

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
B82B 3/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02160270.0

[43] 公开日 2004 年 7 月 21 日

[11] 公开号 CN 1513752A

[22] 申请日 2002.12.31 [21] 申请号 02160270.0
[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 乐加昌 聂 棱 张春野 张英豪
王兴胜 崔元波

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司
代理人 姜兆元

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 5 页

[54] 发明名称 一种生物分子马达磁调控装置

[57] 摘要

本发明的目的在于提供一种生物微电机系统，具体地讲涉及一种无机生物马达，纳米水平的生物微电子磁调控装置。将该技术进一步向纳米微电子机械系统发展，是本发明主要任务。本发明的特征是在显微镜平台上安装一个可调控的有磁性的旋转装置，在外加电机下可以快速旋，从而带动样品平台内分子马达旋转。该装置可以为分子马达作用医学，环境分析以及纳米微机电系统提供重要应用装置。

1. 一种磁调控的生物微电机系统装置，该装置由如下两部分组成：

5

(1) 一块磁调控装置基座板通过轴承和一个转盘连接，在转盘正盘面上设有微型磁调控室，调控室内装载微型永磁片 或永磁材料 ，和配有控制调控室空间大小的调节螺丝，磨擦轮，及其相配合的荧光显微镜平台连结螺扣，直流电微型电机，电源，倒置荧光显微镜；(2) ATP 马达分子与磁性纳米金属丝或金属球连接并安装在盖玻片上，将(1)与(2)组装成为一个整体称为分子马达磁调控装置。

10

2. 根据权利要求 1 所述的一种磁调控的生物微电机系统装置，该装置作为分子马达在医学，细胞，分子水平的药物筛选以及微流体池，生物芯片领域，环境分析以及纳米微电机系统中的应用 。

15

一种生物分子马达磁调控装置

5

技术领域

本发明属于生物微电机系统，具体地讲涉及一种无机生物马达，纳米水平的生物微电子磁调控装置。

10 技术背景

自 1997 年日本科学家 Noji 在 Nature 发表单分子水平直接观察 F_1 -ATP 酶旋转的实验以后，世界上已有多个实验室在不同的条件与环境下重复和发展了单分子水平的研究成果。用单分子技术可以观察到 ATP 酶的水解过程中其 F_1 -ATP γ 亚基连接的一种蛋白微丝荧光分子快速的旋转：当一个 ATP 分子水解，它可以产生荧光标记的蛋白微丝（actin）120° 旋转。众所周知，单分子水平研究 F_1 -ATP 酶结构与功能除了有重要科学意义，另一个十分重要的价值在于它是至今为止世界上已发现的最小分子发动机，它的能量利用率几乎达 100%，是无磨损的无机生物马达。这些特点被纳米电机系统（NEMS）科学家们所看好，但是上述的蛋白微丝无法在外加磁力调控，因此不能进一步推广应用。为了发展纳米电机设备。今天，特别是纳米科技飞速发展的 21 世纪，纳米分子机械装置应用的前景十分光明。因此对该研究目前已成为国际高科技领域的制高点。

发明内容

25 鉴于上述分子马达的缺点，本发明目的在于提供一种生物微电机系统，具体地讲涉及一种无机生物马达，纳米水平的生物微电机磁调控装置。将该技术进一步向纳米微电机系统发展，是本发明主要目的。本发明的特征是在显微镜平台上安装一个可调控的有磁性的旋转装置，在外加电机下

可以快速旋，从而带动样品平台内分子马达旋转。

本发明的生物微电机磁调控装置主要有两部份组成：（1）一个磁调控装置基座板和转盘之间通过轴承连接，在转盘正盘面上设有微型磁调控室，调控室内装载微型永磁片或永磁材料，这些磁性材料是，和调控室配有调节螺丝便于调节调控室的大小。附加一套磨擦轮，直流电微型电机，电源及其相配合的荧光显微镜平台连结螺扣，倒置荧光显微镜。（2）ATP 马达分子与磁性纳米金属丝或金属球联接并安装在盖玻片上。将（1）与（2）组装成为一个整体称为分子马达磁调控装置。

10 首先将 ATP 马达分子与磁性纳米金属丝（或金属球）连接并安装在盖玻片上，并用载玻片封片后将其装入荧光显微镜平台上的磁调控装置内，然后在荧光显微镜下观察到 ATP 马达分子与磁性纳米金属丝连结后的磁性纳米金属丝，将其调节到显微镜的中心处，然后直接观察其旋转的过程可以被磁调控装置所调控。

15 该装置可以作为分子马达用于医学，环境分析以及纳米微机电系统提供重要应用装置。同时也可以将该发明推广到其它的领域，如：细胞，分子水平的药物筛选以及微流体池，生物芯片等领域有着十分广范应用前景。

附图说明

20 图 1 ATP 马达工作原理图

1 ATP 酶固定在玻璃上的连接处， 2 玻璃（盖玻片）， 3 ATP 酶，
4 特殊生物素（biotin-PEAC₅- maleimide ），5 磁性材料，6 链酶抗生物素（streptavidin）。

25 图 2. 磁调控装置图

1 磁调控装置基座板， 2 与轴承连接的磁调控转盘， 3 轴承， 4 微型磁调控室， 5 微型永磁片（或永磁材料）和调节螺丝， 6 流动小池； 7ATP 马达。

图 3. 实验工作原理图;

- 1 荧光显微镜, 2 磨擦轮, 直流电机与电源, 3 磁调控装置基座板, 4 流动小池, 5 ATP 马达, 6 与轴承连接的磁调控转盘, 7 微型磁调控室, 微型永磁片 (或永磁材料) 和调节螺丝, 8 轴承。

图 4 A 磁性材料 (金属微丝) 旋转的直接观察。

图 4 B 磁性材料 (金属微丝) 旋转的速度。

图 4 C 磁性材料 (金属微丝) 旋转角度累加。

10

具体实施方案

实施例

- 15 分子马达磁调控装置的制作:

一个磁调控装置基座板通过轴承连接装有转盘, 在转盘正盘面上设有微型磁调控室, 通过调节螺丝控制调节室的大小, 调控室内装载微型永磁片或永磁材料, 磁性材料可选用, 磨擦轮 (大, 小各一套), 及其相配合的荧光显微镜平台连结螺扣, 直流电微型电机, 电源, 倒置荧光显微镜

- 20 分子马达组装:

金属微丝 (20nm 直径) 的预处理: 用双蒸水洗三遍后加入含 His-tag 的小肽 (该小肽预先被荧光和生物素化 $50 \mu\text{M}$ (biotin-PEAC₅-maleimide) 在 1mM PH7.2 Hepes-KOH, 100mM KCl, 2mM MgCl₂ 体系中室温下反应 2h), 反应 10h。然后 buffer A (pH 7.2 10mM Hepes-NaOH / 25mM KCl / 5mM MgCl₂) 洗五次。生物素化 F₁-ATP 酶: 将 $0.02 \mu\text{M}$ 的 F₁ 复合物加入 $0.06 \mu\text{M}$ 的特殊生物素 (biotin-PEAC₅-maleimide) 在室温中处理 2h (反应在 20mM PH7.2 Hepes-KOH 缓冲体系中进行)。

25

包埋载波片: 用硝酸纤维素 (5.45ng/ml) 包埋载波片 10min, 后用双蒸水冲洗小池, 再用 Buffer A 洗三次。载波片连接 Ni-NTA: 将溶于 Buffer A 的 0.2 μ M Ni-NTA 加入流动小池中, 室温放置 2h, 后用 Buffer A 洗三次。载波片用 BSA 处理: 将流动小池中加入 10mg/ml BSA, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 后用 Buffer A 洗三次。

Ni-NTA 上连接生物素化的 F_1 : 将约 2nM 生物素化的 F_1 加入流动小池中室温放置 1h, 后用 50 mM 咪唑 Buffer 洗三次。

生物素化的 F_1 上连接链酶抗生物素 (streptavidin): 流动小池中加入溶于 Buffer A 的 0.2 μ M streptavidin, 连接 30min, 后用 Buffer A 洗三次。

链酶抗生物素连接荧光标记生物素化的金属微丝: 将荧光标记生物素化的金属微丝加入流动小池中, 室温连接 1h, 后用 Buffer A 洗五次。

启动反应: 流动小池中加入 10 mM ATP / 50 μ g/ml 丙酮酸激酶 (PK, pyruvate kinase) / 1mM 磷酸烯醇丙酮酸 (PEP, phosphoenol pyruvate) / 10mM $MgCl_2$ / 10mM KCl (溶于 Buffer A 中)。其中一组不加 NaN_3 , 另一组分别加入 1mM、5mM NaN_3 。观察 F_1 -ATP 的 γ 亚基联结的金属微丝旋转, 然后在外加磁调控装置继续观察。在倒置荧光显微镜 Olympus-71(or -BO3) 40 倍荧光显微镜下观察, 用 CCD (MicroMax:782YHS, Princeton Instruments) 记录 (27 帧/s) 后用计算机程序处理实验结果。

结果:

(1) 镍丝(20nm) 标记 His-Tag 荧光蛋白(含 biotin) (见图 4A)

(2) 生物素化的 F_1 上连接链酶抗生物素 (streptavidin)

(3) 链酶抗生物素连接荧光标记生物素化的金属微丝

启动反应: 流动小池中加入 10 mM ATP / 50 μ g/ml 丙酮酸激酶 (PK, pyruvate kinase) / 1mM 磷酸烯醇丙酮酸 (PEP, phosphoenol pyruvate) /

10mM MgCl_2 / 10mM KCl (溶于 Buffer A 中)。其中一组不加 NaN_3 , 另一组分别加入 1mM、5mM NaN_3 。观察 F_1 -ATP 的 γ 亚基联结的金属微丝旋转, 然后在外加磁调控装置继续观察。在倒置荧光显微镜 Olympus-IX71(or -BO3) 40 倍荧光显微镜下观察, 用 CCD (MicroMax:782YHS,Princeton Instruments) 记录 (27 帧/s) 后用计算机程序处理实验结果 (图 4A)。

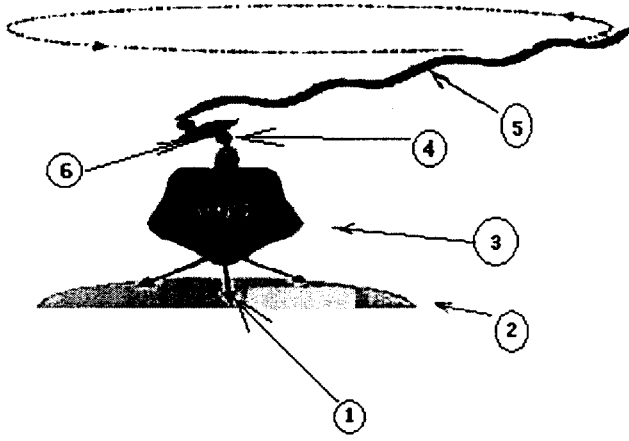


图 1

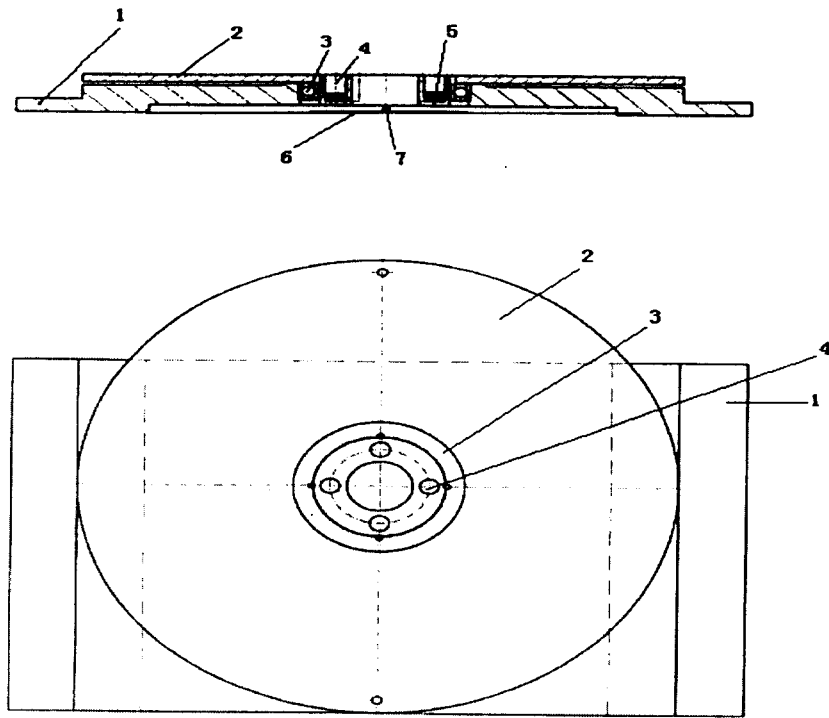


图 2

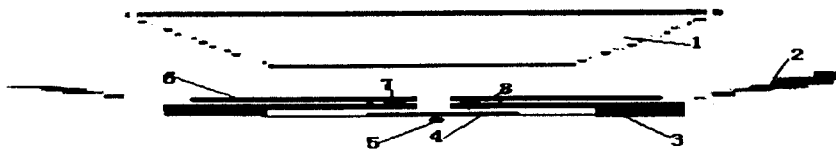


图 3

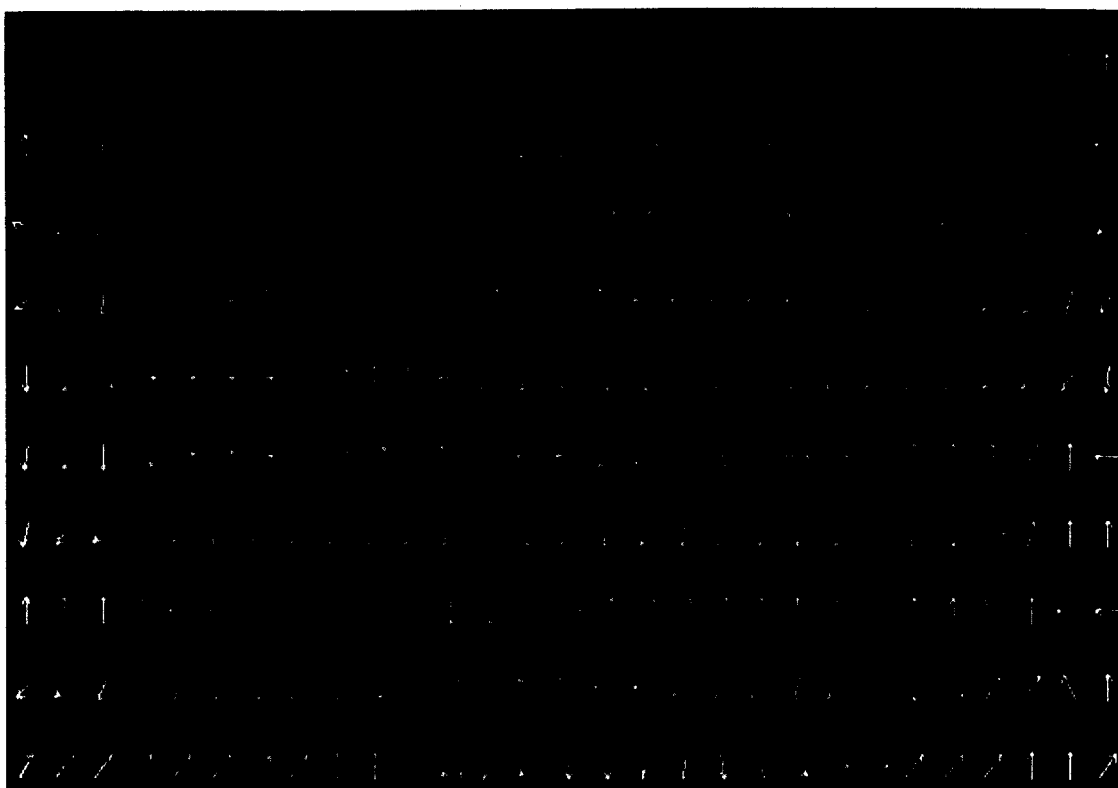


图 4 A

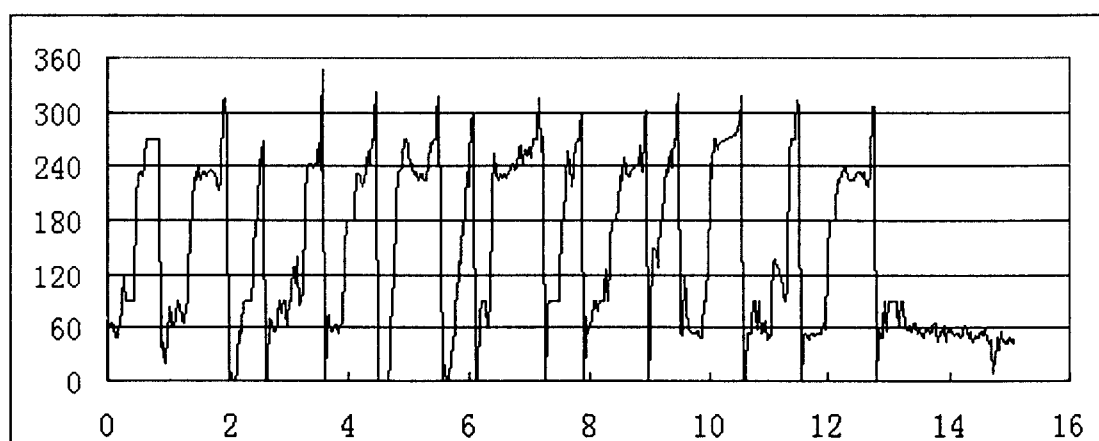


图 4 B

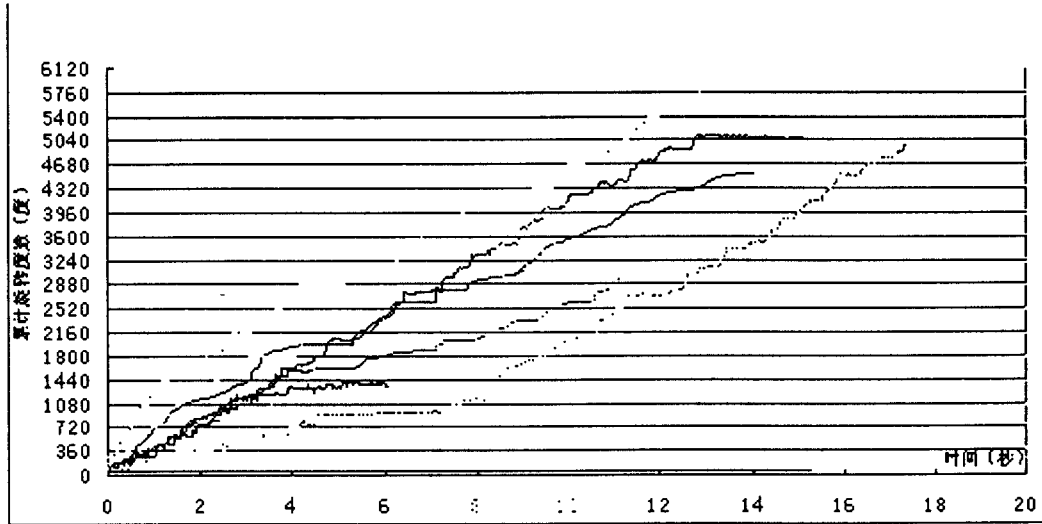


图 4 C