

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102135543 A

(43) 申请公布日 2011.07.27

(21) 申请号 201010102258.4

(22) 申请日 2010.01.27

(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

(72) 发明人 乐加昌 陶宁 张旭 李学仁

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 4 页

(54) 发明名称

实时灵敏生物大分子检测新方法及试剂盒制备

(57) 摘要

本发明涉及一种全旋转式生物传感器,用于生物大分子(病毒蛋白)的快速检测。该检测体系以 ATPase 的  $\epsilon$  亚基作为负载连接位点,以生物素-亲和素-生物素为连接成分,该连接部分对生物大分子具有边捕获抗原,边旋转的双重功能,减少了常用生物大分子测定研究中抗体抗原之间的结合的时间,明显缩短了反应过程。另外,该检测体系采用双淬灭荧光新技术,起到双淬灭的协同效应,从而提高反应的效率,有效提高了信噪比,实现了实时灵敏快速检测;并且采用 sol-gel 技术(溶胶-凝胶法),提高了分子马达在介质表面的稳定性,使组内平行性更好。

1. 一种纳米生物传感器,其包括载色体,该载色体上含有分子马达  $F_0F_1$ -ATPase,其中所述  $F_0F_1$ -ATPase 的  $\epsilon$  亚基上连接有生物大分子。
2. 根据权利要求 1 所述的纳米生物传感器,其中所述载色体是来自编号为 ATCC 27502 的嗜热菌 (*Thermomicrobium roseum*)。
3. 根据权利要求 1 所述的纳米生物传感器,其中所述  $\epsilon$  亚基是经由抗  $\epsilon$  亚基抗体与所述生物大分子连接。
4. 根据权利要求 3 所述的纳米生物传感器,其中所述抗  $\epsilon$  亚基抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。
5. 根据权利要求 1 所述的纳米生物传感器,其中所述抗  $\epsilon$  亚基抗体是通过生物素-亲和素-生物素与所述生物大分子连接。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的纳米生物传感器,其中所述生物大分子是 DNA、小 RNA、或蛋白质,优选病毒分子特异性抗原的抗体。
7. 根据权利要求 1-6 任一项所述的纳米生物传感器在制备用于检测生物大分子的试剂中的应用,优选其中所述纳米生物传感器经过了 sol-gel 技术(溶液-凝胶法)处理。
8. 根据权利要求 7 所述的应用,其中所述试剂用于 96 孔芯片型快速灵敏检测。
9. 试剂盒,其包含:  
根据权利要求 1-6 中任一项所述的纳米生物传感器。
10. 根据权利要求 9 的试剂盒,其中所述试剂盒是 96 孔 ELISA 过滤性微孔板的形式。

## 实时灵敏生物大分子检测新方法及试剂盒制备

### 技术领域

[0001] 本发明属于纳米生物新技术领域,涉及旋转式 ATP 马达构建的纳米生物传感器的设计、组装及在病毒、蛋白快速灵敏检测中的新方法与其对应的检测试剂盒制备与应用。

### 背景技术

[0002] 本发明人于 2004 年 12 月 16 日提交了题为“可调控分子马达微动力生物传感器”的中国专利申请(公开日:2006 年 6 月 21 日,CN1789425,已授权),公开了一种可调控分子马达微动力生物传感器,其包含以下部分:(1) 旋转马达: $F_0F_1$ -ATP 酶;(2) 光能转换装置:光反应中心与复合物(RC)和泛醌;(3) 电子转换装置:与光能转换装置为同一体系;(4) 信号分子输出装置:由光激发与发射装置和荧光探针组成;(5) 能源系统:由水,ATP,ADP,无机磷,和可见光组成;(6) 保护层:双层脂膜作位内膜的保护层;(7) 支架材料和双层脂膜的固定材料。该专利公开了荧光探针可以是位于膜外侧的 Lipids- 荧光素,位于膜内侧的荧光素,分子马达旋转是由 ATP 水解驱动的,其中所述分子马达旋转是由能转换的跨膜电化学电位差驱动的,或者所述跨膜电化学电位差是由光能或化学能转换的。在该生物传感器中,负载是连接在生物传感器的分子马达的三个  $\beta$  亚基上。该专利还公开了所述可调控分子马达微动力生物传感器在生物大分子、病毒分子等的检测中的应用。

### 发明内容

[0003] 本发明是对该中国专利申请号 200410098929.9 的进一步重要改进,主要的区别:(1) 在于本发明用旋转式分子马达原理的生物传感器,发明了一种全新的功能分子器件,该器件具备对生物分子进行边捕捉目标分子,边旋转将其捕捉到目标分子实时过程的功能为一体,发展成为实时灵敏快速检测新技术;(2) 对前一专利(中国专利申请号 200410098929.9)中荧光测定的原理和方法进行了重要的改进,提出了将 ATP 合酶的合成过程中的产物 ATP 作为荧光淬灭剂,结合 ATP 合酶的合成过程中质子外流引起的膜外 pH 改变引起的荧光强度减弱,两者对荧光的减弱效应在我们的反应条件下具有协同作用;(3) 在分子马达旋转驱动的能量方面,本发明将光能转换技术改进为化学能驱动,此改进将生物传感器边捕捉目标分子,边测定荧光强度的设想变成可能;(4) 本发明与检测试剂盒制备新方法结合在一起,使基于旋转式分子马达原理的生物传感器的实际应用成为可能;上述检测方法及试剂盒制备技术可广泛扩展应用于环境、国防、能源、信息等众多领域,有极其广泛的应用价值和巨大的经济与社会效益。

[0004] 本发明从分子马达生物传感器的角度,构建以  $F_0F_1$ -ATPase 蛋白质旋转分子马达为基础的,以生物素-亲和素-生物素为连接成分,以病毒蛋白抗体为捕获体的高灵敏、快速检测体系,产生类似于微动力旋转捕获器的效应,明显缩短了反应时间,采用 ATP、质子外流双淬灭荧光技术,有效提高了信噪比,采用 sol-gel 技术(溶胶-凝胶法)提高了生物马达生物芯片的均一性,实现了实时灵敏快速检测。

[0005] 具体地,本发明提供以下各项:

- [0006] 1. 一种纳米生物传感器,其包括载色体,该载色体上含有分子马达  $F_0F_1$ -ATPase,其中所述  $F_0F_1$ -ATPase 的  $\epsilon$  亚基上连接有生物大分子。
- [0007] 2. 根据以上 1 所述的纳米生物传感器,其中所述载色体 (chromatophores) 是来自 (制备自) 编号为 ATCC 27502 的嗜热菌 (*Thermomicrobium roseum*)。
- [0008] 3. 根据以上 1 所述的纳米生物传感器,其中所述  $\epsilon$  亚基是经由抗  $\epsilon$  亚基抗体与所述生物大分子连接。
- [0009] 4. 根据以上 4 所述的纳米生物传感器,其中所述抗  $\epsilon$  亚基抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。
- [0010] 5. 根据以上 1 所述的纳米生物传感器,其中所述抗  $\epsilon$  亚基抗体是通过生物素 - 亲和素 - 生物素与所述生物大分子连接。
- [0011] 6. 根据以上 1-5 中任一项所述的纳米生物传感器,其中所述生物大分子是 DNA、小 RNA (小干扰 RNA, 反义 RNA 等)、或蛋白质 (亲和性受体 / 配体, 抗原 / 抗体), 优选病毒分子特异性抗原 (例如病毒蛋白) 的抗体, 该抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。
- [0012] 7. 根据以上 1-6 任一项所述的纳米生物传感器在制备用于检测生物大分子的试剂中的应用。
- [0013] 8. 根据以上 7 所述的应用,其中所述纳米生物传感器经过了 sol-gel 技术 (溶液 - 凝胶法) 处理。
- [0014] 9. 根据以上 7 或 8 所述的应用,其中所述试剂用于 96 孔芯片型快速灵敏检测。
- [0015] 10. 试剂盒,其包含:
- [0016] 根据以上 1-5 中任一项所述的纳米生物传感器。
- [0017] 在本发明的一个优选实施方案中,所述试剂盒包含在一个隔室中的根据以上 1-5 中任一项所述的纳米生物传感器。
- [0018] 11. 根据以上 10 的试剂盒,其中所述试剂盒是 96 孔 ELISA 过滤性微孔板的形式,其中所述纳米生物传感器位于所述 96 孔 ELISA 过滤性微孔板的各孔中的滤纸上。
- [0019] 12. 根据以上 6 所述的纳米生物传感器,其中所述病毒是禽流感病毒 (H5N1、H1N1 型) 或 HIV。
- [0020] 另一方面,本发明涉及以下各项:
- [0021] 1. 一种纳米生物传感器,其包括载色体,该载色体上含有分子马达  $F_0F_1$ -ATPase,其中所述  $F_0F_1$ -ATPase 来自嗜热菌 (ATCC27502),并且所述  $F_0F_1$ -ATPase 的  $\epsilon$  亚基上连接有病毒蛋白抗体。
- [0022] 2. 根据以上 1 的纳米生物传感器,其中所述  $\epsilon$  亚基是经由抗  $\epsilon$  亚基抗体与所述病毒蛋白抗体连接,其中所述抗  $\epsilon$  亚基抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。
- [0023] 3. 根据以上 2 的纳米生物传感器,其中所述抗  $\epsilon$  亚基抗体是通过生物素 - 亲和素 - 生物素与所述病毒蛋白抗体连接。
- [0024] 4. 根据以上 1 的纳米生物传感器,ATPase 合成产物 ATP 可以作为荧光淬灭剂,而 ATPase 旋转过程中泵出膜外的质子也可以引起膜外荧光的减弱,起到双淬灭的协同效应;
- [0025] 5. 根据以上 1 的纳米生物传感器,其中驱动分子马达旋转的能量来自于 ATP 的生物化学能,而不是前一专利中的光能转化为质子梯度,然后驱动分子马达旋转,即以化学能驱动代替光能光驱;

[0026] 6. 根据以上 1 的纳米生物传感器,其铺生物芯片时在溶液中用到了 sol-gel 技术,实现了产品的均一性;

[0027] 7. 根据以上 1-5 任一项所述的纳米生物传感器在快速灵敏检测病毒蛋白中应用,所述纳米生物传感器用于快速灵敏检测。

[0028] 本发明还提供应用于病毒蛋白粒子快速灵敏检测的纳米生物机器人的构建方法,该方法包括如下步骤(步骤后未详细描述的部分可参见中国专利申请号 200410098929.9):

[0029] (1)嗜热菌载色体(chromatophores)的制备

[0030] 培养嗜热菌(Thermomicrobium roseum, ATCC 27502,商购于美国 ATCC 菌种保藏中心)。培养基:1 升水中加入 Yeast extract 1.0g, Tryptone1.0g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.247g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.28g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.074g,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.019g, 盐溶液 1ml。盐溶液的配方为  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.8g,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  4.4g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.22g,  $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.05g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.03g,  $\text{VSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.03g,用  $\text{H}_2\text{SO}_4$  调 pH 至 2.0。高压灭菌 15 分钟。

[0031] 收获:细菌的培养温度为  $60^\circ\text{C}$ ,摇床转速为 120 转/分,培养 24 小时,5000g 离心收集。

[0032] 载色体(Chromatophores)的提取:将以上收集的细菌用缓冲液(20mM, Tris-HCl, 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐) pH 8.0, 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 100mM NaCl, 10%甘油)洗涤一次,然后再加入 20ml 的上述缓冲液,悬浮后,超声(20%振幅, Cole Parmer CPX 600 超声仪 13# 探头),超声 5 秒,停 8 秒,超声有效时间为 8 分钟,用上述缓冲液洗涤一次。180,000g 在  $4^\circ\text{C}$  离心 90 分钟,沉淀为载色体(Chromatophores),该载色体上含有分子马达  $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$ 。

[0033] (2)F-DHPE 标记载色体(chromatophore)

[0034] 将  $360 \mu\text{l}$  的  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  以上制备的载色体(chromatophore)(带有分子马达的脂囊泡)加入  $0.1\text{mM}$   $540 \mu\text{l}$  的 Tricine(三(羟甲基)甲基甘氨酸, Amresco 进口分装)(pH = 8.0),充分混匀,加入  $40 \mu\text{l}$ ,  $1\text{mg}/\text{ml}$  的 F-DHPE(荧光探针,购自美国 Invitrogen 公司,产品名: fluorescein-DHPE [N-(fluorescencein-5-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-s-n-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt, 产品编号: 445395),室温摇床上放置 60 分钟,离心去掉游离的 F-DHPE,  $14,000\text{rpm}$ , 30 分钟,洗 1 遍,重悬于  $400 \mu\text{l}$ ,  $0.1\text{mM}$  的 Tricine(pH = 6.5),备用。

[0035] (3) sol-gel 溶液(溶胶-凝胶法)制备①将 15.2ml 正硅酸乙酯(购自国药集团化学试剂有限公司,产品编号: 80124192)和 80 微升  $0.07\text{N}$  HCl 依次加入 3.6ml 去离子水;②将之置于冰浴上搅拌 10 分钟;③室温超声 20 分钟;④将 3.6ml 的去离子水与 7.2ml 聚乙二醇 300(PEG, Polyethyleneglycol, 分子量为 300, 购自 Fluka 公司,产品编号: 90878, 美国)混匀,缓慢递加入正硅酸乙酯溶液中;⑤上述溶液经过 0.45 微米的滤膜过滤;⑥上述溶液用缓冲液( $0.16\text{g}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $0.293\text{g}$   $\text{NaHCO}_3$ , 加水定容到 100ml, pH9.6)稀释 10 倍后备用。

[0036] (4)H5N1 病毒的增殖

[0037] 病毒株为 [A/Anhui/1/2005(H5N1)](参见文献[董婕,张红,刘运芝等. 中国大陆首例人感染高致病性禽流感病毒(H5N1)病例的实验室诊断. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 20:(2):14-16]),选用 10-11 日龄的鸡胚,画出气室和胚位,在气室接近胚位处涂抹

碘酊和酒精进行消毒后,用钢锥穿一小孔,随后将注射器针头沿此小孔插入 0.5-1.0cm 处(避开血管),注入 0.1-0.2ml 接种物。最后用石蜡封口,并置孵卵箱中孵育。每天翻卵并检卵一次。24 小时内死亡者废弃。培养 42 小时后,收集尿囊腔液体,4000rpm,离心 40 分钟,收集上清,100000g 离心,2h,收集沉淀,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)重悬,储存备用。

[0038] (5)H5N1 单克隆抗体参见文献[詹爱军,王新卫,陈枝楠等.抗 H5 亚型 AIV 血凝素单克隆抗体的制备及亚型鉴定.畜牧兽医医学,2008,24:(6):8-11]),抗体名称为 H5N1 单克隆抗体。

[0039] (6)分子马达生物传感器的芯片及试剂盒制备:2 $\mu$ l,0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l 的载色体(Chromatophores)(带有分子马达),0.25 $\mu$ l 制备的 sol-gel 溶液(可按照本领域已知的方法或本说明书中以下实施例中描述的方法制备),与 48 $\mu$ l 缓冲液(0.16g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,NaHCO<sub>3</sub> 0.293g,加水定容到 100ml, pH9.6)混合,滴在直径为 0.5cm 的圆形滤纸上(Whatman 公司,产品编号:1450090,英国),室温干燥 12 小时备用。滤纸上滴加 30 $\mu$ l,0.12 $\mu$ M 生物素化的分子马达  $\epsilon$  亚基多抗,37 $^{\circ}$ C 连接 60 分钟,加 100 $\mu$ l 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)洗涤 1 次;加 30 $\mu$ l,0.6 $\mu$ M 亲和素,室温连接 5 分钟,加 100 $\mu$ l 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)洗涤 1 次;加 35 $\mu$ l,0.18 $\mu$ M 生物素化的病毒蛋白抗体,室温连接 5 分钟,加 100 $\mu$ l 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)洗涤 2 次,室温干燥 12 小时备用。圆形滤纸置于 96 孔 ELISA 过滤型微孔板上,该 96 孔 ELISA 过滤性微孔板即为本发明中的试剂盒。

[0040] 相对于常规抗原抗体结合的分子扩散、结合的过程,纳米生物技术在病毒快速灵敏检测领域体现出强劲的活力,构建纳米生物传感器,利用纳米生物机器旋转的特性,将抗体连接到分子马达上,旋转的抗体在溶液体系中运动,从而实现抗体对待测抗原的动态捕捉,大大缩短抗原抗体的结合时间,并提高检测的效率,灵敏度较传统方法显著提高。

[0041] 鉴于流感病毒(H5N1、H1N1)、艾滋病(HIV)是危险全球人类健康的重大传染性疾病,因此对病毒蛋白的快速灵敏检测对该类疾病的预防及早期治疗具有重要意义,因此本发明构建的 ATP 马达旋转式生物传感器具有广阔的国内外应用前景及巨大的市场价值,是纳米生物机器与传统抗原抗体检测技术结合之后的一个较大的技术突破,潜在的用户包括各大中型医院的检验科,海关进出口检验检疫部门,产品投入使用后将产生直接的经济效益。以艾滋病毒 P24 蛋白检测试剂盒为例,进口的试剂盒(100 人份)价格为约 1 万元,而按成本计算,本发明中生产的试剂盒(100 人份)估算成本为 50 元,以批发价格 500 元计算,利润空间很大。在社会作用方面,纳米生物传感器的广泛应用,将实现病毒性疾病的快速检测,有效遏制 H1N1、SARS 等病毒性疾病的爆发流行,对 HIV 等传染病也能实现早期快速诊断,为疾病防控提供依据,早期发现携带者,保护易感人群,具有很大的社会效益。

[0042] 发明详述

[0043] 本发明是对中国专利申请号 200410098929.9(公开日:2006 年 6 月 21 日,CN1789425,已授权)的进一步改进,区别在于 4 个方面:

[0044] 第一,在本发明中,抗原抗体的结合[捕获体(病毒蛋白抗体)与抗原的结合]与分子马达旋转启动与测定是同时进行的,即边转边测,而前一专利中,抗原抗体的结合[捕获体(病毒蛋白抗体)与抗原的结合]与分子马达旋转的启动是分两步进行的,即先结合再检测;显然,本发明的检测时间大大缩短,而且捕获抗体随着分子马达旋转,实现了对抗原分子的动态主动捕捉,提高了检测灵敏度。

[0045] 第二,在本发明中,捕获抗体(第二抗体)通过连接成分与分子马达的  $\epsilon$  亚基连接,而前一专利是连接在  $\beta$  亚基上,相对于  $\beta$  亚基的上下局部运动而言, $\epsilon$  亚基位于分子马达转动的核心轴上,其运动是  $360^\circ$  的全旋转,因此当捕获抗体与抗原结合,引起分子马达转动的负荷改变时,这种生物传感器对信号分子更敏感;

[0046] 第三,在本发明中,采用了荧光淬灭技术,即 ATPase 合成产物 ATP 可以作为荧光淬灭剂(图 1),而 ATPase 旋转过程中泵出膜外的质子也可以引起膜外荧光的减弱 [Cui Yuanbo, Zhang Fan, Yue Jiachang, 等. 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. Analytical Biochemistry, 2005, 344(1):102-107], 起到双淬灭的协同效应;

[0047] 第四,在本发明中,驱动分子马达旋转的能量来自于 ATP 的生物化学能,而不是前一专利中的光能转化为质子梯度,然后驱动分子马达旋转,即以化学能驱动代替光能光驱;

[0048] 第五,在本发明中,引入了 sol-gel 技术,即溶胶-凝胶法,以正硅酸乙酯和聚乙二醇(PEG300)的反应产物增加分子马达生物芯片的稳定性,不易被洗脱,铺设的产品表面更加均匀,提高了产品的均一性。

[0049] 第六,试剂盒制备:将  $2\mu\text{l}$ ,  $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的 chromatophores(带有分子马达),  $0.25\mu\text{l}$  制备的 sol-gel 溶液,与  $48\mu\text{l}$  缓冲液( $0.16\text{g Na}_2\text{CO}_3$ ,  $0.293\text{g NaHCO}_3$ , 加水定容到  $100\text{ml}$ ,  $\text{pH}9.6$ )混合,滴在直径为  $0.5\text{cm}$  的圆形滤纸上(Whatman 公司,产品编号:1450090,英国),圆形滤纸置于 96 孔 ELISA 过滤型微孔板上,室温干燥 12 小时备用。滤纸上滴加  $30\mu\text{l}$ ,  $0.12\mu\text{M}$  分子马达  $\epsilon$  亚基多抗,  $37^\circ\text{C}$  连接 60 分钟,加  $100\mu\text{l}$  磷酸盐缓冲液(PBS,  $\text{pH}7.4$ )洗涤 1 次;加  $30\mu\text{l}$ ,  $0.6\mu\text{M}$  亲和素,室温连接 5 分钟,加  $100\mu\text{l}$  磷酸盐缓冲液(PBS,  $\text{pH}7.4$ )洗涤 1 次;加  $35\mu\text{l}$ ,  $0.18\mu\text{M}$  生物素化的病毒蛋白抗体,室温连接 5 分钟,加  $100\mu\text{l}$  磷酸盐缓冲液(PBS,  $\text{pH}7.4$ )洗涤 2 次,室温干燥 12 小时备用。圆形滤纸置于 96 孔 ELISA 过滤型微孔板上,该 96 孔 ELISA 过滤性微孔板即为本发明中的试剂盒。

[0050] 本发明内容的要点:(1)变两步法为一步法,即前一专利为捕获抗体与病毒蛋白结合,然后加入 ADP 合成启动缓冲液,启动分子马达旋转,本发明为一步法,边转变测,即捕获抗体与病毒蛋白的结合的同时,启动分子马达旋转,缩短检测时间;(2)捕获抗体是通过连接体系与分子马达的  $\epsilon$  亚基结合,检测的灵敏度进一步提高;(3)驱动分子马达旋转的能量供应体系由前一专利的光能转化的质子梯度差驱动变为生物化学能驱动,使用前不用光照贮能,使用上更为方便;(4)ATP 和质子对荧光的双淬灭效应;(5) sol-gel 对试剂盒加工的稳定作用。

[0051] 以下对本发明的技术方案做进一步详细阐述。应当指出,本发明的各实施方案可以根据需要以任何方式组合。

[0052] 在本发明的一个实施方案中,提供一种纳米生物传感器(一种生物载色体体系),其包括载色体(chromatophore, 脂囊泡),该载色体上含有分子马达  $F_0F_1$ -ATPase, 所述  $F_0F_1$ -ATPase 的  $\epsilon$  亚基上连接有捕获抗体。

[0053]  $F_0F_1$ -ATP 合酶是由多亚基组成的复合体,包括膜内的  $F_0$  部分,基本组成是  $ab_2c_n$ ;膜外亲水  $F_1$  部分亚基的基本组成是  $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon\delta$ 。这两部分分别由 2 个柄连接:中心的柄为

$\gamma \epsilon$  复合物,连接  $F_1$  的  $\alpha_3\beta_3$  亚基和  $F_0$  的 c 亚基;偏心柄为插入膜区的 a 亚基与膜外  $b_2$  亚基,  $b_2$  的另一端与  $\delta$  亚基的 C 端连接,而  $\delta$  亚基的 N 端与  $F_1$  部分  $\alpha$  亚基连接(图 2)。

[0054] 本发明通过生物工程技术将  $\epsilon$  亚基与病毒蛋白的捕获抗体连接,当捕获抗体捕获到病毒蛋白时,分子马达的负荷改变,引起分子马达的旋转改变,即不同的分子马达负荷对应不同的旋转速度,从而对应不同的膜外质子浓度,而膜外的荧光染料(F-DHPE)对 pH 值敏感,因此不同的质子浓度会呈现不同的荧光强度。因此可充分利用  $F_0F_1$ -ATP 合酶这一旋转分子马达的特性,广泛应用于生物传感器等领域。

[0055] 在本发明的在另一个实施方案中,不同的病毒蛋白抗体可以捕获对应的病毒蛋白,从而通过改变不同的捕获抗体,可以对多种病毒蛋白进行快速灵敏检测。

[0056] 在本发明的另一个实施方案中,本发明提供一种试剂盒,该试剂盒包含:根据本发明的纳米生物传感器,以及稀释抗原、启动分子马达旋转的二合一缓冲液。

[0057] 鉴于 H5N1 致死性禽流感 and 大量传染性病毒性疾病(人与人之间传播的 H1N1 北美流行株、HIV 等)对公共健康的严重危险,对社会、经济的重大危害,而目前的检测手段要么耗时较长(核酸检测),要么灵敏度不够(传统 ELISA 法,胶体金法),因此本发明构建的能快速灵敏检测病毒蛋白的纳米生物传感器具有广阔的国内外应用前景及巨大的市场价值,是纳米生物机器在传感器及病毒检测领域的一个较大的技术突破,潜在的用户包括各大中型医院的检验科、海关进出口检验检疫部门、各级卫生防疫部门及机关、学校的卫生室,产品投入使用后将产生直接的经济效益和巨大的社会效益。

#### 附图说明

[0058] 图 1 是 ATP 对 F-DHPE 荧光淬灭的剂量 - 效应关系示意图;

[0059] 图中曲线由上至下,分别代表 ATP 浓度为 0mM, 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM, 2.0mM, 2.5mM, 3.0mM, 3.5mM, 而最下方的一条水平线代表体系荧光本底值。结果显示,随着反应体系中 ATP 浓度的逐步升高,纳米生物传感器标记的 F-DHPE 荧光强度依次下降,呈现出剂量 - 效应关系,这就是 ATP 对纳米生物传感器标记的 F-DHPE 荧光的淬灭效应。

[0060] 图 2 是分子马达的 ( $F_0F_1$ -ATP 合酶) 生物传感器示意图;

[0061]  $F_0F_1$ -ATP 合酶是由多亚基组成的复合体,包括膜内的  $F_0$  部分,基本组成是  $ab_2c_n$ ;膜外亲水  $F_1$  部分亚基的基本组成是  $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon\delta$ 。这两部分分别由 2 个柄连接:中心的柄为  $\gamma\epsilon$  复合物,连接  $F_1$  的  $\alpha_3\beta_3$  亚基和  $F_0$  的 c 亚基;偏心柄为插入膜区的 a 亚基与膜外  $b_2$  亚基,  $b_2$  的另一端与  $\delta$  亚基的 C 端连接,而  $\delta$  亚基的 N 端与  $F_1$  部分  $\alpha$  亚基连接(图 2)。

[0062] 图 3 是分子马达的 ( $F_0F_1$ -ATP 合酶) 生物传感器荧光标记示意图;

[0063] 分子马达是一种理想的纳米动力装置。分子马达中,可转动部分为  $\gamma\epsilon$  和  $c_n$ ,可方便的进行工程化改造,例如在  $\epsilon$  亚基上接上各种病毒蛋白的捕获抗体,那么可充分利用  $F_0F_1$ -ATP 合酶这一旋转分子马达的特性,广泛应用于病毒快速检测。当捕获抗体捕获到病毒蛋白时,分子马达的负荷改变,引起分子马达的旋转改变,即不同的分子马达负荷对应不同的旋转速度,从而对应不同的膜外质子浓度,而膜外的荧光染料(F-DHPE)对 pH 值敏感,因此不同的质子浓度会呈现不同的荧光强度(图 3)。因此可充分利用  $F_0F_1$ -ATP 合酶这一旋转分子马达的特性,广泛应用于生物传感器等领域。

[0064] 图 4 是纳米生物传感器对致死型禽流感 H5N1 的实时动态检测(样本例数 = 7);



注：图中上部线条代表病毒组荧光变化曲线；下部线条代表对照组荧光变化曲线，结果显示，随着时间的延长，病毒组荧光下降速度明显慢于对照组，其机理为病毒组中分子马达上连接的捕获抗体与病毒蛋白粒子结合后，旋转分子马达的负荷增大，分子马达旋转速度下降，其对质子的转运速度减慢，而对 pH 敏感的荧光染料的荧光强度变化速度减慢；

[0065] 图 5 是 ADP 对纳米生物传感器的启动效应（样本例数 = 3）；注：图中黑色线条代表 0mM ADP 组荧光变化曲线；红色线条代表 2mM ADP 组荧光变化曲线；蓝色线条代表 4mM ADP 组荧光变化曲线。结果显示，随着时间的延长，随着反应体系中 ADP 浓度的逐步升高，高浓度 ADP 组荧光下降速度明显快于对照组，其机理为反应底物（ADP）浓度在一定范围内的增加，启动了纳米生物传感器核心组件分子马达活性的增加，这就是 ADP 对纳米生物传感器的启动效应。

[0066] 图 6 是分子马达生物传感器对致死型禽流感 H5N1 的实时动态检测的组间比较（样本例数 = 7）（注：方差齐性检验，方差齐（Levene statistic 统计检验量为 0.625,  $P = 0.445$ ），对照组与 H5N1 病毒组的组间差异具有显著性， $t = 7.972$ ,  $P < 0.05$ 。表中数据为检测荧光强度的下降率（%）。病毒组中的病毒浓度为 1000 个病毒蛋白粒子 / 微升。对照组与 H9N2 病毒组的组间差异不具有显著性）。

[0067] 图 7 是显示 H5N1 病毒蛋白浓度与检测荧光强度的剂量效应关系（注：方差齐性检验，总体方差齐（Levene statistic 统计检验量为 0.440,  $P = 0.725$ ），总体方差具有显著性差异， $F = 15.763$ ,  $P < 0.05$ ，组间差异的方差比较采用 LSD 法，结果显示各病毒组与对照组比较差异均有显著性。表中数据为荧光扫描仪 96 孔板扫描测定荧光强度。高浓度组（100000 个病毒蛋白粒子 / 孔）；中浓度组（10000 个病毒蛋白粒子 / 孔）；低浓度组（1000 个病毒蛋白粒子 / 孔）；对照组无病毒蛋白粒子。样本例数为： $N = 12$ ）。

## 具体实施方式

[0068] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步的详细描述，但不应理解为是对本发明进行限定。

[0069] 本发明的目的是通过下面的技术方案实现的：

[0070] 1. 分子马达及光合作用的复合物（Chromatophores）制备

[0071] 载色体（Chromatophores）的制备与前一专利（中国专利申请号 200410098929.9）不同之处在于本发明中的载色体为嗜热菌载色体（chromatophores），与前一专利中的光合菌载色体相比，本发明中的载色体活性更好，稳定性更好，其制备方法为：培养嗜热菌（*Thermomicrobium roseum*, (ATCC27502) 商购于美国 ATCC 菌种保藏中心）。

[0072] 培养基：1 升水中加入 Yeast extract 1.0g, Tryptone 1.0g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.247g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.28g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.074g,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.019g, 盐溶液 1ml。盐溶液配方为  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.8g,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  4.4g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.22g,  $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.05g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.03g,  $\text{VSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.03g, 用  $\text{H}_2\text{SO}_4$  调 pH 至 2.0。高压灭菌 15 分钟。

[0073] 收获：细菌的培养温度为 60℃，摇床转速为 120 转 / 分，培养 24 小时，6000g 离心收集。

[0074] 载色体（Chromatophores）的提取：将以上收集的细菌用缓冲液（20mM, Tris-HCl, 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐）pH 8.0, 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 100mM NaCl, 10% 甘油）洗涤一次，然后再加

入 20ml 的上述缓冲液,悬浮后,超声(20%振幅, Cole Parmer CPX 600 超声仪 13<sup>#</sup> 探头), 超声 5 秒, 停 8 秒, 超声有效时间为 8 分钟, 用上述缓冲液洗涤一次。180,000g 在 4℃ 离心 90 分钟沉淀为载色体 (Chromatophores)。

[0075] 2. F-DHPE 标记载色体 (chromatophore)

[0076] 360  $\mu$  l, 0.5  $\mu$  g/ $\mu$  l 载色体 (chromatophore) (带有分子马达的脂囊泡), 加入 0.1mM 540  $\mu$  l 的 Tricine (三(羟甲基)甲基甘氨酸, Amresco 进口分装) (pH = 8.0), 充分混匀, 加入 40  $\mu$  l, 1mg/ml 的 F-DHPE (荧光探针, 购自美国 Invitrogen 公司, 产品名: fluorescein-DHPE [N-(fluorescencein-5-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphorethanolamine, triethylammonium salt, 产品编号: 445395), 室温摇床上放置 60 分钟, 离心去掉游离的 F-DHPE, 14,000rpm, 30 分钟, 洗 1 遍, 重悬于 400  $\mu$  l, 0.1mM 的 Tricine (pH = 6.5), 备用。

[0077] 3. sol-gel 溶液 (溶胶-凝胶法) 制备: ①将 15.2ml 正硅酸乙酯 (购自国药集团化学试剂有限公司, 产品编号: 80124192) 和 80 微升 0.07N HCl 依次加入 3.6ml 去离子水; ②将之置于冰浴上搅拌 10 分钟; ③室温超声 20 分钟; ④将 3.6ml 的去离子水与 7.2ml 聚乙二醇 300 (PEG, Polyethyleneglycol, 分子量为 300, 购自 Fluka 公司, 产品编号: 90878, 美国) 混匀, 缓慢递加入正硅酸乙酯溶液中; ⑤上述溶液经过 0.45 微米的滤膜过滤; ⑥上述溶液用缓冲液 (0.16g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  0.293g, 加水定容到 100ml, pH9.6) 稀释 10 倍后备用。

[0078] 4. 分子马达生物传感器的芯片及试剂盒制备: 2  $\mu$  l, 0.5  $\mu$  g/ $\mu$  l 的 chromatophores (带有分子马达), 0.25  $\mu$  l 制备的 sol-gel 溶液, 与 48  $\mu$  l 缓冲液 (0.16g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  0.293g, 加水定容到 100ml, pH9.6) 混合, 滴在直径为 0.5cm 的圆形滤纸上 (Whatman 公司, 产品编号: 1450090, 英国), 室温干燥 12 小时备用。滤纸上滴加 30  $\mu$  l, 0.12  $\mu$  M 生物素化的分子马达  $\epsilon$  亚基多抗, 37℃ 连接 60 分钟, 加 100  $\mu$  l 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4) 洗涤 1 次; 加 30  $\mu$  l, 0.6  $\mu$  M 亲和素, 室温连接 5 分钟, 加 100  $\mu$  l 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4) 洗涤 1 次; 加 35  $\mu$  l, 0.18  $\mu$  M 生物素化的病毒蛋白抗体 (单克隆或多克隆抗体), 室温连接 5 分钟, 加 100  $\mu$  l 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4) 洗涤 2 次, 室温干燥 12 小时备用。圆形滤纸置于 96 孔 ELISA 过滤型微孔板上, 该 96 孔 ELISA 过滤性微孔板即为本发明中的试剂盒。

[0079] 本发明的分子马达应用于病毒蛋白检测包括以下步骤:

[0080] (1) 嗜热载色体的制备: 对嗜热菌进行加工处理, 得到载色体, 其上带有  $F_0F_1$ -ATP 酶;

[0081] (2) 病毒抗体与分子马达进行连接。

[0082] 实施例 1 纳米生物传感器的组装

[0083] 1. F-DHPE 标记载色体 (chromatophore)

[0084] 360  $\mu$  l, 0.5  $\mu$  g/ $\mu$  l 载色体 (chromatophore) (带有分子马达的脂囊泡), 加入 0.1mM 540  $\mu$  l 的 Tricine (三(羟甲基)甲基甘氨酸, Amresco 进口分装) (pH = 8.0), 充分混匀, 加入 40  $\mu$  l, 1mg/ml 的 F-DHPE (荧光探针, 购自美国 Invitrogen 公司, 产品名: fluorescein-DHPE [N-(fluorescencein-5-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphorethanolamine, triethylammonium salt, 产品编号: 445395), 室温摇床上放置

60 分钟,离心去掉游离的 F-DHPE,,14,000rpm,30 分钟,水洗 1 遍,重悬于 400  $\mu$ l,0.1mM 的 Tricine(pH = 6.5),备用。

[0085] 2. 纳米生物传感器安装病毒蛋白捕获抗体

[0086] 2  $\mu$ l,0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l 的 chromatophores(带有分子马达)与 48  $\mu$ l 缓冲液(缓冲液制备:0.16g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  0.293g,加水定容到 100ml, pH9.6)混合,滴在直径为 0.5cm 的圆形滤纸上(Whatman 公司,美国),室温干燥 12 小时备用。滤纸上滴加 30  $\mu$ l,0.12  $\mu$ M 分子马达  $\epsilon$  亚基多抗,37 $^\circ\text{C}$ 连接 60 分钟,加 100  $\mu$ l 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)洗涤 1 次;加 30  $\mu$ l,0.6  $\mu$ M 亲和素,室温连接 5 分钟,加 100  $\mu$ l 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)洗涤 1 次;加 35  $\mu$ l,0.18  $\mu$ M 生物素化的病毒蛋白抗体(抗 H5N1 病毒的 HA1 蛋白的单克隆抗体,参见文献[詹爱军,王新卫,陈枝楠等.抗 H5 亚型 AIV 血凝素单克隆抗体的制备及亚型鉴定.畜牧兽医医学,2008,24:(6):8-11]),室温连接 5 分钟,加 100  $\mu$ l 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)洗涤 2 次。

[0087] 3. sol-gel 溶液(溶胶-凝胶法)制备:①将 15.2ml 正硅酸乙酯(购自国药集团化学试剂有限公司,产品编号:80124192)和 80 微升 0.07N HCl 依次加入 3.6ml 去离子水;②将之置于冰浴上搅拌 10 分钟;③室温超声 20 分钟;④将 3.6ml 的去离子水与 7.2ml 聚乙二醇 300(PEG, Polyethyleneglycol, 分子量为 300, 购自 Fluka 公司, 产品编号:90878, 美国)混匀,缓慢递加入正硅酸乙酯溶液中;⑤上述溶液经过 0.45 微米的滤膜过滤;⑥上述溶液用缓冲液(缓冲液制备:将 0.16g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  0.293g,加水定容到 100ml, pH9.6)稀释 10 倍后备用。

[0088] 4. 分子马达生物传感器的芯片及试剂盒制备:2  $\mu$ l,0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l 的 chromatophores(带有分子马达),0.25  $\mu$ l 制备的 sol-gel 溶液,与 48  $\mu$ l 缓冲液(缓冲液制备:将 0.16g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  0.293g,加水定容到 100ml, pH9.6)混合,滴在直径为 0.5cm 的圆形滤纸上(Whatman 公司,产品编号:1450090,英国),室温干燥 12 小时备用。滤纸上滴加 30  $\mu$ l,0.12  $\mu$ M 生物素化的分子马达  $\epsilon$  亚基多抗,37 $^\circ\text{C}$ 连接 60 分钟,加 100  $\mu$ l 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)洗涤 1 次;加 30  $\mu$ l,0.6  $\mu$ M 亲和素,室温连接 5 分钟,加 100  $\mu$ l 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)洗涤 1 次;加 35  $\mu$ l,0.18  $\mu$ M 生物素化的病毒蛋白抗体,室温连接 5 分钟,加 100  $\mu$ l 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)洗涤 2 次,室温干燥 12 小时备用。圆形滤纸置于 96 孔 ELISA 过滤型微孔板上,该 96 孔 ELISA 过滤性微孔板即为本发明中的试剂盒。

[0089] 实施例 2 纳米生物传感器对致死型禽流感 H5N1 的实时动态检测

[0090] 人类致死型禽流感病毒 H5N1 病毒 [A/Anhui/1/2005(H5N1)](商购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所,参见文献[董婕,张红,刘运芝等.中国大陆首例人感染高致病性禽流感病毒(H5N1)病例的实验室诊断.中华实验和临床病毒学杂志,2006,20:(2):14-16])或 H9N2 病毒液 [A/Chicken/Shandong/6/1996](商购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所,参见文献[Zhang Yun, Deng Zhengtao, Yue Jiachang,等.Using cadmiumtelluride quantum dots as a proton flux sensor and applying to detect H9 avianinfluenza virus.Analytical Biochemistry,2007,364(2):122-127])(鸡胚培养液),经 ATP 合成缓冲液(1mM Tricine,10%甘油,5mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,5mM  $\text{MgCl}_2$ , pH8.0)倍比稀释,终浓度为 10000 个病毒粒子/微升的病毒溶液。将实施例 1 中制备的本发明的试剂盒

用于该病毒检测,将上述病毒溶液加入所述试剂盒,37℃反应5分钟,荧光扫描仪(型号:Fluoroskan Ascent,厂家:Thermo Labsystems,美国)96孔板扫描测定荧光强度,实时记录反应体系的荧光强度变化过程(图4)。本实验中使用了ADP和NADH双启动。ADP的启动效果见图5,由图5可见,反应体系中增加了ADP后,荧光强度变化幅度均发生了明显增加,其中,在反应体系中增加了4mMADP后,荧光强度变化比值与没有加入ADP的样品相比,增加了2.4倍。

[0091] 以没有加入病毒粒子的样品作为对照组,与对照组(对照组组成为:1mM Tricine,10%甘油,5mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,5mM  $\text{MgCl}_2$ , pH8.0)比较,病毒蛋白组荧光强度更高,组间差异具有显著性(图6)。

[0092] 实施例3 纳米生物传感器对致死型禽流感H5N1的快速灵敏检测

[0093] 人类致死型禽流感病毒H5N1病毒液[A/Anhui/1/2005(H5N1)](鸡胚培养液),经ATP合成缓冲液(1mM Tricine,10%甘油,5mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,5mM  $\text{MgCl}_2$ , pH8.0)倍比稀释,终浓度为3个梯度,分别为1000个病毒粒子/孔、1000个病毒粒子/孔、10000个病毒粒子/孔。将实施例1中制备的本发明的试剂盒用于该病毒检测,将上述病毒溶液加入所述试剂盒,37℃反应5分钟,荧光扫描仪(型号:Fluoroskan Ascent,厂家:Thermo Labsystems,美国)96孔板扫描测定荧光强度,对照组(对照组组成为:1mM Tricine,10%甘油,5mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,5mM  $\text{MgCl}_2$ , pH8.0)不含病毒蛋白粒子。检测结果呈剂量-效应关系,即随着病毒浓度依次增加,检测样品的荧光强度依次上升。统计结果见图7。

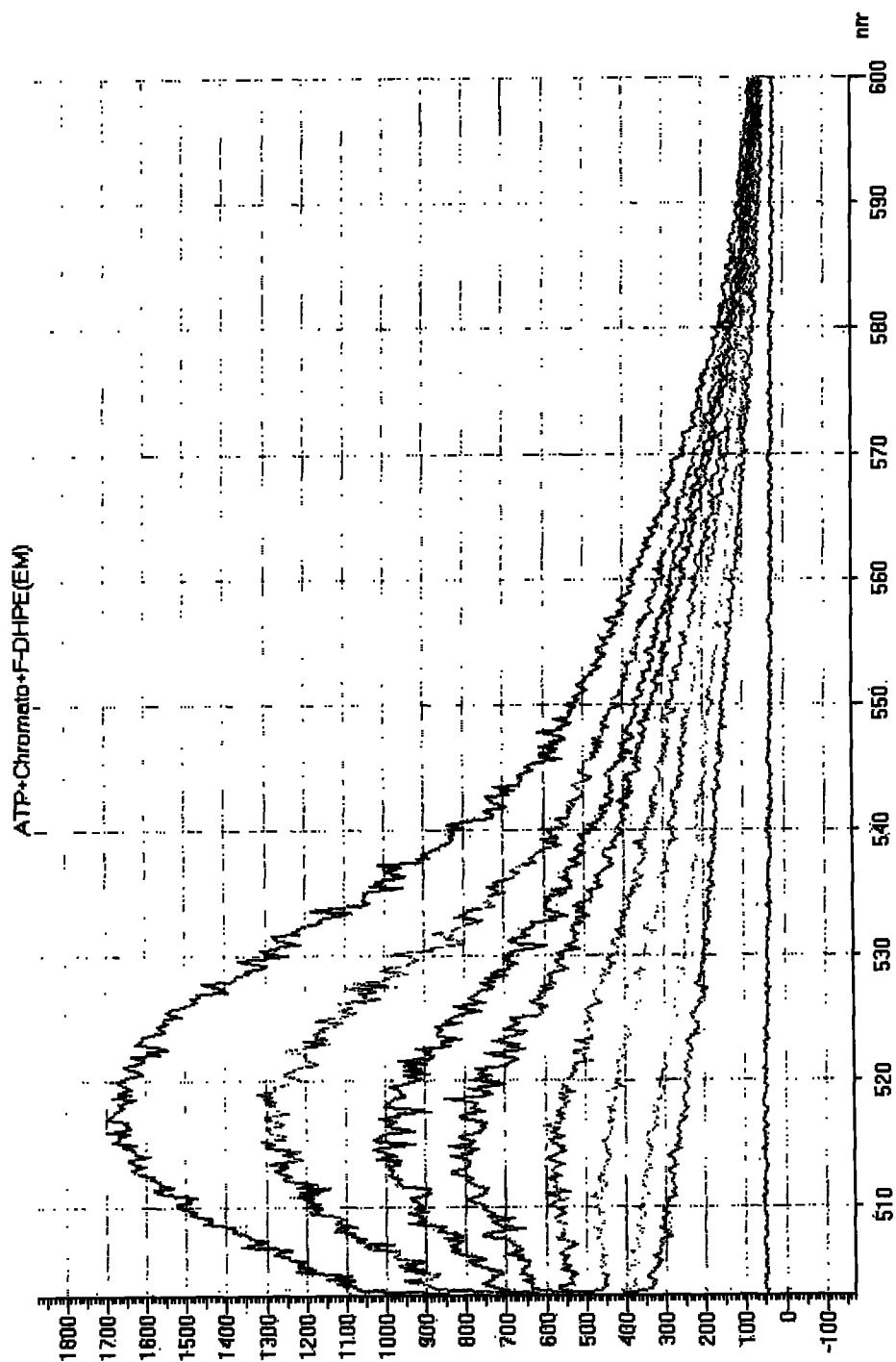


图 1

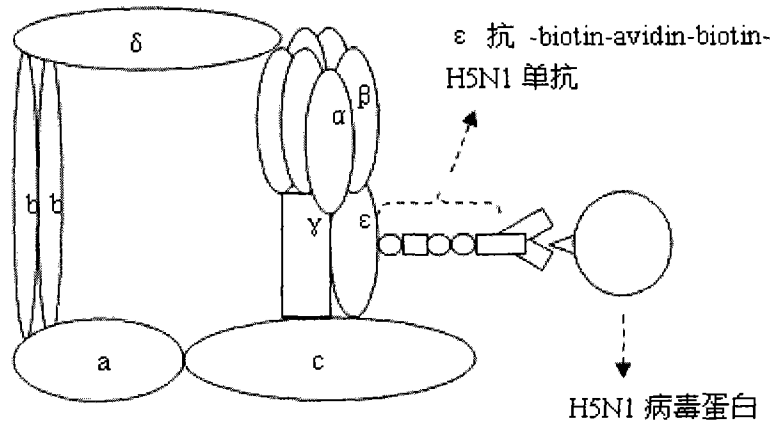


图 2

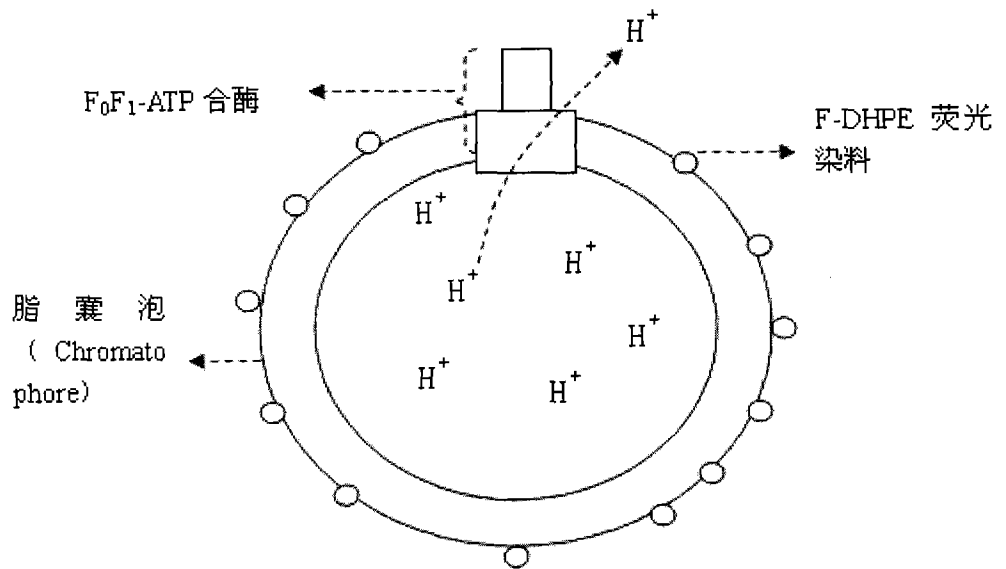


图 3

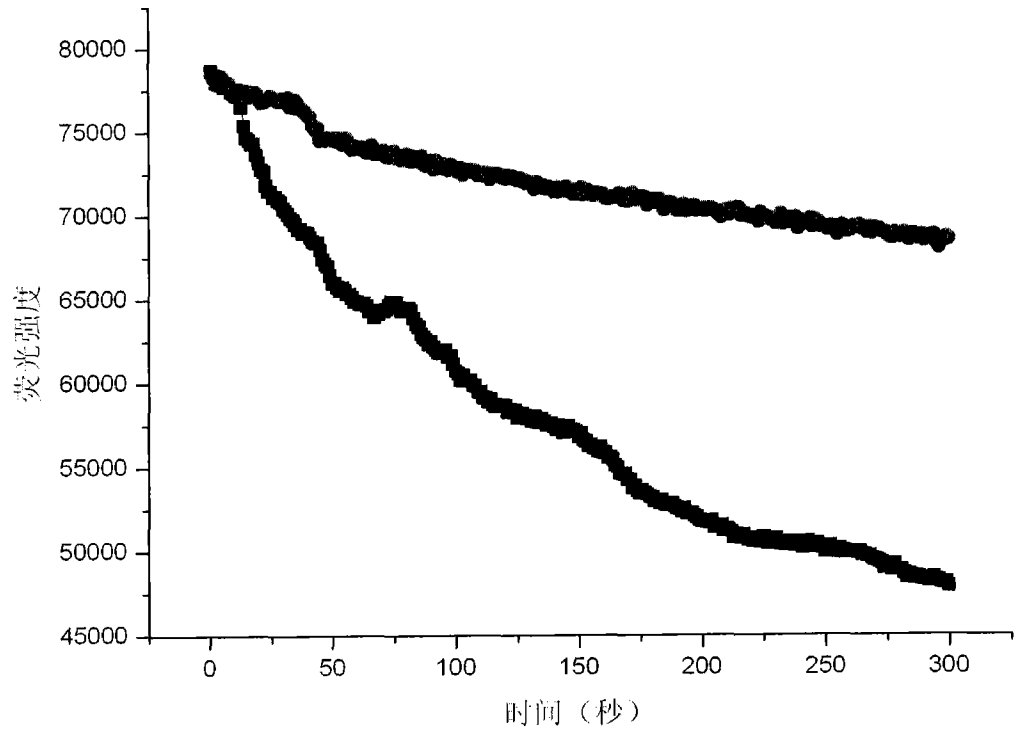


图 4

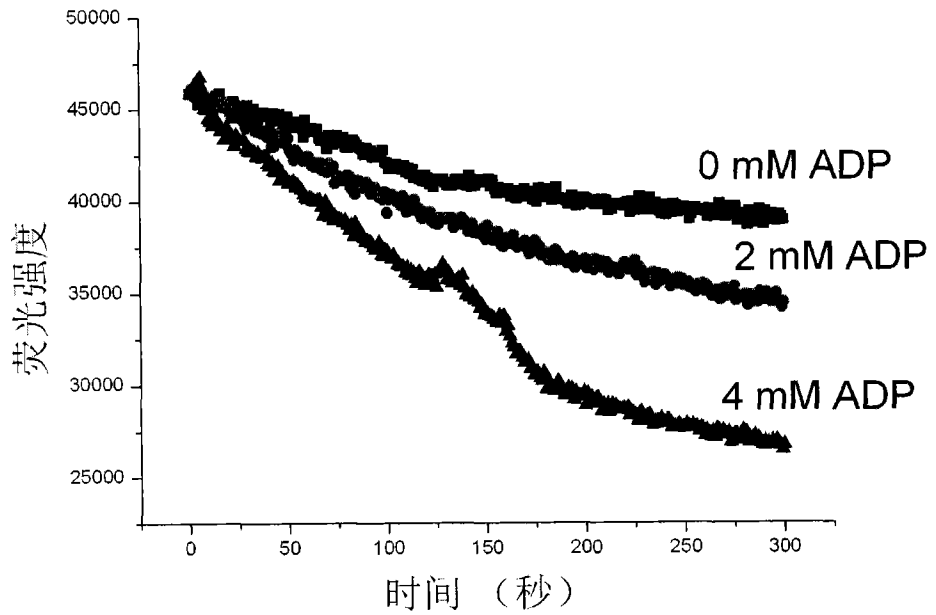


图 5

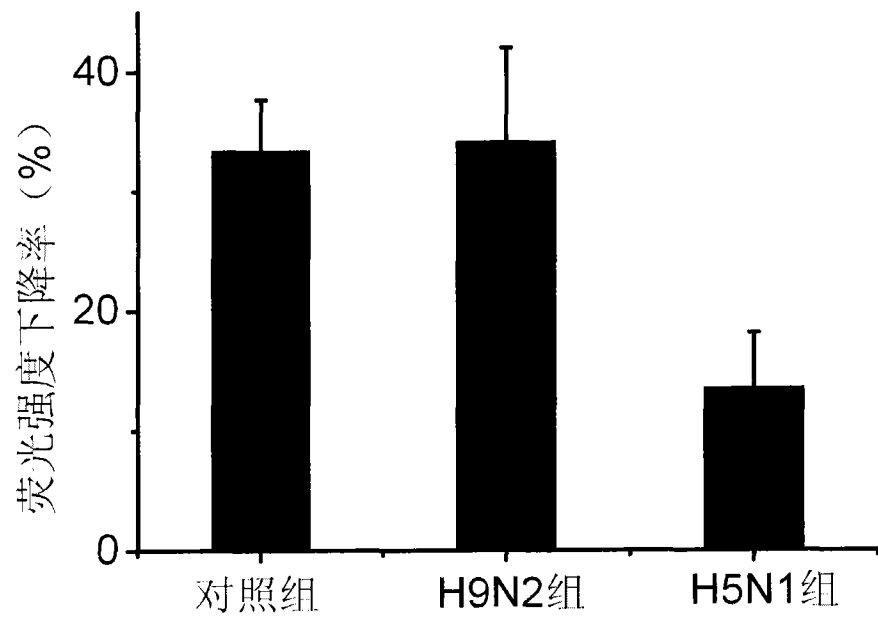


图 6

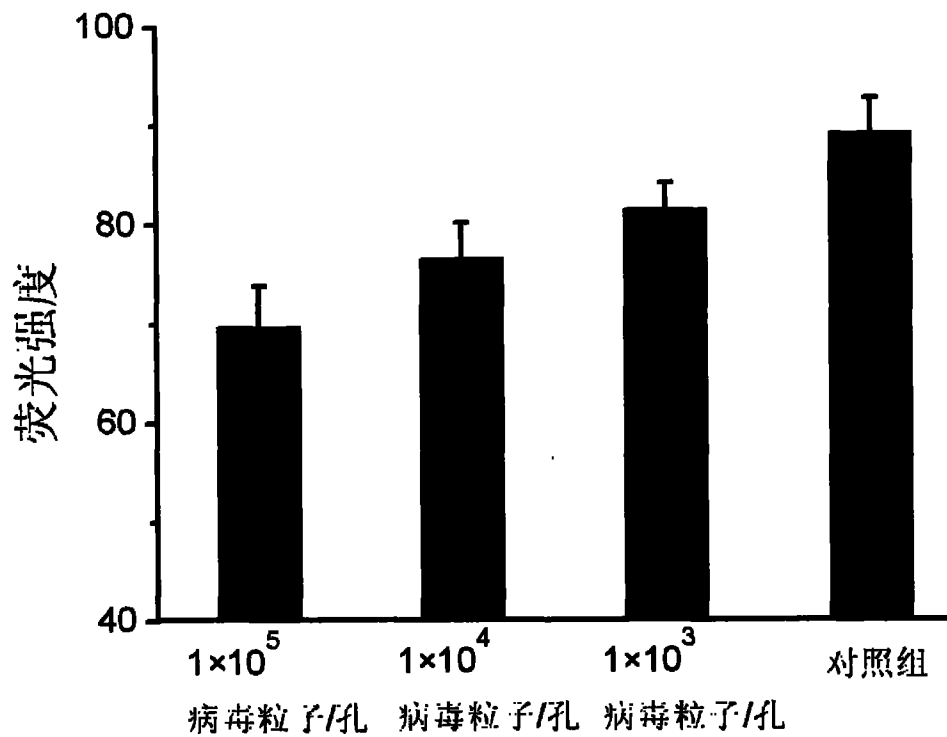


图 7