

分子马达生物传感器检测食源性轮状病毒

张捷^{1*}, 许美玲^{2*}, 王璇⁶, 王煜⁴, 王小晋⁵, 刘岩¹, 顾德周¹, 陈广全¹,
王佩荣³, 乐加昌³

- 1 北京出入境检验检疫局, 北京 100026
- 2 临沂出入境检验检疫局, 山东 临沂 276034
- 3 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101
- 4 中国合格评定国家认可中心, 北京 100062
- 5 淮安出入境检验检疫局, 江苏 淮安 223001
- 6 中国中医科学院望京医院检验科, 北京 100102

张捷, 许美玲, 王璇, 等. 分子马达生物传感器检测食源性轮状病毒. 生物工程学报, 2013, 29(5): 681-690.
Zhang J, Xu ML, Wang X, et al. Detection of food-borne rotavirus by molecular motor biosensor. Chin J Biotech, 2013, 29(5): 681-690.

摘要: 通过分子马达生物传感器技术建立一种特异、便捷、快速的食源性轮状病毒检测方法。以 F_0F_1 -ATPase 为核心构建分子马达, 以轮状病毒保守片段 VP7 设计各血清型通用探针, 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 分子马达检测装置。提取病毒 RNA 并将其与生物传感器结合的同时启动 ATP 合成, 比较其荧光强度的差别, 可以对样品中的 RNA 进行检测。此方法的病毒 RNA 检测灵敏度为 0.005 ng/mL, 对轮状病毒检测特异, 与甲肝病毒、诺如病毒无交叉反应, 在 1 h 内即可完成检测。运用此方法随机检测 15 份样品, 检测结果与 RT-PCR 一致。结果表明, 分子马达生物传感器检测轮状病毒的方法灵敏、特异, 可用于食源性轮状病毒的快速检测。

关键词: 轮状病毒, 分子马达生物传感器, 检测

Received: November 22, 2012; **Accepted:** March 11, 2013

Supported by: Scientific and Technological Project of General Administration of Quality Inspection (No. 2010IK156), Beijing Municipal Science and Technology Commission Stepped Planning Project.

Corresponding author: Jie Zhang. Tel/Fax: +86-10-58619231; E-mail: zhangjie@bjciq.gov.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家质检总局科技计划项目 (No. 2010IK156), 北京市科委阶梯计划工作项目资助。

Detection of food-borne rotavirus by molecular motor biosensor

Jie Zhang^{1*}, Meiling Xu^{2*}, Xuan Wang⁶, Yu Wang⁴, Xiaojin Wang⁵, Yan Liu¹, Dezhou Gu¹, Guangquan Chen¹, Peirong Wang³, and Jiachang Yue³

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

2 Linyi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Linyi 276034, China

3 Institute of Biophysics Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 China National Accreditation Service for Conformity Assessment, Beijing 100062, China

5 Huai'an Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Huai'an 276034, China

6 Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China

Abstract: To develop a specific, rapid and convenient method based on molecular motor biosensor to detect food-borne rotavirus. A specific probe was encompassed the conservative region of rotavirus's VP7 segment, and a molecular motor detect device was constructed by connecting probes to F₀F₁-ATPase molecular motor through biotin-streptavidin system. This biosensor's sensitivity was 0.005 ng/mL for rotavirus RNA. Extracted virus RNA was conjugated with the biosensor separately, at the same time ATP was synthesized. By comparing fluorescence intensity, we can detect rotavirus RNA in samples. This method possessed specificity for rotavirus, without any cross-reaction with Hepatitis A virus and norovirus, and it could be accomplished within 1 h. We detected 15 samples using this method and the results were compared with RT-PCR results. This method is sensitive and specific for rotavirus, and it can be used to detect food-borne rotavirus.

Keywords: rotavirus, molecular motor biosensor, detect

轮状病毒 (Rotavirus, RV) 是全世界范围内人和动物急性腹泻的主要致病微生物之一, 是引起婴幼儿急性肠胃炎的主要原因^[1-2]。近年的研究资料表明, 我国秋冬季节 50%~60% 的婴幼儿腹泻是由轮状病毒引起的, 轮状病毒感染已经成为威胁公共卫生安全的重要因素之一^[3-4]。轮状病毒主要通过粪-口途径传播, 对人类健康构成了严重威胁。因此, 建立食源性轮状病毒的快速检测方法, 对保障食品安全和人类健康非常重要。

轮状病毒为呼肠病毒科轮状病毒属病毒, 由 11 个基因组片段组成。内壳具有 4 个结构蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP6), 外壳具有 2 个结构蛋白 (VP4 和 VP7)。其中 VP4 和 VP7 是 2 个主要

的轮状病毒结构蛋白, 它们决定了轮状病毒的血清型和病毒中和作用。根据 VP4 和 VP7 基因抗原性的差异, 将轮状病毒分为不同的血清型, 分别为 P 和 G 血清型^[5-7]。

检测轮状病毒的方法主要有电镜技术、分离培养、免疫检测技术和基因检测技术等方法^[8-12]。但是电镜技术的主要缺点在于它要求每毫升样本中包含约 10⁶ 个病毒颗粒。而且病毒颗粒易于降解, 常常对其正确诊断产生影响。分离培养检测技术的检测灵敏度较低, 需要特殊的培养条件, 所以对于轮状病毒的基础研究和临床诊断有限。以抗原检测为基础的检测方法的缺点是特异性和灵敏度相对较低, 而且不能有效地进行定量检测。基因检测技术特异性和灵敏度较好, 但是

需要较长时间和专业技术人员操作,不利于临床快速检测。

分子马达生物传感技术是近年发展起来的新兴技术,具有直观、敏感性高、速度快、操作简便和污染少等优点。ATP 合酶 (F_0F_1 -ATPase) 是一个旋转的生物分子马达,负责生物体内的能量转化。 F_0F_1 -ATPase 既能利用跨膜质子梯度合成 ATP,又能水解 ATP 而转运质子。若能在细胞外实现由化学能到机械能的转化,将分子马达设计成一个纳米装置,实现对病原微生物快速检测,这将搭建一个检测病原微生物的新平台。通过构建基于 F_0F_1 -ATPase 的旋转生物传感器,已经在一些病毒如禽流感病毒、鼠肝炎病毒、小分子盐酸克伦特罗、沙门氏菌、霍乱弧菌检测等方面取得许多成果^[13-17]。但是在食源性病毒检测方面尚属空白,因此,我们进一步研究了基于载体内 F_0F_1 -ATPase 的分子马达技术来检测轮状病毒。为了提高对食源性轮状病毒的检测水平,加强对轮状病毒疫情的预防和控制,本实验室建立了轮状病毒 F_0F_1 -ATPase 分子马达生物传感器检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 病毒及样品

冻干型甲型肝炎减毒活疫苗来源于浙江普康生物技术股份有限公司;诺如病毒和轮状病毒由中国疾病预防控制中心病毒所提供。样品来自于日常检测所留存的样品。

1.1.2 仪 器

超速冷冻离心机 CP100MX、F4500 荧光光谱仪购自日本 HITACHI 公司;恒温摇床购自江

苏太仓实验仪器设备厂;超纯水仪购自美国 Thermo 公司;化学发光检测仪购自美国 Promega 公司;高压灭菌锅购自上海博迅实业有限公司医疗设备厂;PCR 仪 PTC-200 购自美国伯乐公司;凝胶成像系统 BIO-PRINT 购自法国 VILBER 公司。

1.1.3 主要试剂

生物素 (Biotin-AC5-Sulfo-Osu) 购自日本 Dojindo 公司;链球菌抗生物蛋白 (Streptavidin)、二磷酸腺苷 (ADP) 购自美国 Sigma 公司;F-DHPE 荧光探针购自美国 Invitrogen 公司;荧光素酶购自美国 Promega 公司;QIAGEN 病毒 RNA 提取试剂盒:购自天根生化科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 RNA 提取

使用 QIAGEN 公司病毒 RNA 提取试剂盒提取待测物病毒 RNA,详细操作步骤见试剂盒说明书。获得的病毒 RNA 用作分子马达传感器的目标检测物。提取后的基因组用分光光度计确定所提取基因组 RNA 溶液的浓度和纯度。该 RNA 提取液置于冰箱中 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,使用时置于室温自然解冻,用振荡器振荡混匀。

1.2.2 探针合成及标记

以轮状病毒 VP7 基因的高度保守区段设计探针,探针序列为 5'-AAGCGGATTATGCAGAA GCACTG-3'。探针合成及探针 5'端生物素标记由大连宝生物公司完成。

1.2.3 载色体 (Chromatophore) 的制备

载色体的制备参照 Suzuki 等^[18]及 Cui 等^[19]的方法进行。将玫瑰嗜热菌 *Thermomicrobium*

roseum 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 r/min 离心 30 min 收集菌体。用提取缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, pH 8.0) 重悬菌体。4 °C、6 000 r/min 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 r/min 离心 30 min, 取上清于一新的离心管中, 4 °C、145 000 r/min 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。

1.2.4 F-DHPE 标记载色体

按照 Su 等^[20]的方法用 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 mg/mL, 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 r/min 离心 15 min, 去上清, 沉淀用 PBS 在 4 °C、10 000 r/min 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。

1.2.5 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。

1.2.6 F₀F₁-ATPase 分子马达生物传感器的构建

吸取 200 μL F-DHPE 标记的载色体于离心管中, 加入 40 μg N-生物素标记 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 r/min 超速离心 10 min;

弃上清, 沉淀用 500 μL PBS 重悬; 加入 Avidin (2 mg/mL) 2 μL, 用 PBS 补加至 1 mL, 室温, 50~100 r/min 摇床振荡反应 10 min; 用 PBS 补加至 1.4 mL, 4 °C、30 000 r/min 超速离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 500 μL PBS 重悬; 最后, 每管各加入 N-生物素标记核酸探针 (2 μmol/L) 2 μL, 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 °C、30 000 r/min 超速离心 10 min, 弃上清, 用 150 μL 含 30% 甘油的 PBS 重悬载色体, 放入 -20 °C 冰箱备用。所构建的分子马达生物传感器命名为 chro RV。

1.2.7 分子马达检测方法的构建

基本步骤: 取 1.5 mL EP 管, 加入待测样本 10 μL。取 2 μL chro RV, 用合成缓冲液稀释到一定的倍数。取 10 μL 稀释后的 chro RV 加入上述 EP 管。另取 1 个 EP 管加入 10 μL 无菌水, 再加入 10 μL 合成缓冲液作为本底对照, 短暂振荡使反应体系混匀。再向 2 个 EP 管中分别加入 30 μL 启动缓冲液 (启动缓冲液由 ADP (1.6 mol/L) 和合成缓冲液按体积比 1 : 3 配制, 每次实验按需要取一定的量配制, 现用现配), 振荡使反应体系混匀, 然后立即短暂离心以除去管盖内壁上的水珠。将上述反应体系置于室温中温育 10 min。将 EP 管从摇床中取出, 分别加入 200 μL 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 50 μL。将 96 孔板上机检测, 处理数据, 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。百分荧光差值计算公式见公式 (1)。将样本荧光值绝对值与 H₂O 的阴性对照荧光值绝对值进行单因素方差

分析,若差异显著 ($P < 0.05$) 表示检出该病毒。

$$\text{百分荧光差值 (\%)} = \frac{B - B_{\text{H}_2\text{O}}}{B - B_0} \times 100 \quad (1)$$

式中, B 表示样本荧光值; B_0 表示本底的荧光值; $B_{\text{H}_2\text{O}}$ 表示 H_2O 的荧光值。

反应条件的优化: 经过试验摸索, 轮状病毒 RNA 浓度 1 ng/mL, chro RV 进行 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 倍稀释, 测定反应的百分荧光差值, 百分荧光差值最大即为方法的最佳 chro RV 浓度; 在最佳 chro RV 浓度下, 轮状病毒 RNA 分别稀释至 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 ng/mL, 反应的百分荧光差值最大即为最佳轮状病毒 RNA 检测浓度。

特异性试验: 为了检验所建立方法的特异性, 分别提取轮状病毒、甲肝病毒、诺如病毒 RNA, 进行分子马达检测。

灵敏度试验: 轮状病毒 RNA 分别稀释至 0.001、0.005、0.01、0.1、1、10、100 ng/mL, 以无菌水为阴性对照, 在最佳检测条件下读取荧光值, 与阴性对照差异显著即为最低检测浓度。

1.2.8 样本的检测及与分子马达检测结果的比较

样品处理: 将日常检测留存 15 份经 RT-PCR 检测已知阴性/阳性贝类样品, 提取 RNA 进行分子马达检测, 读取荧光值, 判断是否检出轮状病毒, 检测结果与 RT-PCR 方法^[21]作比较。

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^[19]。本研究将 F-DHPE 标记到分子马达载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 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2cn$, 是一种可旋转分子马达。ATP 的合成与水解发生在 β 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, 质子由载体体内泵出, 载体体外 H^+ 浓度增大, 从而导致载体体外 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“ ϵ 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, 结构示意图见图 1^[16]。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, 因此质子由载体泵出速度下降, 导致载体体外 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。

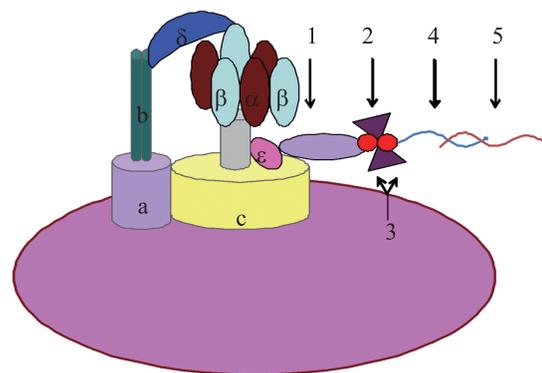


图 1 分子马达传感器模式图

Fig. 1 Schematic diagram of the F_0F_1 -ATPase molecular motor biosensor. 1: ϵ -subunit antibody; 2: strptavidin; 3: N-biotin; 4: probe; 5: single strand target RNA.

2.2 分子马达生物传感器反应体系的建立

2.2.1 反应条件的优化

不同 chro RV 浓度条件下, H₂O、轮状病毒检测荧光值及百分荧光差值见表 1。从表 1 可以看出, chro RV 稀释倍数越小, 最终体系的荧光值强度越大, 原因是 chro RV 浓度越高, 体系中 ATPase 也就越多, 作用于它的荧光物质也就越多, 最终荧光值也越大。chro RV 在 80 倍稀释下差值百分比最大, 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, 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, 最终反应体系的荧光值比目标检测物的荧光值要低, 符合理论检测效果。所以我们选定 chro RV 在 80 倍稀释下的浓度作为检测浓度。

由图 2 可以看出, 不同轮状病毒 RNA 稀释

浓度的荧光值均显著高于阴性对照 ($P < 0.05$), 轮状病毒 RNA 浓度为 0.6 ng/mL, 反应体系的荧光值最大, 百分荧光差值最大, 检测效果最佳。因此, 所建立的生物传感器对轮状病毒 RNA 最佳检测浓度是 0.6 ng/mL。

2.2.2 特异性试验

所建立的分子马达生物传感器检测体系与甲肝病毒 (HAV)、诺如病毒 (NV)、H₂O 没有交叉反应 (图 3), 生物传感器对轮状病毒的荧光值明显高于对 H₂O 的荧光值, 有显著差异 ($P < 0.05$), 而甲肝病毒和诺如病毒的荧光值远低于 RV 的荧光值, 甲肝病毒、诺如病毒和 H₂O 荧光值无显著差异 ($P > 0.05$)。这表明“ ϵ 亚基抗体-链霉素-生物素-探针”系统连接 F₀F₁-ATPase 上, 所构建的 F₀F₁-ATPase 生物传感器对轮状病毒检测特异性良好。重复此实验, 均能得到相似结果, 方法具有良好的重复性。

表 1 chro RV 不同稀释倍数下 H₂O、轮状病毒 RNA 的荧光值

Table 1 Fluorescence values of H₂O and RV RNA under different concentrations of chro RV

| chro RV dilution fold | chro RV concentration (mg/mL) | Fluorescence values of H ₂ O | Fluorescence values of RV | Fluorescence differentials (%) |
|-----------------------|-------------------------------|---|---------------------------|--------------------------------|
| 100 | 0.0156 | 89 618 | 117 857 | 23.96 |
| 90 | 0.0173 | 98 967 | 125 598 | 21.20 |
| 80 | 0.0195 | 119 545 | 159 469 | 25.04 |
| 70 | 0.0223 | 181 465 | 222 697 | 18.51 |
| 60 | 0.0260 | 222 981 | 273 709 | 18.53 |
| 50 | 0.0312 | 324 969 | 420 453 | 22.71 |
| 40 | 0.0390 | 447 383 | 543 429 | 17.67 |
| 30 | 0.0519 | 777 111 | 860 815 | 9.72 |
| 20 | 0.0779 | 1 465 107 | 1 688 476 | 13.23 |
| 10 | 0.1558 | 3 319 982 | 3 722 957 | 10.82 |

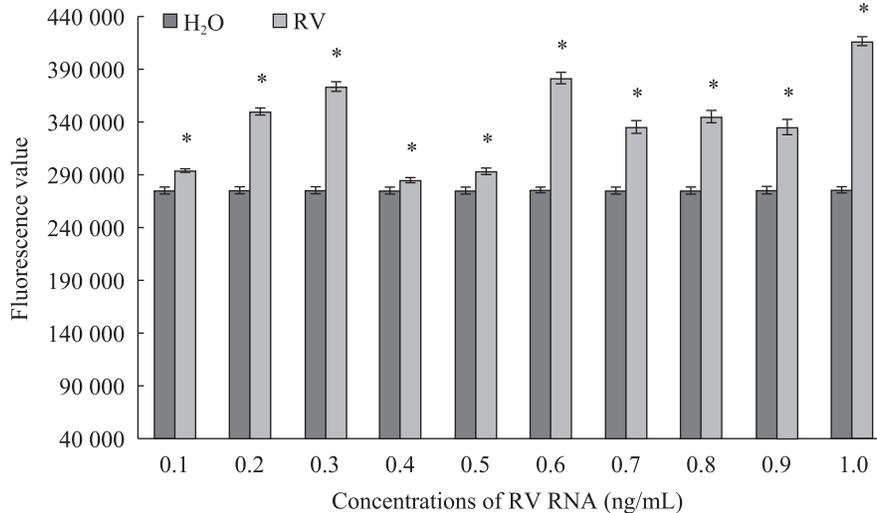


图 2 H₂O 和不同浓度轮状病毒 RNA 的荧光值 (* $P < 0.05$)

Fig. 2 Fluorescence values of H₂O and different concentrations of RV RNA. * $P < 0.05$.

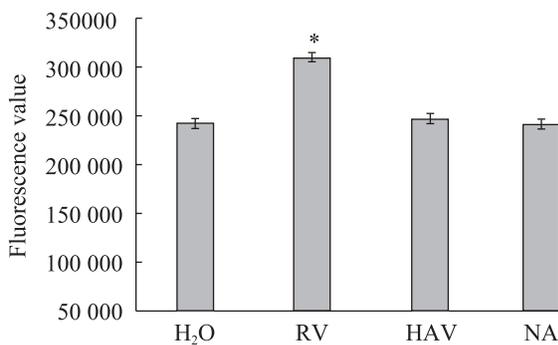


图 3 chro RV 对轮状病毒 RNA 检测的特异性 (* $P < 0.05$)

Fig. 3 Detection specificities of chro RV for RV RNA. Fluorescence values of samples are significant difference compared with H₂O (* $P < 0.05$).

2.2.3 灵敏度试验

轮状病毒 RNA 浓度为 0.001 ng/mL 时, 其荧光值与阴性对照相比无显著差异 ($P > 0.05$) (图 4), 不能检测出轮状病毒。轮状病毒 RNA 浓度在 0.005~100 ng/mL 时, 其荧光值显著高于阴

性对照的荧光值 ($P < 0.05$), 能够检测轮状病毒。因此, 所构建的生物传感器对轮状病毒 RNA 的检测灵敏度为 0.005 ng/mL。

2.3 分子马达生物传感器对贝类样品的检测

通过对样品检测荧光值 (图 5) 发现, 4 号样品和 5 号样品与 H₂O 荧光值差值较小, 没有显著差异 ($P > 0.05$), 而其余样品荧光值与 H₂O 相比较差异显著 ($P < 0.05$), 因此, 可以判断 4 号样品和 5 号样品未检出轮状病毒, 而其余样品检出轮状病毒。与 RT-PCR 结果相比较 (表 2), 检测结果为: 所采用的 RT-PCR 方法的检测限核酸水平为 10 pg 左右, 本方法的检测限为轮状病毒 RNA 浓度 0.005 ng/mL, 本实验室所建立的分子马达生物传感器对轮状病毒检测方法与 RT-PCR 检测方法检测结果完全一致, 说明所建立的检测体系准确可靠。

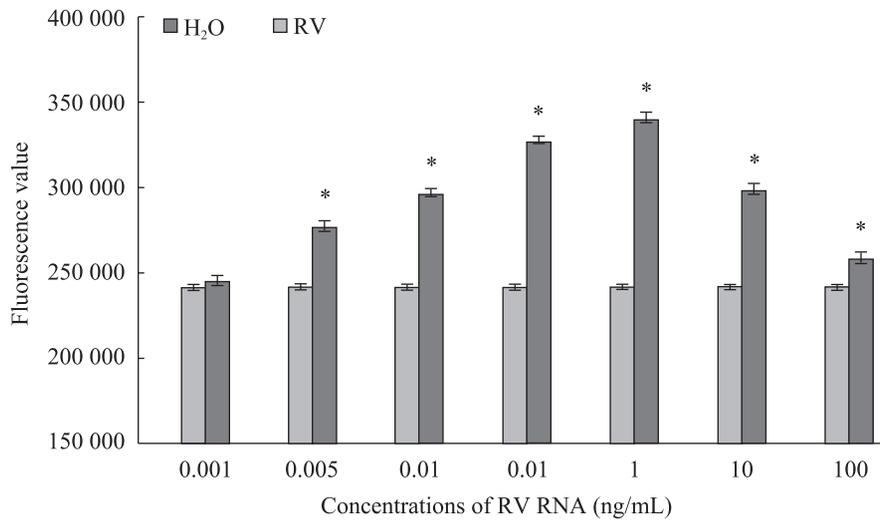


图4 chro RV 对轮状病毒 RNA 检测灵敏度 (*表示样本荧光值与 H₂O 对照相比较差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 4 Detection sensitivities of chro RV for RV RNA. *Fluorescence values of samples are significant difference compared with H₂O ($P < 0.05$).

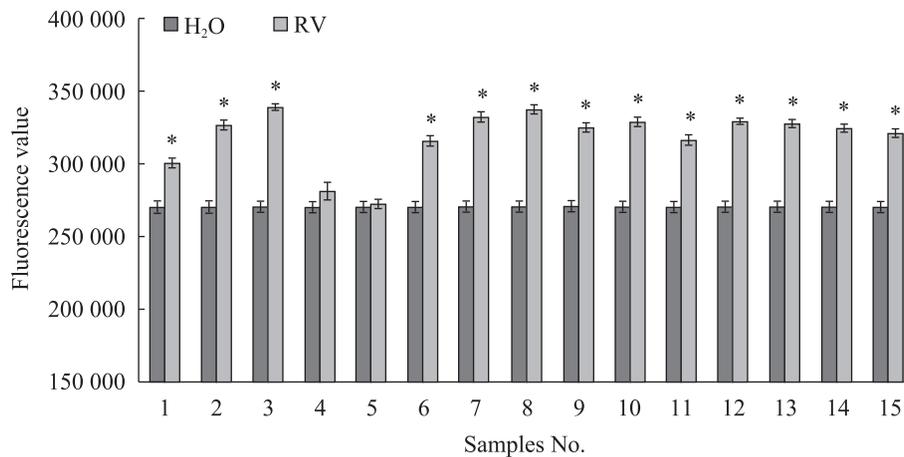


图5 15 份样品检测的荧光值 (*表示样本荧光值与 H₂O 对照相比较差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 5 Fluorescence values of 15 samples. * Fluorescence values of samples are significant difference compared with H₂O ($P < 0.05$).

表2 不同检测方法检测结果 (+表示检出; -表示未检出)

Table 2 Results of different detect method (+: detected; -: not detected)

| Methods | Samples No. | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| RT-PCR | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Molecular motor | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

3 讨论

近年来,轮状病毒感染日益成为一个全球范围内重要的公共卫生问题。受污染的食品是轮状病毒重要传染源之一。因此,建立食源性轮状病毒灵敏快速的检测方法,对于保障人类健康和预防疫情爆发具有重要意义。本实验室采用以嗜热菌中提取的载色体为材料,构建生物传感器,并将其应用于食源性轮状病毒的检测。

ATP 合酶 (F_0F_1 -ATPase) 又称 H^+ -ATP 酶或 F_0F_1 -ATP 酶,是负责细胞内 ATP 合成的关键酶,广泛地存在于动物和真菌的线粒体内膜、植物叶绿体类囊体膜及细菌质膜中。它既能利用跨膜质子梯度合成 ATP,又能水解 ATP 同时反向转运质子。利用 F_0F_1 -ATPase 的质子转运和旋转特性,本实验室研制了基于 F_0F_1 -ATPase 的纳米旋转式生物传感器,它属于一种光学生物传感器,根据纳米生物及其旋转的特性,将探针连接到分子马达上,旋转的马达在溶液体系中运动,利用化学发光检测法通过检测产生 ATP 量的差别来达到检测的目的,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。

通过生物素-亲和素系统将轮状病毒特异性分子探针连接在 F_0F_1 -ATPase 的 ϵ 亚基上构建生物传感器,并对检测体系做了进一步的优化。选取轮状病毒高度保守的 VP7 片段设计轮状病毒各型通用探针,实现对轮状病毒的快速检测。本实验室所建立的方法对轮状病毒 RNA 检测灵敏度达到 0.005 ng/mL,且不需酶切及电泳等繁琐操作,检测时间缩短到 1 h 内。特异性实验表明,该方法对轮状病毒检测特异,与甲肝病毒、诺如病毒无交叉反应。通过对 15 份样品的检测,其

检测结果与 RT-PCR 检测结果一致,说明所构建的分子马达生物传感器适用于轮状病毒的检测。分子马达生物传感器检测装置可大量预制备多次使用,成本较低。因此,本实验室所建立的方法具有灵敏、快速、特异、经济的优点,可用于轮状病毒临床诊断、食物中毒的预警和溯源及食品中轮状病毒快速检测。

但仍然存在的问题是本试验参与反应的试剂和样本都是在液相体系中进行,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^[13]。目前,本研究只做了食源性轮状病毒的检测,而常见的食源性病毒除了轮状病毒外,还包括诺如病毒、甲肝病毒、腺病毒等,因此以本研究为基础,应扩大检测范围,利用分子马达生物传感器实现对多种食源性病毒的同时检测。

REFERENCES

- [1] Xu Z, Chen Q, Huang AF. Molecular epidemiological profile of Rotavirus. *J Appl Clin Pediatr*, 2007, 2(7): 540-542 (in Chinese).
徐彰, 陈其, 黄爱芬. 轮状病毒分子流行病学研究进展. *实用儿科临床杂志*, 2007, 2(7): 540-542.
- [2] Hu XH, He M, Liu L, et al. Construction of external standard for detection of Rotavirus in water using the quantitative real-time polymerase chain reaction. *Environ Sci*, 2008, 29(2): 380-385 (in Chinese).
胡秀华, 何苗, 刘丽, 等. 水中轮状病毒实时定量 PCR 外标准品的构建. *环境科学*, 2008, 29(2): 380-385.
- [3] Orenstein EW, Fang ZY, Xu J, et al. The epidemiology and burden of Rotavirus in China: a

- review of the literature from 1983 to 2005. *Vaccine*, 2007, 25(3): 406–413.
- [4] Parashar UD, Holman RC, Clarke MJ, et al. Hospitalizations associated with Rotavirus diarrhea in the United States, 1993 through 1995: surveillance based on the new ICD-9-CM rotavirus specific diagnostic code. *J Infect Dis*, 1998, 177(1): 13–17.
- [5] Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF. Rotaviruses: a review. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1983, 105: 123–184.
- [6] Cao XR, Akehara S, Fang ZY, et al. Genetic variation in the VP4 and NSP4 genes of human Rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan. *Microbiol Immunol*, 1999, 43(2): 171–175.
- [7] Prasad B, Rothnagel R, Zeng CQ, et al. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in Rotavirus. *Nature*, 1996, 382: 471–473.
- [8] Richards AF, Lopman B, Gunn A, et al. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *Clin Virol*, 2003, 26(1): 109–115.
- [9] Parshionikar SU, Cashdollar J, Fout GS. Development of homologous viral internal controls for use in RT-PCR assays of waterborne enteric viruses. *J Virol Method*, 2004, 121(1): 39–48.
- [10] Adler M, Schulz S, Fischer R, et al. Detection of Rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR (“imperacer”) method with end-point and real-time detection. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(4): 1289–1294.
- [11] Adler M. Immuno-PCR a clinical laboratory tool. *Adv Clin Chem*, 2006, 39: 239–292.
- [12] Beuret C. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods*, 2004, 15(1): 1–8.
- [13] Liu XL, Zhang Y, Yue JC, et al. F_0F_1 -ATPase as biosensor to detect single virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342: 1319–1322.
- [14] Deng ZT, Zhang Y, Yue JC, et al. CdTe quantum dots as effective pH-sensitive fluorescent probes for dual simultaneous and independent detection of viruses. *J Phys Chem B*, 2007, 111: 12024–12031.
- [15] Lv HT, Zhang Y, Yue JC, et al. Application of immune-rotary biosensor based on F_0F_1 -ATPase in chromatophores for detecting clenbuterol. *Food Sci*, 2007, (28): 446–450 (in Chinese).
吕会田, 张云, 乐加昌. 旋转生物传感器高灵敏检测盐酸克伦特罗方法研究. *食品科学*, 2007, 28: 446–450.
- [16] Zhang J, Gu DZ, Zhang HY, et al. Preliminary study of a rapid detecting technology for *Salmonella* based on molecular motor biosensor. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 12(33): 93–96 (in Chinese).
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. *食品工业科技*, 2012, 12(33): 93–96.
- [17] Zhang J, Xiang LP, Wang Q, et al. Detect of *Vibrio cholera* through molecular motor technology. *Food Ferment Ind*, 2012, 6(38): 161–164 (in Chinese).
张捷, 向丽萍, 汪琦, 等. 利用分子马达技术检测霍乱弧菌. *食品与发酵工业*, 2012, 6(38): 161–164.
- [18] Suzuki T, Murakami T, Iion R, et al. F_0F_1 -ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of e subunit in response to proton motive force and ADP/ATP ratio. *J Biol Chem*, 2003, 278: 46840–46846.
- [19] Cui YB, Zhang F, Yue JC. Detecting proton flux across chromatophores driven by F_0F_1 -ATPase using N-(fluorescein-5-thiocarbonyl)-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt. *Anal Biochem*, 2005, 344(1): 102–107.
- [20] Su T, Cui YB, Zhang XA, et al. Constructing a novel nanodevice powered by δ -free F_0F_1 -ATPase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 350: 1013–1018.
- [21] Kou XX, Wu QP, Zhang JM, et al. Study on Rotavirus detection with single-tube seminested RT-PCR method in shellfish. *Acta Microbiol Sin*, 2005, 45(3): 401–404 (in Chinese).
寇晓霞, 吴清平, 张菊梅, 等. 单管半套式 RT-PCR 法检测贝类中轮状病毒的研究. *微生物学报*, 2005, 45(3): 401–404.

(本文责编 郝丽芳)