

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510011849. X

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 12 月 6 日

[11] 公开号 CN 1873416A

[22] 申请日 2005. 6. 2

[21] 申请号 200510011849. X

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路 15 号

[72] 发明人 靳 刚 应佩青 阎锡蕴 戚 智

杭海英 马克·巴特勒姆 毕利军

梁 伟 胡坤生 曹恩华

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 程金山

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 3 页

[54] 发明名称

探针 - 离子通道分子传感器

[57] 摘要

本发明公开了一种新型分子传感器以及其在肿瘤早期检测中的应用。此方法利用自然界生物分子的识别特异性和离子通道对单分子信号的传递和放大功能,集感应、传递、放大于一身。该分子传感器的制备方法包括:对特异探针和离子通道的定向改造;利用分子进化方法实现二者的功能耦合;构建探针-离子通道分子传感器。这种分子传感器能够选择性地捕获单分子信号,通过分子内部的信号传递机制,直接触发离子通道打开,并释放离子(亿个/秒),实现单分子信号放大的可视化。这项创新技术能够将现有的检测灵敏度从纳克级提高到皮克级或更低的痕量。探针-离子通道偶联技术平台可通过更换不同的探针头实现对不同样品的检测,具有广泛的应用性。

1. 一种探针-离子通道分子传感器，其是通过下列步骤制备：
 - A. 特异探针蛋白和信号放大蛋白的定向改造与优化；
 - B. 人工进化法获得抗体-离子通道耦合体；
 - C. 生物传感器纳米功能器件的组装、表征及应用。
2. 根据权利要求 1 的探针-离子通道分子传感器，其中在步骤 A) 中包括：
 - 1) 肿瘤特异性探针分子的筛选；
 - 2) 探针分子和信号放大元件的优化；
 - 3) 探针分子尺度的改造。
3. 根据权利要求 1 的探针-离子通道分子传感器，其中在步骤 C) 中包括：
 - 1) 传感器纳米功能器件在人工脂膜上的组装；
 - 2) 生物传感器纳米功能器件的表征；
 - 3) 单分子传感器的信号识别和提取；
 - 4) 纳米生物传感器的应用试验。
4. 一种肿瘤早期检测试剂盒，其中包含根据权利要求 1 的探针-离子通道分子传感器。

探针-离子通道分子传感器

技术领域

本发明涉及纳米科技和生物技术领域，更具体地涉及特异探针蛋白和离子通道放大蛋白的获取与定向改造以及二者的耦合，实现分子组装的纳米生物传感器功能器件。

背景技术

目前具有代表性的实用化生物分子检测技术主要有三类：1) 分子识别荧光检测；2) 酶联免疫法 (ELISA)；3) 生物芯片。这些方法主要有标记操作烦琐，检测灵敏度低，易引起蛋白变性等缺陷从而限制了其广泛应用。目前有一些可达单分子检测水平的技术，主要代表为扫描探针显微镜 (如扫描电子显微镜、原子力显微镜、隧道扫描显微镜和近场光学显微镜等) 及高灵敏的光谱技术 (如表面增强拉曼光谱、荧光相关光谱 (Fluorescence Correlation Spectroscopy) 等)。这些物理技术手段依赖于复杂昂贵的大型仪器设备，纯化样品、技术要求很高的样品制备条件、精确的技术操控和较长的测量时间，才有可能获得单分子的检测，而且复现率很低。由于生物源样品往往是各种分子混杂的混合物，不可能事先纯化和进行复杂的样品制备，因此无法将此类技术用于生物传感器。

上世纪末，纳米技术的兴起使得超高灵敏度的生物传感技术成为可能，同时，新兴的生物学技术、微纳表征技术和微弱信号检测技术则为纳米生物传感器的发展提供了条件。纳米生物传感技术的特异性及单分子检测的能力激起科技和工业界的浓厚兴趣，成为研究热点。相继出现了量子点编码、活的导线、纳米探针等纳米生物分子传感器。按配基 (生物探针分子) 在基底的固定方式，可以将生物传感器分为零维 (如纳米粒子和量子点)，一维 (如纳米探针、线状 DNA、碳管、蛋白链)，二维 (平面型如 SPR, SELDI, BioChip 等)，三维 (立体型，如纳米空间活

性结构), 以及第四维的时间分辨。其中能够达到实用化程度的, 仅有发展较早的芯片式生物传感器。其普遍存在的问题是: 非特异性信号影响, 使得检测结果的复现性太低; 物理、化学等采样方法的灵敏度不足; 使用条件过于苛刻, 无法用于实际样品检测, 等。

针对以上问题, 我们发明了一种新型纳米生物传感器, 实现高特异识别和特异信号上万倍放大的新器件, 从根本上克服灵敏和非特异性之间的矛盾, 获得可以实现超微量和痕量生物源检测的目的。

发明内容

本发明利用探针蛋白的特异识别和离子通道的放大功能, 通过基因水平的分子操纵将探针蛋白与离子通道耦合, 构建探针-离子通道分子传感器(图 1)。

因此, 本发明的一个目的是提供一种探针-离子通道分子传感器, 其是通过下列步骤制备:

- A. 特异探针蛋白和信号放大蛋白的定向改造与优化;
- B. 人工进化法获得抗体-离子通道耦合体;
- C. 生物传感器纳米功能器件的组装、表征及应用。

在本发明的探针-离子通道分子传感器的一个优选实施方案中, 其中在步骤 A) 中包括:

- 1) 肿瘤特异性探针分子的筛选;
- 2) 探针分子和信号放大元件的优化;
- 3) 探针分子尺度的改造。

在本发明的探针-离子通道分子传感器的另一个优选实施方案中, 其中在步骤 C) 中包括:

- 1) 传感器纳米功能器件在人工脂膜上的组装;
- 2) 生物传感器纳米功能器件的表征;
- 3) 单分子传感器的信号识别和提取;
- 4) 纳米生物传感器的应用试验。

本发明还有另一个目的是提供上述探针-离子通道分子传感器在制备肿瘤早期检测试剂盒中的应用。提供一种肿瘤早期检测试剂盒, 其中包

含上述探针-离子通道分子传感器。

附图说明

图 1. 探针-离子通道生物传感器工作原理示意图。1-靶分子；2-探针分子；3-离子通道。从左至右 A. 探针-离子通道生物传感器定向组装在生物膜上，处于关闭状态；B. 探针分子选择性地与信号分子结合；C. 结合后产生分子构象变化，触发离子通道打开，大量离子流过通道，使单个分子信号上万倍放大，形成可视信号。

图 2. 非同源基因随机截短法及基因改组。抗体重链 cDNA 片断：第二不变区 (C2h)；乙酰胆碱受体 cDNA 片断：配体 (乙酰胆碱) 结合单元。

图 3. 用分子进化构建可调抗体-离子通道。

具体实施方式

下面结合附图对本发明作进一步详细阐述。

一. 特异探针蛋白和信号放大蛋白的定向改造与优化

1. 肿瘤特异性探针分子的筛选

针对特定的肿瘤特异性抗原，利用噬菌体展示技术和抗体库差异筛选技术，获得能特异、高亲和力识别肿瘤标志分子的抗体。并通过分子水平（如酶联免疫分析，蛋白质印迹杂交）、细胞水平（如免疫荧光、流式）、组织水平（如免疫组化）和活体动物试验，进一步确证探针分子的特异性。

2. 探针分子和信号放大元件的优化

利用随机突变，通过抗体可变区突变、链替换和 DNA 改组 (DNA shuffling) 等方法，获得大量抗体突变基因，建立抗体突变株表达文库，筛选特异性好、亲和力高的抗体株 (图 2)。

利用定向突变，在保证离子通道信号传递和放大功能的条件下，尽可能多地切除其信号感应区域，以降低空间位阻，获得有利于探针蛋白分子耦合的离子通道重组体。

3. 探针分子尺度的改造

利用抗体工程技术对抗体分子的尺度进行改造。例如利用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化天然抗体，形成只有重链及轻链可变区构成的仍保留抗原结合活性的分子，即 Fab 片断。也可利用基因工程技术，在大肠杆菌表达轻链和重链可变区，二者通过非共价键结合在一起便形成了 Fv。更进一步，设计连接肽（linker）将重链可变区与轻链可变区构建成融合蛋白，即为单链抗体（scFv），其正确折叠后亦能保留原完整抗体的抗原识别活性。更小尺度的抗体分子还有最小识别单位（MRU），也可以通过抗体工程方法制备。根据纳米生物传感器的要求，对探针蛋白的尺度利用抗体工程技术加以改造，选择合适的分子尺度，从而实现与信号放大元件的拼接。

二. 人工进化法获得抗体-离子通道耦合体

建立长短和序列均随机的连接肽库，将此随机肽库引入两个蛋白质单元之间形成耦联，构成杂合 cDNA 文库。用此文库转染细胞，使用流式细胞仪高通量筛选有功能的耦合体。这一新方法与现在已有方法的主要区别在于：（1）构建非同源不同功能蛋白单元的随机组合、随机突变 cDNA 库（图 3）。（2）用流式细胞仪对潜在的具有功能的杂和蛋白进行功能性筛选（图 4）。

三. 生物传感器纳米功能器件的组装、表征及应用

1. 传感器纳米功能器件在人工脂膜上的组装：通过静电诱导、疏水相互作用、共价修饰和特异性分子识别等手段改变蛋白与人工脂膜的作用方式、实现蛋白的定向装配，获得传感器功能的稳定的纳米组装器件。通过有机分子、生物活性分子等二维纳米活性材料在表面的组装，实现非特异结合的抑制和配基分子的定向组装,并使所装配的探针保持高生物活性，提高面式生物传感器的检测灵敏度。

2. 生物传感器纳米功能器件的表征：采用原子力显微镜、近场光学显微镜和膜片钳及荧光显微镜等技术手段，对生物单分子传感器进行结构和功能的表征。

3. 单分子传感器的信号识别和提取：采取多种手段，在单个离子通

道水平、单个细胞或小片膜水平上的传感器功能将采用膜片钳和原子力显微镜及近场光学显微镜技术表征;与包含离子的囊泡组装,采用荧光和电流法测量流经离子通道的离子流;在大量细胞或多片膜水平上,采用电极阵列法或离子荧光染料法(荧光显微镜、流式细胞仪、光学蛋白质芯片和表面等离子共振分析技术等)实现可视化。

4. 纳米生物传感器的应用试验:利用光学蛋白质芯片技术和表面等离子体共振技术,探测探针分子与靶分子相互作用,获得动态信息,区分探针分子的亲和力差异。构建 MutS 蛋白新型纳米生物传感器用于基因突变检测和与错配 DNA 分子相互作用研究。

根据现有技术的已知方法可以将上述探针-离子通道分子传感器用于制备肿瘤早期检测的试剂盒。因此,本发明还提供一种肿瘤早期检测试剂盒,其中包含上述方法制备的探针-离子通道分子传感器。

本发明与现有技术相比,具有以下优点和效果:探针-离子通道分子传感器的检测灵敏度达到皮克级,比目前水平提高4个数量级以上;通过探针的切换,实现多样化功能传感器。面向重要疾病(如肝癌)和致病微生物(结核、炭疽和突发流行病)的检测,检测准确率达到90%以上。

应当理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,但改动或修改的等价形式同样落在本申请权利要求书所限定的范围内。

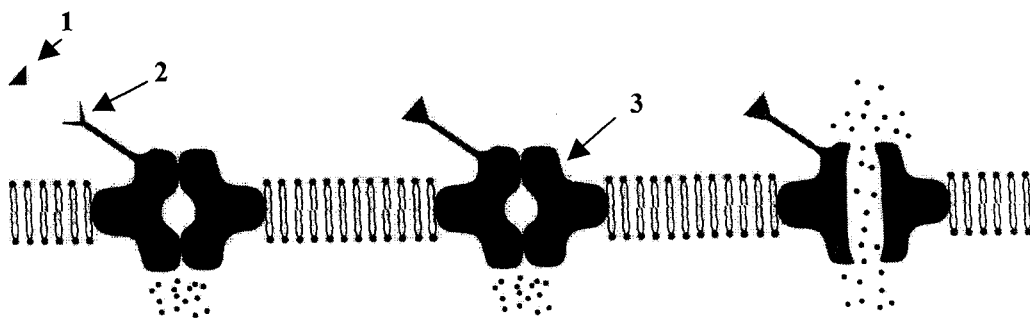


图 1

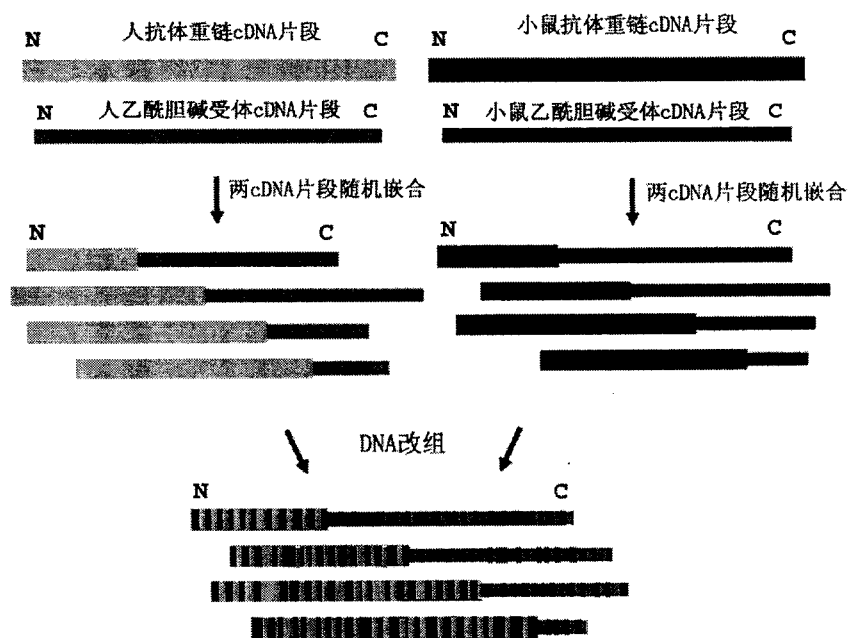


图 2

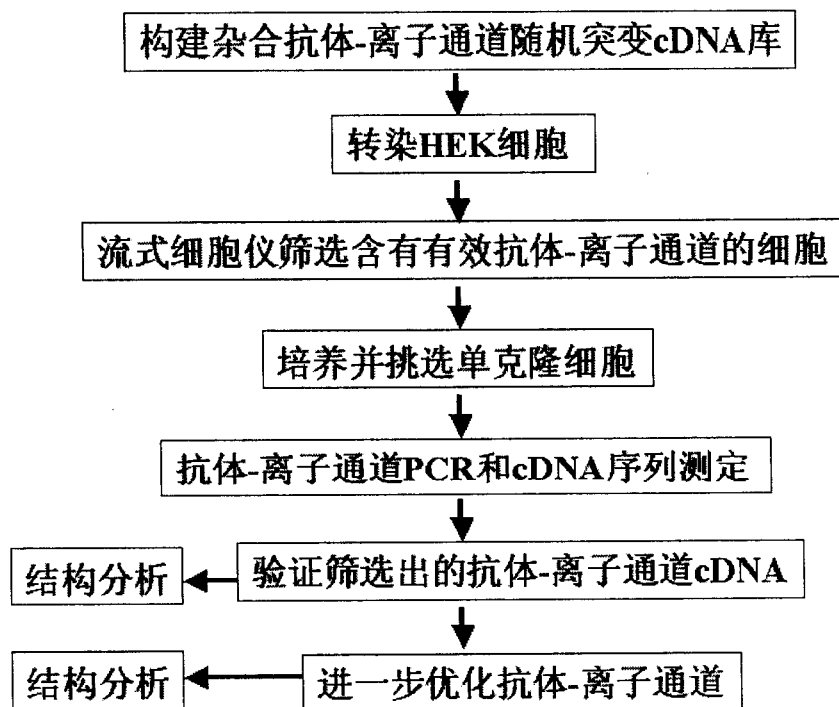


图 3