进行。将玫瑰红嗜热菌菌种按比例 1:100 接种到液体培养基, 60 °C、150 r/min 振荡培养 24 h。然后 4 °C、4 000×g 离心 30 min 收集菌体。用提取缓冲液重悬菌体。4 °C、6 000×g 离心 10 min 去上清。加入提取缓冲液重悬菌体(10 mL 缓冲液/g), 再加入 PMSF 至终浓度 1 mmol/L, 置于冰上超声破碎 30 min (超声 5 s, 停 8 s)。将破碎菌体于 4 °C、25 000×g 离心 30 min, 取上清至一新的离心管中, 4 °C、145 000×g 超速离心 1 h, 取沉淀即为载色体。最后用提取缓冲液重悬沉淀并加入终浓度

50%的甘油, -80 °C 保存备用。

1.2.3 F-DHPE 标记载色体: 按照 Su 等<sup>[12]</sup>方法用 F-DHPE 标记载色体。取 200 μL 载色体于一离心管中, 加入 10 μL F-DHPE (200 g/L, 溶于乙醇), 混匀, 室温避光轻微振荡孵育 15 min。加入 PBS (10 mmol/L, pH 7.4)至总体积 1.3 mL 后, 于 4 °C、30 000×g 离心 15 min, 去上清, 沉淀用 PBS 在 4 °C、10 000×g 离心 15 min 条件下清洗 3 次, 以除去游离的 F-DHPE。最后, 沉淀用 200 μL PBS 悬浮, 备用。

1.2.4 生物素标记 ε 亚基抗体: 将 2 μL 2 μmol/L 的生物素(Biotin-AC5-Sulfo-Os)加入到 20 μL ε 亚基抗体中, 室温孵育 30 min, 抗体 N 端即被标记。

1.2.5 探针合成及标记: 探针及探针 5'端生物素标记由大连宝生物公司合成。探针序列见表 1。

1.2.6 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase 分子马达生物传感器的构建: 分别吸取 200 μL F-DHPE 标记的载色体至 4 个离心管中, 各加入 40 μg 生物素标记的 ε 亚基抗体, 用 PBS 补加至 1 mL, 37 °C 孵育 1 h; 用 PBS 补加至 1.4 mL, 4 °C、30 000×g 超速离心 10 min; 弃上清, 沉淀用 500 μL PBS 重悬; 加入链球菌抗生物蛋白(2 g/L) 2 μL, 用 PBS 补加至 1 mL, 室温, 50-100 r/min 振荡反应 10 min; 用 PBS 补加至 1.4 mL, 4 °C、30 000×g 超速离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 500 μL PBS 重悬; 最后, 每管各加入生物素标记的 *tlh*、*tdh*、*trh*、*toxR* 核酸探针(10 μmol/L)

表 1 副溶血性弧菌毒力基因及种特异性基因探针序列	
Table 1 Sequences of probes specific to virulence genes and species-specific genes from <i>V. parahaemolyticus</i>	
Genes	Probes sequences (5'→3')
<i>tlh</i>	AAGCGGATTATGCAGAAGCACTG
<i>tdh</i>	GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC
<i>trh</i>	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT
<i>toxR</i>	GTCTTCTGACGCAATCGTTG

50  $\mu\text{L}$ , 用 PBS 补加至 1 mL, 室温, 50–100 r/min 振荡反应 10 min; 每管用 PBS 补加至 1.4 mL, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、30 000 $\times g$  超速离心 10 min, 弃上清, 用 150  $\mu\text{L}$  含 30% 甘油的 PBS 重悬载色体, 放入  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。各分子马达生物传感器分别命名为 Chro-*tlh*、Chro-*tdh*、Chro-*trh*、Chro-*toxR*。

**1.2.7 分子分型:** 最适 Chro-*tlh*、Chro-*tdh*、Chro-*trh*、Chro-*toxR* 和 DNA 浓度由试验摸索得到, 方法为: 将副溶血性弧菌 ATCC 17802 DNA 分别稀释为 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100  $\mu\text{g/L}$ , Chro-*tlh*、Chro-*tdh*、Chro-*trh*、Chro-*toxR* 分别作 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 倍稀释。用每一稀释度分子马达生物传感器检测 10 个不同 DNA 浓度, 即最终形成 10 $\times$ 10 个反应体系。反应最大荧光值对应的 DNA 浓度和分子马达生物传感器稀释度即为最适浓度。

取 10 个 1.5 mL 离心管, 加入 10 株副溶血性弧菌浓度为 90  $\mu\text{g/L}$  的 DNA 提取液 10  $\mu\text{L}$ 。将上述离心管放入沸水中 5 min, 然后立即转移到冰上 1 min 至完全冷却。取 2  $\mu\text{L}$  Chro-*tlh*, 用合成缓冲液稀释 60 倍。取稀释后的 Chro-*tlh* 10  $\mu\text{L}$  加入离心管, 短暂振荡混匀。阴性对照用水代替 DNA 提取液进行。另取一个离心管加入 10  $\mu\text{L}$  水, 进行同样的煮沸和冷却处理后, 再加入 10  $\mu\text{L}$  合成缓冲液作为本底对照。再向各管中分别加入

30  $\mu\text{L}$  启动缓冲液, 振荡混匀, 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  $^{\circ}\text{C}$  恒温摇床中温育 30 min, 启动反应。取出离心管, 分别加入 450  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液, 振荡使体系混匀。取一块干净的 96 孔板, 将各管中的最终反应体系加入其中, 每个体系加 3 孔, 每孔加样 50  $\mu\text{L}$ 。将 96 孔板上机检测, 读取数据, 对各组数据取平均值, 然后用样本数值减去本底数值即为样本的实际荧光值。将样本荧光值与  $\text{H}_2\text{O}$  的阴性对照荧光值进行单因素方差分析, 若差异显著 ( $P<0.05$ ) 表示检出该基因。

Chro-*toxR*、Chro-*tdh*、Chro-*trh* 对 10 株副溶血性弧菌的分型方法同上。

**1.2.8 PCR 反应:** 为验证分型结果, 合成 *tlh*、*tdh*、*trh*、*toxR* 四个基因的引物, 以 10 株副溶血性弧菌为模板进行 PCR 反应。引物序列见表 2。反应体系为: 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ 、dNTPs 2  $\mu\text{L}$  (各 200  $\mu\text{mol/L}$ )、上下游引物各 1  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{mol/L}$ )、*Taq* 酶 0.2  $\mu\text{L}$  (1U)、模板 1  $\mu\text{L}$ , 加水至 25  $\mu\text{L}$ 。*tlh* (450 bp)、*tdh* (251 bp)、*trh* (250 bp) PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  60 s; 94  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  7 min。*toxR* (367 bp) PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  60 s; 94  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 63  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 共 20 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  7 min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 紫外成像获取图像。

表 2 副溶血性弧菌毒力基因和种特异性基因引物序列<sup>[13]</sup>

Table 2 Sequences of primers specific to virulence genes and species-specific genes from <i>V. parahaemolyticus</i> <sup>[13]</sup>				
基因 Genes	引物名称 Primer names	产物长度 Length of products (bp)	退火温度 Annealing temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	探针序列 Probe sequences (5'→3')
<i>tlh</i>	tlh450F tlh450R	450	58	AAGCGGATTATGCAGAAGCACTG
<i>tdh</i>	tdh251F tdh251R	251	55	GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC
<i>trh</i>	trh250F trh250R	250	55	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT
<i>toxR</i>	toxR367F toxR367R	367	60	GTCTTCTGACGCAATCGTTG

**1.2.9 灵敏度试验:** 用灭菌水将副溶血性弧菌核酸提取液分别稀释为 0.01、0.1、1、10、100  $\mu\text{g/L}$  5 个不同浓度, 然后用 *Chro-tilh*、*Chro-tdh*、*Chro-trh*、*Chro-toxR* 四个分子马达生物传感器按照 1.2.7 分别对其进行检测, 得到分子马达生物传感器对副溶血性弧菌分子分型的最低核酸浓度。同时用 *tilh*、*tdh*、*trh*、*toxR* 4 个基因引物对不同浓度核酸进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物按照 1.2.8 进行琼脂糖凝胶电泳及成像, 得到 PCR-电泳-凝胶成像方法的灵敏度, 用以与分子马达生物传感器方法进行比较。

**1.2.10 特异性试验:** 为验证本文构建的分子马达生物传感器对副溶血性弧菌的特异性识别, 用 *Chro-trh*、*Chro-tdh*、*Chro-tilh*、*Chro-toxR* 分别检测宋内氏志贺氏菌、副溶血性弧菌、甲型副伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌和单核细胞增生李斯特菌的 DNA。方法同 1.2.7。

## 2 结果

### 2.1 $F_0F_1$ -ATPase 分子马达生物传感器的构建

F-DHPE 是一种脂染料探针, 可以嵌入到磷脂分子层中。同时 F-DHPE 也是一种 pH 指示剂, 将其嵌入磷脂双分子层可以用来测量磷脂层外面的 pH 变化。在 pH 7.0–9.0 范围内, F-DHPE 的荧光强度与 pH 值呈正相关<sup>[11]</sup>。本研究将 F-DHPE 标记到分子马达载色体磷脂分子层中用以指示  $F_0F_1$ -ATPase 合成 ATP 的效率。

$F_0F_1$ -ATPase (*E. coli*) 由 8 个亚基组成, 分别为  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_n$ , 是一种可旋转分子马达。ATP 的合成与水解发生在  $\beta$  亚基的 3 个催化位点上, 而质子流动则发生在  $F_0$  部分的 a 亚基和 c 亚基之间。在 ATP 合成过程中, 质子由载色体内泵出, 载色体外  $H^+$  浓度增大, 从而导致载色体外 pH 值降低, F-DHPE 荧光值随之降低。因此通过检测 F-DHPE 荧光值即可判断 ATP 合成情况。本研究

通过“ $\epsilon$  亚基抗体-链霉素-生物素-探针”系统连接  $F_0F_1$ -ATPase 构建  $F_0F_1$ -ATPase 生物传感器, 结构示意图如图 1 所示。当传感器捕获到目标分子时,  $F_0F_1$ -ATPase 由于负载导致旋转速度下降, ATP 合成速度下降, 因此质子由载色体泵出速度下降, 导致载色体外 pH 值下降速度较空载时慢, 对应荧光强度下降速度也比空载时慢, 因此相比空载, 捕获目标分子的荧光强度相对较高。

### 2.2 $F_0F_1$ -ATPase 分子马达生物传感器对副溶血性弧菌的分子分型

经试验摸索得到 *Chro-tilh*、*Chro-toxR*、*Chro-tdh*、*Chro-trh* 及 DNA 最适浓度, 见表 3。

以 *Chro-tilh*、*Chro-toxR*、*Chro-tdh*、*Chro-trh* 对 10 株副溶血性弧菌的 DNA 进行分型分析, 结果见图 2。用 *Chro-tilh*、*Chro-toxR* 分别对 10 株副溶血性弧菌进行分析, 结果发现 10 株副溶血性弧菌荧光值均显著高于阴性对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 2A, B), 说明 10 株副溶血性弧菌均携带 *tilh* 和 *toxR* 基因, 这与 PCR 结果一致(图 3A, B); 用 *Chro-tdh* 分别对 10 株副溶血性弧菌进行分析, 数据分析说明 10 株副溶血性弧菌荧光值均显著高

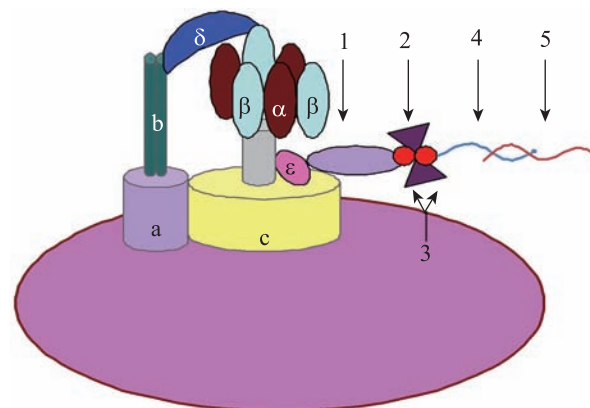


图 1 分子马达生物传感器模式图

Fig. 1 Schematic diagram  $F_0F_1$ -ATPase molecular motor biosensor

注: 1:  $\epsilon$  亚基抗体; 2: 链霉亲和素; 3: 生物素; 4: 分子探针; 5: 目标菌单链 DNA.

Note: 1:  $\epsilon$ -Subunit antibody; 2: Strptavidin; 3: Biotin; 4: Probe; 5: Single strand target DNA.

于阴性对照组( $P<0.05$ ) (图 2C), 说明 10 株副溶血性弧菌均携带 *tdh* 毒力基因, 与 PCR 结果一致 (图 3C); 用 Chro-*trh* 分别对 10 株副溶血性弧菌进行分析, 数据分析说明 10 株副溶血性弧菌荧光值与阴性对照没有显著差异( $P>0.05$ ) (图 2D), 说明 10 株副溶血性弧菌均未携带 *trh* 毒力基因, 与 PCR 结果一致(图 3D)。结合 4 个结果可知, 10 株副溶血性弧菌均携带 *tdh* 基因, 但都不携带 *trh* 基

因。10 株副溶血性弧菌因携带 *tdh* 毒力基因, 均具有致病性。

2.3 灵敏度试验

用 Chro-*tlh*、Chro-*toxR*、Chro-*tdh*、Chro-*trh* 4 个分子马达生物传感器对不同稀释度的 DNA 进行检测, 结果见图 4。由图 4 可知, DNA 浓度在不低于 0.1  $\mu\text{g/L}$  的情况下, 4 种分子马达生物传感器测得的荧光值均显著高于阴性对照组( $P<0.05$ ),

表 3 Chro- <i>tlh</i> 、Chro- <i>toxR</i> 、Chro- <i>tdh</i> 、Chro- <i>trh</i> 及 DNA 最适浓度				
Table 3 The optimum concentrations of Chro- <i>tlh</i> , Chro- <i>toxR</i> , Chro- <i>tdh</i> , Chro- <i>trh</i> and DNA				
	Chro- <i>tlh</i>	Chro- <i>toxR</i>	Chro- <i>tdh</i>	Chro- <i>trh</i>
分子马达分型装置稀释倍数 Dilution of molecular motors typing device	60	50	100	60
DNA 浓度 Concentration of DNA ( $\mu\text{g/L}$ )	90	60	50	50

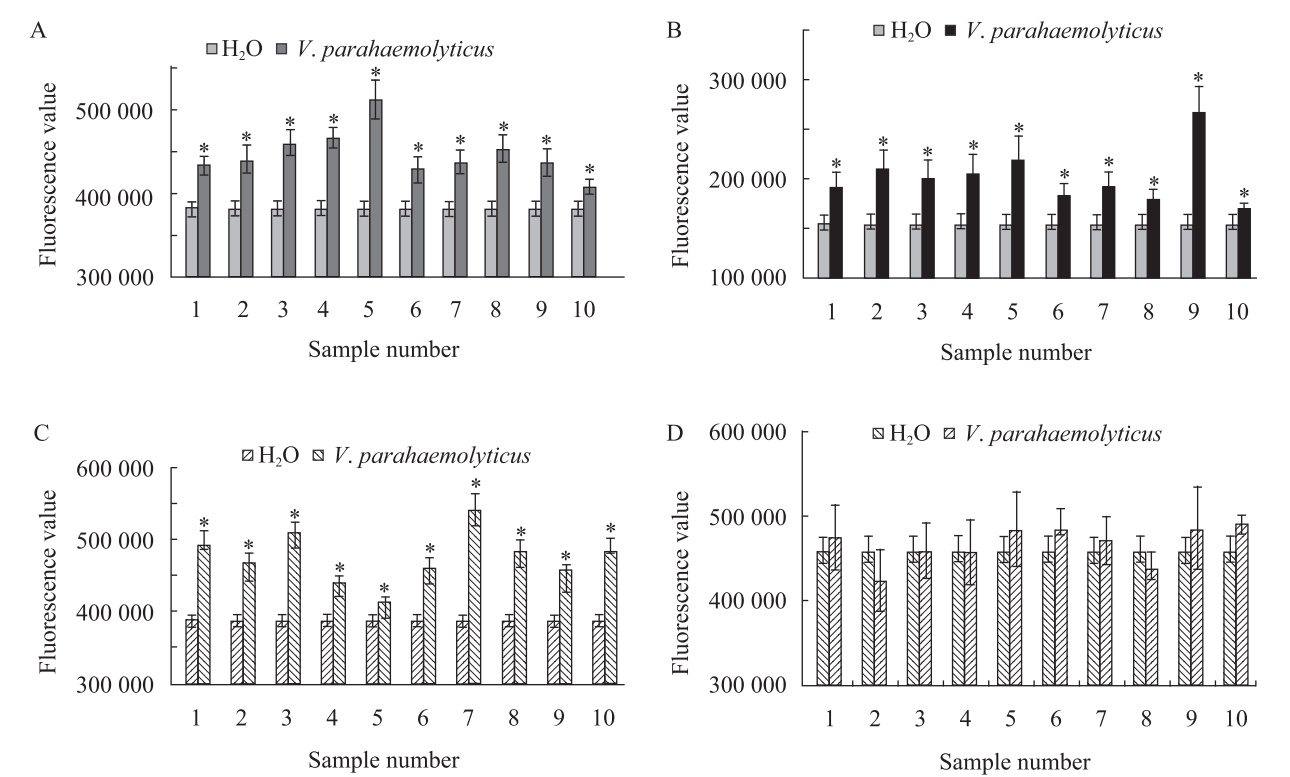


图 2 Chro-*tlh*、Chro-*toxR*、Chro-*tdh*、Chro-*trh* 对 10 株副溶血性弧菌的分型结果

Fig. 2 Molecular typing results of Chro-*tlh*, Chro-*toxR*, Chro-*tdh* and Chro-*trh* for *V. parahaemolyticus*

注: A: Chro-*tlh*; B: Chro-*toxR*; C: Chro-*tdh*; D: Chro-*trh*; 1–10: 10 株副溶血性弧菌. \*: 样本荧光值与 H<sub>2</sub>O 对照相比差异显著 ( $P<0.05$ ).

Note: A: Chro-*tlh*; B: Chro-*toxR*; C: Chro-*tdh*; D: Chro-*trh*; 1–10: Ten strains of *V. parahaemolyticus*. \*: Asterisks indicate statistically significant ( $P<0.05$ ).



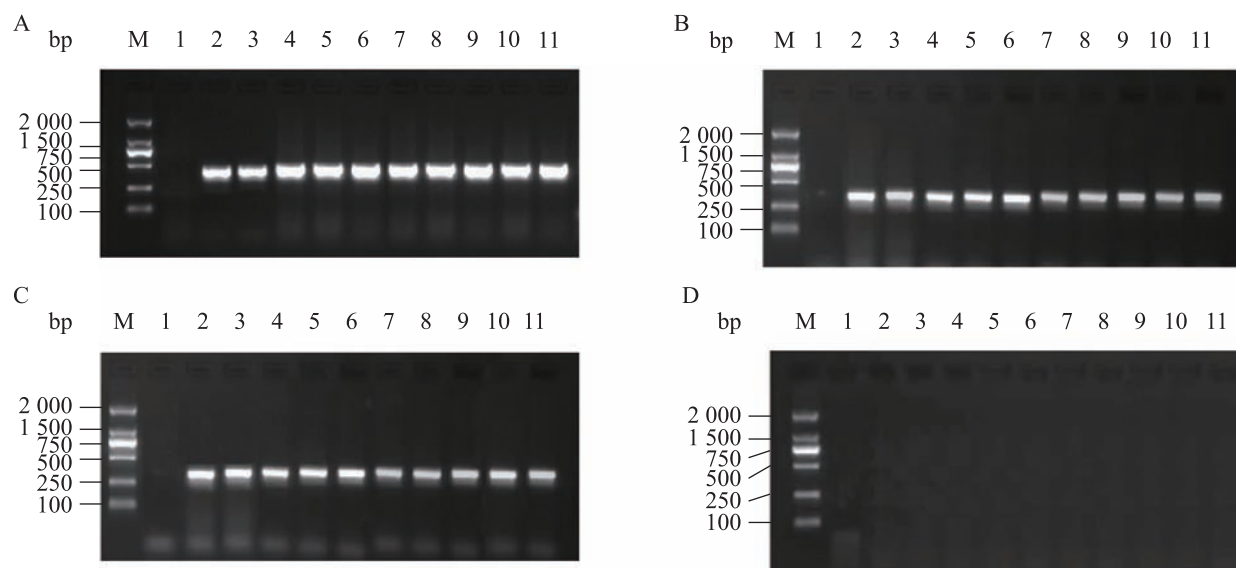


图3 PCR扩增10株副溶血性弧菌的*tlh*、*tdh*、*trh*、*toxR*电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of *tlh*, *tdh*, *trh* and *toxR* from *V. parahaemolyticus* after PCR

注: M: DNA 分子量标准; 1: 阴性对照; 2-11: 10株副溶血性弧菌。A: PCR 扩增 *tlh* 电泳图; B: PCR 扩增 *toxR* 电泳图; C: PCR 扩增 *tdh* 电泳图; D: PCR 扩增 *trh* 电泳图。

Note: M: DNA marker; 1: Negative control; 2-11: Ten strains of *V. parahaemolyticus*. A: Electrophoresis of *tlh*; B: Electrophoresis of *toxR*; C: Electrophoresis of *tdh*; D: Electrophoresis of *trh*.

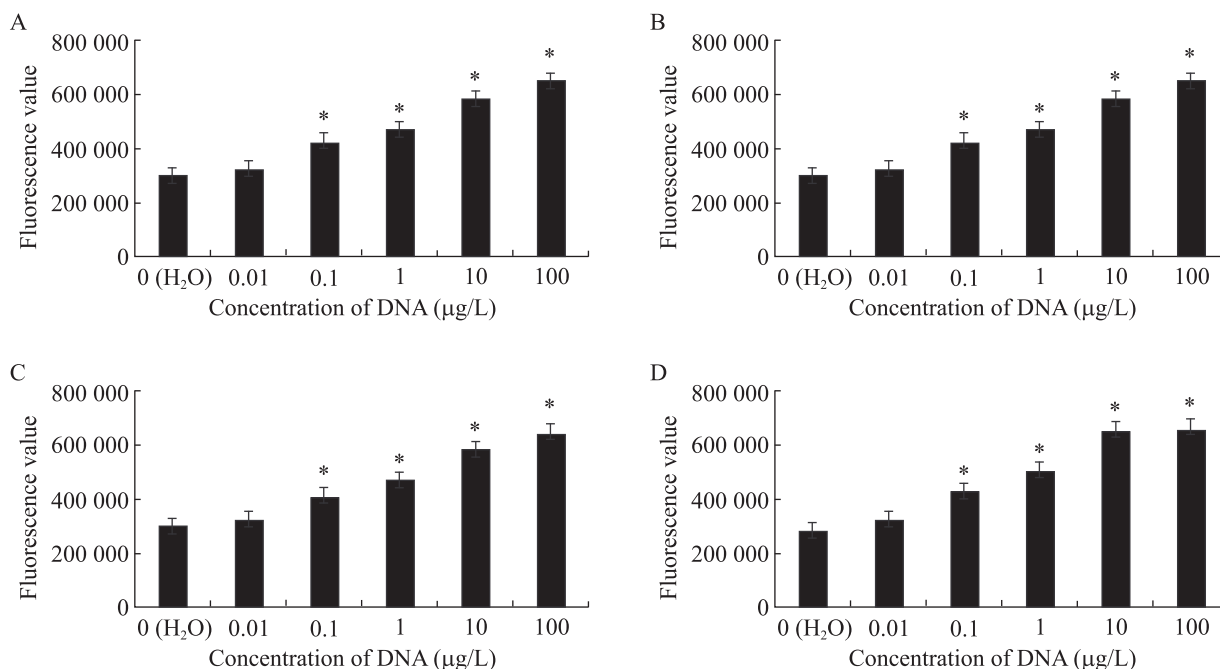


图4 Chro-*tlh*、Chro-*toxR*、Chro-*tdh*、Chro-*trh* 对副溶血性弧菌 DNA 的检测灵敏度

Fig. 4 Detection sensitivities of Chro-*tlh*, Chro-*toxR*, Chro-*tdh* and Chro-*trh* for *V. parahaemolyticus*

注: A: Chro-*tlh*; B: Chro-*toxR*; C: Chro-*tdh*; D: Chro-*trh*. \*: 样本荧光值与 H<sub>2</sub>O 对照相比较差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Note: A: Chro-*tlh*; B: Chro-*toxR*; C: Chro-*tdh*; D: Chro-*trh*. \*: Asterisks indicate statistically significant ( $P < 0.05$ ).



因此生物传感器方法的检测底限为 1 pg/反应体系。对 *tlh*、*tdh*、*trh*、*toxR* 4 个基因的 PCR 扩增产物进行电泳发现, DNA 浓度低于 10  $\mu\text{g/L}$  时, 4 个基因的 PCR 产物均不能在紫外灯下成像(图 5), 说明 PCR-电泳-凝胶成像方法的检测底限为 10 pg/反应体系。两种方法相比可以发现, 分子马达生物传感器的灵敏度比 PCR-电泳-凝胶成像方法高了 10 倍。

## 2.4 特异性试验

为验证 Chro-*tlh*、Chro-*toxR*、Chro-*tdh*、Chro-*trh* 4 个分子马达生物传感器对副溶血性弧菌的检测特异性, 本研究用 4 个分子马达生物传

感器对鼠伤寒沙门氏菌、宋内氏志贺氏菌、副溶血性弧菌、肠炎沙门氏菌、单增李斯特氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌等 6 种菌同时进行检测, 结果见图 6。由图 6 可知, 4 个分子马达生物传感器仅对副溶血性弧菌的检测荧光值显著高于阴性对照( $P<0.05$ ), 说明本研究构建的 4 个分子马达生物传感器对副溶血性弧菌具有较高的特异性。

## 3 讨论

本研究通过构建分子马达生物传感器, 实现了对副溶血性弧菌致病性与非致病性的快速分型。一方面, 对种特异性基因 *tlh* 和 *toxR* 的检测

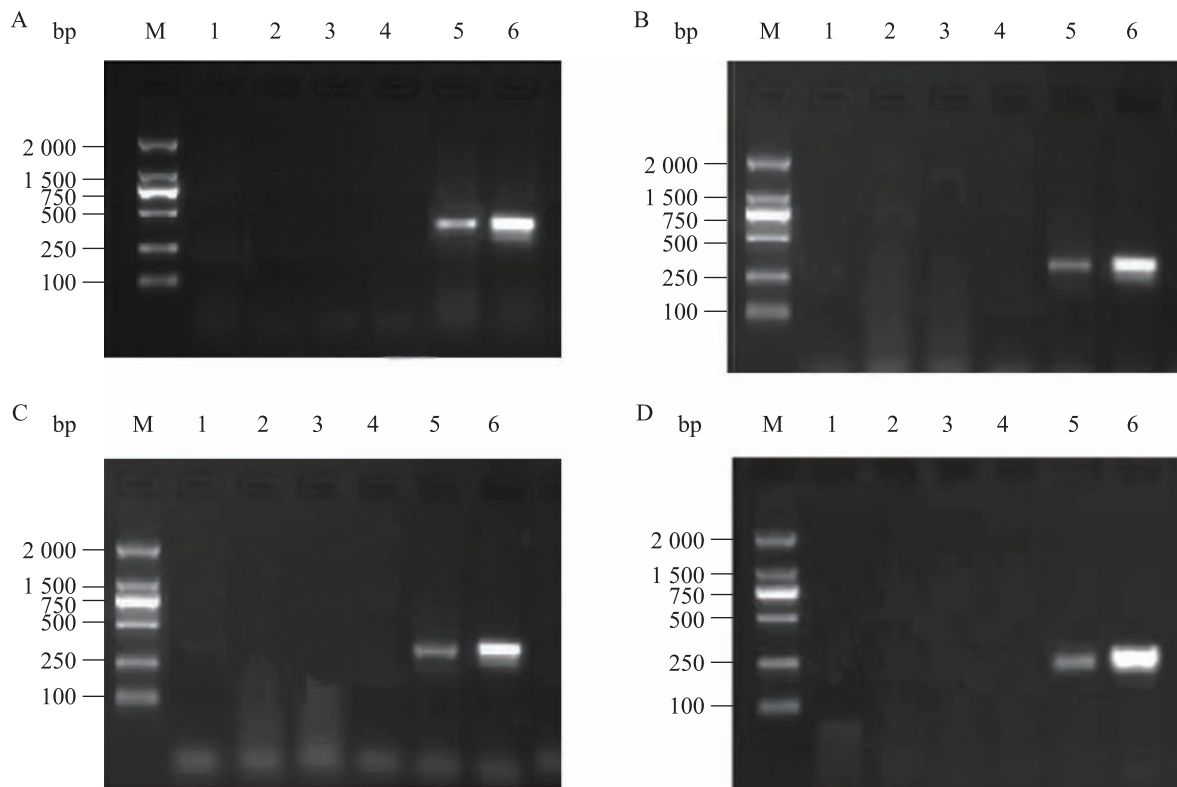


图 5 PCR 对副溶血性弧菌 DNA 的检测灵敏度

Fig. 5 Detection sensitivities of PCR-Electrophoresis-Gel imaging for *V. parahaemolyticus*

注: M: DNA 分子量标准; 1: 阴性对照; 2-6: 浓度分别为 0.01、0.1、1、10、100  $\mu\text{g/L}$  的副溶血性弧菌 DNA 提取液的 PCR 产物。A: PCR 扩增 *tlh* 产物电泳图; B: PCR 扩增 *toxR* 产物电泳图; C: PCR 扩增 *tdh* 产物电泳图; D: PCR 扩增 *trh* 产物电泳图。

Note: M: DNA marker; 1: Negative control; 2-6: PCR products of 0.01, 0.1, 1, 10 and 100  $\mu\text{g/L}$  DNA of *V. parahaemolyticus*. A: Electrophoresis of *tlh*; B: Electrophoresis of *toxR*; C: Electrophoresis of *tdh*; D: Electrophoresis of *trh*.

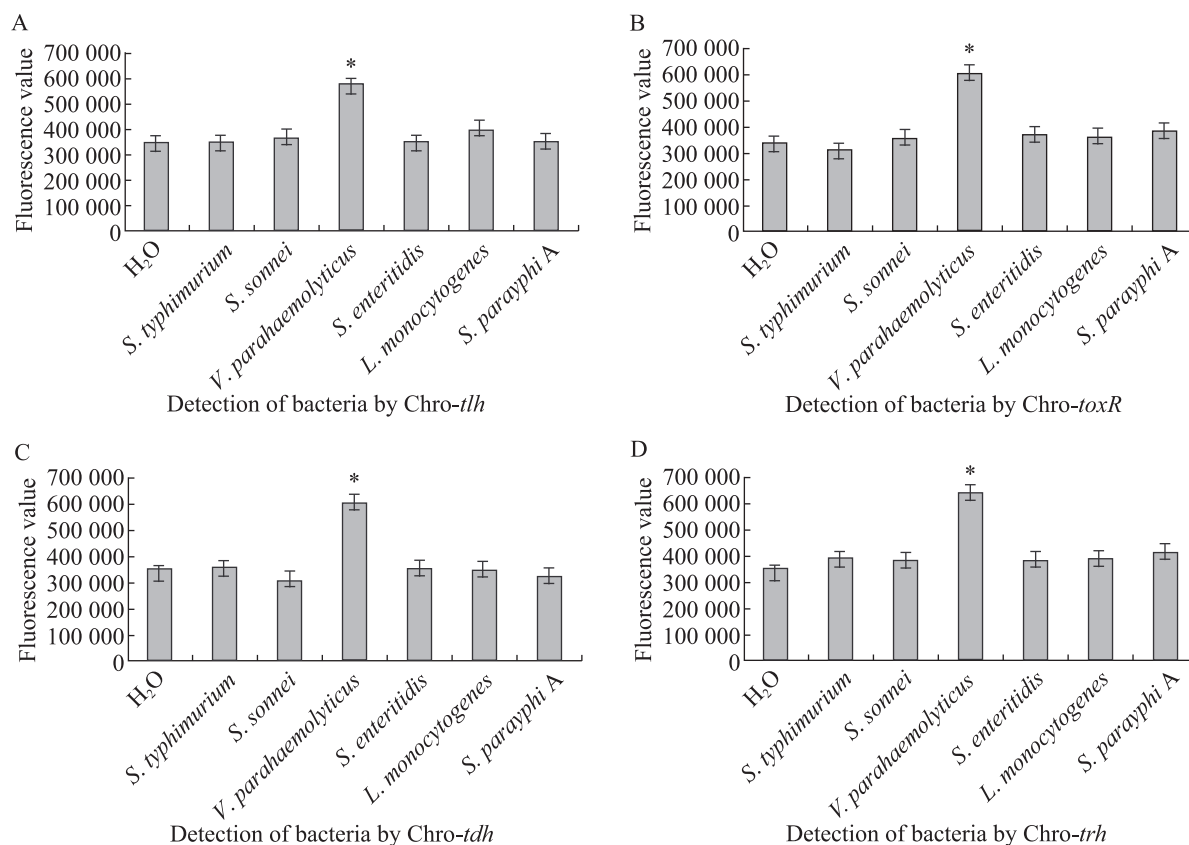


图 6 Chro-*tlh*、Chro-*toxR*、Chro-*tdh*、Chro-*trh* 对副溶血性弧菌的检测特异性

Fig. 6 Detection specificities of Chro-*tlh*, Chro-*toxR*, Chro-*tdh* and Chro-*trh* for *V. parahaemolyticus*

注: A: Chro-*tlh*; B: Chro-*toxR*; C: Chro-*tdh*; D: Chro-*trh*. \*: 样本荧光值与 H<sub>2</sub>O 对照相比较差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Note: A: Chro-*tlh*; B: Chro-*toxR*; C: Chro-*tdh*; D: Chro-*trh*. \*: Asterisks indicate statistically significant ( $P < 0.05$ ).

可以对目标菌进行鉴定; 另一方面, 对 *tdh* 和 *trh* 的检测可以对目标菌的致病性做出判断。这为副溶血性弧菌临床诊断、流行病学调查、食物中毒的预警和溯源、食品中副溶血性弧菌检测及医院感染监控, 副溶血性弧菌的分型与检测提供了一种有效的工具, 也为其他致病菌的分型研究开辟了一条新的途径。

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase 是一种旋转分子马达, 具有质子转运及 ATP 合成和水解功能。利用分子马达上述特性, 很多研究者已通过构建 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase 生物传感器对病毒<sup>[14-15]</sup>、化学污染物<sup>[16]</sup>、致病菌<sup>[17-18]</sup>等进行检测, 结果令人满意。但是, 其在分子分型方面的研究尚属空白。目前, 用于细菌分子分型

的技术, 大都是基于 PCR 扩增、酶切、电泳等技术, 尽管具有敏感性高、特异性强、分型率和分辨率高等优点, 但操作起来相对繁琐。而本研究构建的 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase 分子马达分子分型装置是基于 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase 的质子转运和旋转特性, 根据标记 F-DHPE 的荧光变化可以实时反映 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase 的旋转情况, 从而反映 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase 的负载情况, 达到检测抗原抗体的目的。无需热循环反应, 缩短了检测周期, 整个分型过程只需 1-2 h, 更不需酶切及电泳等繁琐操作。而且分子马达分型装置可大量预制备多次使用, 因此具有成本低、灵敏度高、检测时间短、容易构建和操作方便等优点, 是一种非常简便、快速的分

型方法。

但是, 作为一种分子分型技术,  $F_0F_1$ -ATPase 分子马达生物传感器仍存在局限性。由于该生物传感器是基于核酸杂交原理, 因此它仅能针对细菌是否具有某种特性进行分型, 如对副溶血性弧菌是否具有致病性进行分型, 而不能在更细微水平上进行分型, 或许这将是  $F_0F_1$ -ATPase 分子马达用于分子分型研究未来需要解决的问题。

## 参 考 文 献

- [1] 杨芳, 李秀娟, 徐保红. 副溶血弧菌毒力基因和保守基因研究进展[J]. 预防医学情报杂志, 2011, 27(3): 209–212.
- [2] 王璐华, 宁喜斌. 副溶血性弧菌的温度预测模型[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 262–266.
- [3] 杨正时, 房海. 人与动病原细菌学[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2003: 609–622.
- [4] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 3–9.
- [5] Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a Marine bacterium[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(6): 2093–2099.
- [6] Shirai H, Ito H, Hirayama T, et al. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis[J]. Infection and Immunity, 1990, 58(11): 3568–3573.
- [7] Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 36(3): 215–225.
- [8] Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, 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.
- [9] 蔡潭溪, 蒋鲁岩, 黄克和. 副溶血弧菌基因分型和检测的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(2): 235–237.
- [10] Suzuki T, Murakami T, Iino R, et al.  $F_0F_1$ -ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of epsilon subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(47): 46840–46846.
- [11] Yuanbo C, Fan Z, Jiachang Y. Detecting proton flux across chromatophores driven by  $F_0F_1$ -ATPase using *N*-(fluorescein-5-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt[J]. Analytical Biochemistry, 2005, 344(1): 102–107.
- [12] Su T, Cui Y, Zhang X, et al. Constructing a novel Nanodevice powered by delta-free  $F_0F_1$ -ATPase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 350(4): 1013–1018.
- [13] 李薇薇, 王晓英, 郭云昌. 中国部分水产品副溶血性弧菌毒力基因的分布特征[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 239–243.
- [14] Liu X, Zhang Y, Yue J, et al.  $F_0F_1$ -ATPase as biosensor to detect single virus[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 342(4): 1319–1322.
- [15] Deng Z, Zhang Y, Yue J, et al. Green and orange CdTe quantum dots as effective pH-sensitive fluorescent probes for dual simultaneous and independent detection of viruses[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2007, 111(41): 12024–12031.
- [16] 吕会田, 张云, 乐加昌, 等. 旋转生物传感器高灵敏检测盐酸克伦特罗方法研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 446–450.
- [17] 张捷, 顾德周, 张惠媛, 等. 分子马达传感器对沙门氏菌快速检测方法的初步研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 93–96.
- [18] 张捷, 向丽萍, 汪琦, 等. 利用分子马达技术检测霍乱弧菌[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(6): 161–164.