



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103805580 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201410052723. 6

A62D 101/04 (2007. 01)

(22) 申请日 2014. 02. 17

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号中  
科院生物物理所 8 号楼

(72) 发明人 张先恩 王殿冰 王旭颖 张治平

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限  
公司 42102

代理人 王守仁

(51) Int. Cl.

C12N 9/36 (2006. 01)

C12N 15/75 (2006. 01)

A62D 3/02 (2007. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

A62D 101/28 (2007. 01)

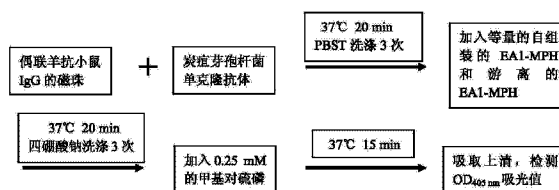
权利要求书1页 说明书6页  
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

基于 S- 层蛋白体外自组装的多功能新型生  
物纳米材料

(57) 摘要

本发明首次将炭疽芽孢杆菌 S- 层蛋白 EA1 与甲基对硫磷水解酶 MPH 融合表达, 通过体外自组装技术, 获得了一种全新的基于 S- 层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料。该材料制备步骤包括重组载体 PQE30-MPH 和 PQE30-EA1-MPH 的构建, 融合蛋白的表达与纯化, 融合蛋白的体外自组装。本发明具备明显的生物学功能, 能够延长 MPH 的贮存时间, 在有机磷农药降解中充分、长期发挥作用, 降低成本; 具有抑菌、杀菌的应用前景; 能够显著提高检测灵敏度, 用于发展高灵敏检测元件。



1. 一种多功能新型生物纳米材料,其特征是一种基于 S- 层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料,该材料由包括以下步骤的方法获得:

(1) 重组载体 PQE30-MPH 和 PQE30-EA1-MPH 的制备:

扩增甲基对硫磷水解酶 MPH 基因和炭疽芽孢杆菌 S- 层蛋白 EA1 基因,并克隆至商业化载体 PQE30 中,分别获得重组载体 PQE30-MPH 和 PQE30-EA1-MPH。

所述 MPH 基因的扩增引物是:

5' -ATATCTGCAGGCCGCACCGCAGGTG-3',

5' -GTGAAGCTTTTACTTGGGGTTGACGAC-3';

所述 EA1 基因的扩增引物是:

5' -TGTAGGATCCGCAGGTAAATCATTC-3',

5' -GCCGAGCTCTAGATTTGGGTTATTA-3';

(2) 融合蛋白的制备:

将重组载体 PQE30-EA1-MPH 通过常规  $\text{CaCl}_2$  转化法转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* M15 中,表达、纯化融合蛋白:挑取单克隆于 5ml 双抗性 LB 培养基中,37°C 过夜培养 16 ~ 20h,按 1% 的接种量转接于双抗性 LB 培养基中,37°C 培养至 OD 值为 0.6 ~ 0.8,此时加入 1mM 的 IPTG 诱导目的蛋白质的表达,表达条件为 28°C,4 ~ 5h。表达后的菌体 6000rpm,4°C 收集,超声破碎,用镍柱亲和纯化目的蛋白,并用 BCA 试剂盒测浓度;所述双抗性 LB 培养基由胰蛋白胨 10g/L,酵母提取物 5g/L,氯化钠 10g/L,100  $\mu\text{g/ml}$  氨苄青霉素和 50  $\mu\text{g/ml}$  卡那霉素组成。

(3) 体外组装多功能新型生物纳米材料:

将上述融合蛋白 EA1-MPH 30 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  置于 pH9.0 的组装缓冲液中,该组装缓冲液为 10mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.5mM Tris-HCl,室温过夜组装;电镜观察,确定其形成具有规则晶格结构的纳米膜,该纳米膜为所述多功能新型生物纳米材料。

2. 根据权利要求 1 所述的多功能新型生物纳米材料,其特征是:具有 P1 对称晶格的膜状结构。

3. 根据权利要求 1 所述的多功能新型生物纳米材料,其特征是:用于有机磷农药降解。

4. 根据权利要求 1 所述的多功能新型生物纳米材料,其特征是:能够稳定甲基对硫磷水解酶的活力,用于酶的长时间贮存。

5. 根据权利要求 1 所述的多功能新型生物纳米材料,其特征是:具有胞壁质水解酶活性,用于抑制溶壁微球菌。

6. 根据权利要求 1 所述的多功能新型生物纳米材料,其特征是:作为炭疽芽孢杆菌抗体检测的超灵敏元件。

7. 根据权利要求 6 所述的多功能新型生物纳米材料,其特征是所述超灵敏元件为:自组装后的多功能新型生物纳米材料。

## 基于 S- 层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物纳米材料,特别是涉及一种基于 S- 层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料。

### 背景技术

[0002] 生物、化学、材料等多种学科的交叉发展,开创了纳米科学的新时代。如今,纳米材料已经广泛应用于超分子结构、装置的制造,并在多个领域发挥重要作用,但是如何获得具有精细结构、尺寸均一、功能化的纳米材料仍然是个挑战。由于经过数亿年的生物进化,大自然中普遍存在着独特的分子自组装系统,控制超分子结构的合成。受此启发,近年来研究者们开始利用分子自组装系统开发理想的生物纳米材料,以满足电子、生物、工程等行业的需求,以“bottom-up”形式自组装的 S- 层蛋白(Surface layer protein, S-layer protein)也因此而瞩目。

[0003] S- 层蛋白是一种天然的生物纳米材料。由文献 1 (U. B. Sleytr, M. Sara, Trends in biotechnology 1997, 15, 20; T. Pavkov-Keller, S. Howorka, W. Keller, Progress in molecular biology and translational science 2011, 103, 73.) 可知: S- 层蛋白是广泛存在于古菌和细菌菌体表面,具有规则晶体结构的单分子层,它与位于其下方的细胞膜或者细胞壁以非共价形式连接,完整的包裹着菌体,构成了生物体与外界环境之间一道天然屏障。由文献 1、文献 2 (M. Sara, U. B. Sleytr, Progress in biophysics and molecular biology 1996, 65, 83; U. B. Sleytr, T. J. Beveridge, Trends in microbiology 1999, 7, 253.) 和文献 3 (B. Schuster, U. B. Sleytr, Methods Mol Biol 2013, 996, 153) 可知: 大部分 S- 层蛋白由单一蛋白质或糖蛋白组成,相对分子质量为 40-230kDa 之间,形成 P1、P2、P3、P4 和 P6 多种结构(亚结构单元数目为 1、2、3、4、6),其亚单位的排列可呈现斜形(P1、P2)、正方形(P4)和六边形(P3、P6)对称。由文献 4 (U. B. Sleytr, C. Huber, N. Ilk, D. Pum, B. Schuster, E. M. Egelseer, FEMS microbiology letters 2007, 267, 131.) 可知: 细菌的 S- 层蛋白厚度通常约为 5-20nm,古细菌的 S- 层蛋白厚度可达 70nm。由文献 5 (M. Sara, U. B. Sleytr, Journal of bacteriology 2000, 182, 859) 可知: 各形态单位的中心间距为 2.5-35nm, S- 层表面的孔洞直径为 2-8nm,占据菌体表面的 70%。由文献 6 (U. B. Sleytr, B. Schuster, E. M. Egelseer, D. Pum, C. M. Horejs, R. Tscheliessnig, N. Ilk, Progress in molecular biology and translational science 2011, 103, 277.) 和文献 7 (D. Pum, J. L. Toca-Herrera, U. B. Sleytr, International journal of molecular sciences 2013, 14, 2484.) 可知: S- 层蛋白是地球上最多的生物分子之一,在具有 S- 层蛋白的生物体中,被用于合成 S- 层的蛋白通常占细胞总蛋白的 10%。参见文献 7, 对于一个中等大小的杆状细菌而言,其完整的 S- 层蛋白需要  $5 \times 10^5$  个单体组成,在代时约为 20-30min 的细菌生长过程中, S- 层蛋白的形成体现了完美的超分子结构组装的动力学过程。

[0004] 在过去的几十年里, S- 层蛋白在结构、化学、遗传、形态发生和功能上蕴含的丰富信息充分体现了其潜在的应用价值。参见文献 3 和文献 8 (S. H. Shin, S. Chung, B. Sanii, L.

R. Comolli, C. R. Bertozzi, J. J. De Yoreo, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2012, 109, 12968. ), 重要的是, 不管是分离自菌体表面还是体外重组表达的 S- 层蛋白都能够在悬浮液、固相支持物、脂质膜等多种界面或者表面上重新自组装成与天然结构相同或者相似的单分子晶格结构, 因而奠定了 S- 层蛋白在作为生物纳米材料的研究基础。已有研究: 参见文献 9 (B. Schuster, D. Pum, M. Sara, U. B. Sleytr, Mini reviews in medicinal chemistry 2006, 6, 909. ), 仿生学领域广泛应用的基础; 参见文献 10 (C. Gobel, B. Schuster, D. Baurecht, U. B. Sleytr, D. Pum, Colloids and surfaces. B, Biointerfaces 2010, 75, 565. ), S- 层蛋白作为合成硅的模板; 参见文献 11 (D. Schuster, S. Kupcu, D. J. Belton, C. C. Perry, M. Stoger-Pollach, U. B. Sleytr, D. Pum, Acta biomaterialia 2013, 9, 5689. ), 基于 S- 层蛋白制造新纳米硅材料; 参见文献 12 (J. Liu, Y. Mao, E. Lan, D. R. Banatao, G. J. Forse, J. Lu, H. O. Blom, T. O. Yeates, B. Dunn, J. P. Chang, Journal of the American Chemical Society 2008, 130, 16908. ), 用 S- 层蛋白为模板制成氧化物纳米材料; 参见文献 13 (S. R. Scheicher, B. Kainz, S. Kostler, N. Reitinger, N. Steiner, H. Ditlbacher, A. Leitner, D. Pum, U. B. Sleytr, V. Ribitsch, Biosensors & bioelectronics 2013, 40, 32. ), 以二维纳米结构的 S- 层蛋白为固定模板的 DNA 微阵列等。由此可见, S- 层蛋白作为纳米材料近几年已经成为一个新的研究热点。但是现阶段对于 S- 层蛋白的很多研究是针对其理化性质, 往往忽视了它们原本的生物学功能, 这无形中缩小了 S- 层蛋白作为生物纳米材料的应用范围。炭疽芽孢杆菌 S- 层蛋白 EA1 为无毒蛋白, 不仅具有潜在的体外自组装能力, 而且是炭疽芽孢杆菌重要抗原, 并具有胞壁质水解酶的活性。甲基对硫磷水解酶 MPH, 不仅可高效降解有机磷农药, 而且可作为标记酶用于体外分析检测。因此, 本发明充分利用 EA1 和 MPH 两种蛋白的生物学特性, 首次开发了一种基于 S- 层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料, 该材料可应用于多个领域。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的是发明一种基于 S- 层蛋白 EA1 体外自组装的多功能新型生物纳米材料。该材料不具有炭疽芽孢杆菌的危害性, 具有 P1 对称晶格的膜状结构, 具有胞壁质水解酶活性, 可作为炭疽芽孢杆菌重要抗原, 高灵敏识别特异性抗体。

[0006] 本发明的另一个目的是将上述自组装材料进一步多功能化, 使其能够稳定甲基对硫磷水解酶的活力, 用于有机磷农药降解及体外特异性抗体分析检测。

[0007] 本发明解决其技术问题提供以下的技术方案:

[0008] 本发明提供的多功能新型生物纳米材料, 是一种基于 S- 层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料, 该材料由包括以下步骤的方法获得:

[0009] (1) 重组载体 PQE30-MPH 和 PQE30-EA1-MPH 的制备:

[0010] 扩增甲基对硫磷水解酶 MPH 基因和炭疽芽孢杆菌 S- 层蛋白 EA1 基因, 并克隆至商业化载体 PQE30 中, 分别获得重组载体 PQE30-MPH 和 PQE30-EA1-MPH。

[0011] 所述 MPH 基因的扩增引物是:

[0012] 5' -ATATCTGCAGGCCGCACCGCAGGTG-3',

[0013] 5' -GTGAAGCTTTTACTTGGGGTTGACGAC-3' ;

[0014] 所述 EA1 基因的扩增引物是:

[0015] 5' -TGTAGGATCCGCAGGTAAATCATTC-3' ,

[0016] 5' -GCCGAGCTCTAGATTTGGGTATTA-3' ;

[0017] (2) 融合蛋白的制备 :

[0018] 将重组载体 PQE30-EA1-MPH 通过常规  $\text{CaCl}_2$  转化法转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* M15 (*E. coli* M15) 中, 表达、纯化融合蛋白: 挑取单克隆于 5ml LB 培养基中 (100  $\mu\text{g/ml}$  氨苄青霉素, 50  $\mu\text{g/ml}$  卡那霉素), 37°C 过夜培养 16 ~ 20h, 按 1% 的接种量转接于 LB 培养基中 (100  $\mu\text{g/ml}$  氨苄青霉素, 50  $\mu\text{g/ml}$  卡那霉素), 37°C 培养至 OD 值为 0.6 ~ 0.8, 此时加入 1mM 的 IPTG 诱导目的蛋白质的表达, 表达条件为 28°C, 4 ~ 5h。表达后的菌体 6000rpm, 4°C 收集, 超声破碎, 用镍柱亲和纯化目的蛋白, 并用 BCA 试剂盒测浓度。

[0019] (3) 体外自组装多功能新型生物纳米材料 :

[0020] 将上述融合蛋白 EA1-MPH30 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  置于 pH9.0 的组装缓冲液 (10mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.5mM Tris-HCl) 中, 室温过夜组装。电镜观察, 确定其形成具有规则晶格结构的纳米膜, 该纳米膜为所述多功能新型生物纳米材料。

[0021] 本发明多功能新型生物纳米材料可以具有 P1 对称晶格的膜状结构。

[0022] 本发明多功能新型生物纳米材料可以用于有机磷农药降解。

[0023] 本发明多功能新型生物纳米材料可以稳定甲基对硫磷水解酶的活力, 可以用于酶的长时间贮存。

[0024] 本发明多功能新型生物纳米材料可以具有胞壁质水解酶活性, 可以用于抑制溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*)。

[0025] 本发明多功能新型生物纳米材料可以作为炭疽芽孢杆菌抗体检测的超灵敏元件。

[0026] 所述超灵敏元件可以为: 自组装后的多功能新型生物纳米材料。

[0027] 本发明与现有技术相比, 主要有以下优势:

[0028] 1. 已有 S- 层蛋白自组装材料研究均围绕其自组装特性展开, 不具备明显的生物学功能。本发明中基于 EA1 蛋白的生物纳米膜则具有胞壁质水解酶活性、同时呈现炭疽芽孢杆菌抗原特性; 本发明中基于融合蛋白 EA1-MPH 自组装的多功能新型生物纳米材料则兼有 EA1 和 MPH 共同特性。

[0029] 2. 有机磷农药是病虫害防治的常用农药之一, 对环境造成很大污染, 有害于人和动物的健康。甲基对硫磷水解酶可以有效降解有机磷农药。研究表明, 游离的 MPH 在 4°C、37°C 保存过程中, 其活力损失远远大于自组装成纳米膜的 EA1-MPH。因此, 本发明涉及的多功能新型生物纳米材料能够延长 MPH 的贮存时间, 在有机磷农药降解中充分、长期发挥作用, 降低成本。此外, 当甲基对硫磷水解酶作为标记酶用于体外分析检测时, 本发明有利于稳定显色信号, 从而提高检测灵敏度。

[0030] 3. 本发明涉及的多功能新型生物纳米材料具有胞壁质水解酶的活性, 可水解细菌细胞壁, 因而具有抑菌、杀菌的应用前景。

[0031] 4. 本发明涉及的多功能新型生物纳米材料能够高灵敏特异性识别 EA1 抗体, 其检测灵敏度比游离的 EA1 提高 200 倍以上, 可用于发展高灵敏检测元件。

## 附图说明

[0032] 图 1 为本发明检测溶液中炭疽芽孢杆菌抗体的流程示意图。

## 具体实施方式

[0033] 本发明涉及一种基于 S-层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料。不同维度的生物纳米材料是当今研究热点。细菌 S-层蛋白可在体外自组装成具有天然 S-层晶格结构的二维纳米膜,因而被广泛关注。然而,如何获得具有精细结构、尺寸均一、功能化的二维生物纳米材料仍然存在挑战。本发明首次将炭疽芽孢杆菌 S-层蛋白 EA1 与甲基对硫磷水解酶 MPH 融合表达,通过体外自组装技术,获得了一种多功能新型生物纳米材料:1)具有 P1 对称晶格的膜状结构 2)可用于有机磷农药降解 3)能够稳定甲基对硫磷水解酶的活力,用于酶的长时间贮存 4)具有胞壁质水解酶活性,可用于抑菌 5)可作为炭疽芽孢杆菌抗体检测的超灵敏元件。

[0034] 下面结合过实施例及附图对本发明作进一步说明,但不限定本发明。

[0035] 实施例 1. 基于 S-层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料

[0036] 该多功能新型生物纳米材料是采用以下方法获得:

[0037] 1. 重组载体 PQE30-MPH 和 PQE30-EA1-MPH 的制备:

[0038] 扩增甲基对硫磷水解酶 MPH 基因和炭疽芽孢杆菌 S-层蛋白 EA1 基因,并克隆至商业化载体 PQE30 中,分别获得重组载体 PQE30-MPH 和 PQE30-EA1-MPH。其中:MPH 基因是从质粒中 PCR 获得,该质粒为中国科学院一实验室构建,参见文献 14(L. Sun, Y. Dong, Y. Zhou, M. Yang, C. Zhang, Z. Rao, X. E. Zhang, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*2004, 60, 954. )。EA1 基因是从质粒中 PCR 获得,该质粒为中国科学院一实验室构建,参见文献 15 (D. B. Wang, R. Yang, Z. P. Zhang, L. J. Bi, X. Y. You, H. P. Wei, Y. F. Zhou, Z. Yu, X. E. Zhang, *PLoS one*2009, 4, e7810. )

[0039] 所述 MPH 基因的扩增引物是:

[0040] 5' -ATATCTGCAGGCCGCACCCGAGGTG-3',

[0041] 5' -GTGAAGCTTTTACTTGGGGTTGACGAC-3' ;

[0042] 所述 EA1 基因的扩增引物是:

[0043] 5' -TGTAGGATCCGCAGGTAAATCATTC-3',

[0044] 5' -GCCGAGCTCTAGATTTGGGTTATTA-3' ;

[0045] 在扩增甲基对硫磷水解酶 MPH 基因过程中,其方法是常规 PCR 反应,即聚合酶链式反应:反应液中包含上游引物(20mM, 1  $\mu$  l),下游引物(20mM, 1  $\mu$  l), DNA 模板(含有 MPH 基因的质粒, 10ng), 4 种 dNTP 混合物(2.5mM, 4  $\mu$  l), 10 $\times$ Probest PCR 缓冲液(5 $\mu$ l), Probest DNA 聚合酶(0.3  $\mu$  l), 补超纯水至 50  $\mu$  l。将混匀的溶液置于 PCR 仪器上,设置条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

[0046] 在扩增炭疽芽孢杆菌 S-层蛋白 EA1 基因过程中,其方法是常规 PCR 反应,即聚合酶链式反应:反应液中包含上游引物(20mM, 1  $\mu$  l),下游引物(20mM, 1  $\mu$  l), DNA 模板(含有 EA1 基因的质粒, 10ng), 4 种 dNTP 混合物(2.5mM, 4  $\mu$  l), 10 $\times$ Probest PCR 缓冲液(5 $\mu$ l), Probest DNA 聚合酶(0.3  $\mu$  l), 补超纯水至 50  $\mu$  l。将混匀的溶液置于 PCR 仪器上,设置条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 160s, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

[0047] 所述克隆至商业化载体 PQE30 中的方法是:将 PCR 所得基因经过双酶切与同样双

酶切后的载体相连接(MPH 双酶切位点为 Pst I 和 Hind III, EA1 的双酶切位点为 BamH I 和 Sac I), CaCl<sub>2</sub> 转化法转化至大肠杆菌 *E. coli* M15 中, 将获得的克隆测序, 得到序列正确的克隆。

[0048] 2. 融合蛋白的制备:

[0049] 将重组载体 PQE30-EA1-MPH 通过常规 CaCl<sub>2</sub> 转化法转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* M15 (*E. coli* M15) 中, 表达、纯化融合蛋白: 挑取单克隆于 5ml LB 培养基中 (100 μg/ml 氨苄青霉素, 50 μg/ml 卡那霉素), 37°C 过夜培养 16 ~ 20h, 1% 接种量转接于 LB (100 μg/ml 氨苄青霉素, 50 μg/ml 卡那霉素), 37°C 培养至 OD 值为 0.6 ~ 0.8, 1mM 的 IPTG 诱导, 28°C 培养 4 ~ 5h。6000rpm 4°C 收集菌体 10min, 超声破碎后, 用镍柱亲和纯化目的蛋白, 用 BCA 试剂盒测浓度。

[0050] 所述常规 CaCl<sub>2</sub> 转化法是: 将 PCR 所得基因经过双酶切与同样双酶切后的载体相连接 (MPH 双酶切位点为 Pst I 和 Hind III, EA1 的双酶切位点为 BamH I 和 Sac I), 将连接后的产物 10 μl 加入 100 μl 的 *Escherichia coli* M15 (*E. coli* M15) 感受态中, 冰上放置 30min 后, 42°C, 90s 热激, 热激后的菌液立即放置冰上 2min, 加入 900 μl 的 LB 培养基, 置于 37°C 培养 1h 后涂布 LB 固体培养平板 (100 μg/ml 氨苄青霉素, 50 μg/ml 卡那霉素), 37°C 静置培养 16 ~ 20h。

[0051] 所述 IPTG 诱导是: 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 是一种作用极强的诱导剂, 它可以诱导外源基因的表达, 普遍应用于原核表达系统, 使其表达量增高, 产物稳定, 具有易鉴定, 易纯化的优点。

[0052] 3. 体外自组装多功能新型生物纳米材料:

[0053] 将上述融合蛋白 EA1-MPH30 ~ 100 μg/ml 置于 pH9.0 的组装缓冲液 (10mM CaCl<sub>2</sub>、0.5mM Tris-HCl) 中, 室温过夜组装。电镜观察, 确定其形成具有规则晶格结构的纳米膜。

[0054] 经过上述步骤, 得到所述多功能新型生物纳米材料。

[0055] 实施例 2. 基于 S-层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料的应用

[0056] 由实施例 1 制备的多功能新型生物纳米材料, 其用于有机磷农药降解。

[0057] 在用于有机磷农药降解过程中, 将多功能新型生物纳米材料加入含有有机磷农药甲基对硫磷溶液中, 充分反应后可以肉眼看见溶液变黄, 且在 OD<sub>405nm</sub> 处有特征吸收峰, 说明有机磷农药已被该多功能新型生物纳米材料水解成对硝基苯酚 (PNP)。

[0058] 实施例 3. 基于 S-层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料的应用

[0059] 由实施例 1 制备的多功能新型生物纳米材料, 其能够稳定甲基对硫磷水解酶的活力, 用于酶的长时间贮存。

[0060] 在用于酶的长时间贮存的过程中, 研究发现在 4°C 和 37°C 贮存时, 多功能新型生物纳米材料酶稳定性要明显高于游离酶组。

[0061] 实施例 4. 基于 S-层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料的应用

[0062] 由实施例 1 制备的多功能新型生物纳米材料, 其具有胞壁质水解酶活性, 用于抑制溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*)。

[0063] 实施例 5. 基于 S-层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料的应用

[0064] 由实施例 1 制备的多功能新型生物纳米材料, 其作为炭疽芽孢杆菌抗体检测的超灵敏元件。该超灵敏元件无毒, 可以在短时间内快速灵敏检测溶液中的炭疽芽孢杆菌抗体。

[0065] 本发明提供的上述多功能新型生物纳米材料,其性能可以通过下述方法检测。

[0066] 1. 多功能新型生物纳米材料的甲基对硫磷水解酶活及稳定性测定:

[0067] 检测方法是:等摩尔的游离 MPH 和本发明中的多功能新型生物纳米材料分别在 4°C 和 37°C 贮存,结果发现:4°C 贮存 45 天时,EA1-MPH 组装蛋白还保有 70% 的酶活,明显高于非组装条件下的 EA1-MPH 和游离 MPH;37°C 贮存 5 天时,组装的 EA1-MPH 同样比对照组酶活要高。结论:本发明涉及的多功能新型生物纳米材料能够稳定甲基对硫磷水解酶的活力。

[0068] 2. 多功能新型生物纳米材料的胞壁质水解酶功能测定:

[0069] 配制分离胶为 10%SDS-PAGE 蛋白胶,胶中包含 0.2%(w/v) 溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus* ATCC No.4698 购买自 Sigma 公司)。纯化的融合蛋白 EA1-MPH 煮沸 3 分钟后进行 SDS-PAGE 分析。完整的蛋白胶于超纯水中洗涤 30min,然后复性于 1%Triton X-100,25mM Tris-HCl,pH8.0 中,37°C,16 ~ 20h。复性后的蛋白胶用超纯水洗涤并用 1% 的亚甲基蓝(溶于 0.01%(w/v)KOH)室温染色 5min,超纯水洗脱至目的蛋白条带透明。此时,整块蛋白胶因为混有能被亚甲基蓝染色的溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 而呈现淡蓝色,但是目的蛋白由于可以水解细胞壁所以呈现透明色。结论:本发明涉及的多功能新型生物纳米材料有胞壁质水解酶的活力,可以降解细菌细胞壁。

[0070] 3. 多功能新型生物纳米材料用于超灵敏检测特异性抗体:

[0071] (1) 磁珠偶联:

[0072] 将 100 ~ 300nm 直径的磁珠(购买自 Ademtech 公司)与 EDC(购买自 sigma 公司)和 sulfo-NHS(购买自 sigma 公司)于室温混合 2h;加入羊抗小鼠 IgG,37°C,孵育 2h,使磁珠颗粒与羊抗小鼠 IgG 充分接触;用 5%BSA37°C 封闭 2h;0.01M PBS 洗涤数次,4°C 储存。

[0073] (2) 多功能新型生物纳米材料识别特异性抗体:

[0074] 取一定量(例如 20  $\mu$  l)的磁珠与 1% 的 BSA 混合,加入不同浓度的炭疽芽孢杆菌单克隆抗体,37°C,20min;用 PBST 洗涤磁珠 3 次,加入等量自组装的 EA1-MPH(多功能新型生物纳米材料)和游离的 EA1-MPH,37°C,20min;用四硼酸钠溶液洗涤 3 次;加入 100  $\mu$  l 0.25mM 甲基对硫磷,37°C,15min,显色;取反应后的溶液 100  $\mu$  l 于 OD<sub>405nm</sub> 下测试其吸光值。结论:本发明涉及的多功能新型生物纳米材料可以超灵敏检测特异性抗体,其检测灵敏度比游离的蛋白高 200 倍以上。



<110> 中国科学院生物物理研究所  
<120> 基于 S- 层蛋白体外自组装的多功能新型生物纳米材料  
<140>  
<141>  
<160> 1  
<170>

<210> 1  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列(MPH 基因的扩增引物)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>  
<400> 1  
ATATCTGCAGGCCGCACCGCAGGTG

<210> 2  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工序列(MPH 基因的扩增引物)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>  
<400> 2  
GTGAAGCTTTTACTTGGGGTTGACGAC

---

<210> 3  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列(EA1 基因的扩增引物)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>  
<400> 3  
TGTAGGATCCGCAGGTAAATCATTC

<210> 4  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列(EA1 基因的扩增引物)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>  
<400> 4  
GCCGAGCTCTAGATTTGGGTTATTA

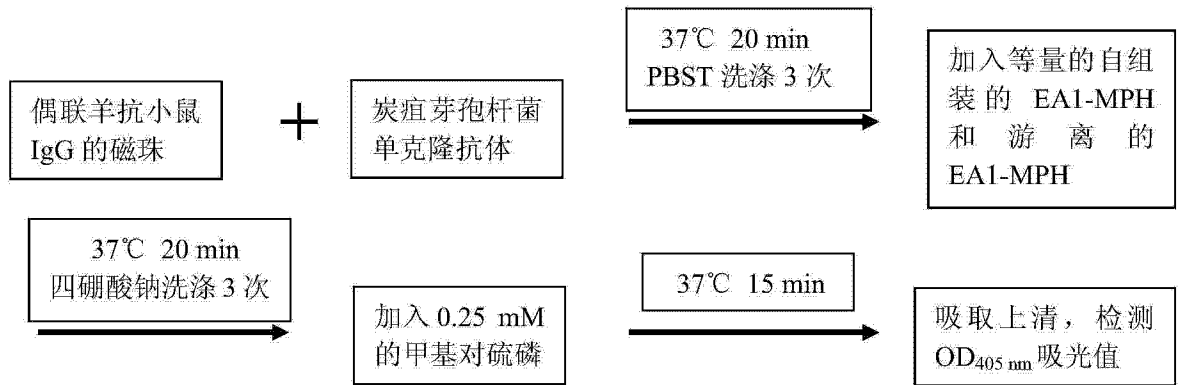


图 1