



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102798715 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

(21) 申请号 201110138288. 5

C12Q 1/44 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 05. 24

(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 王佩荣 张旭

(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 33/566 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

C12Q 1/70 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

C12Q 1/04 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种生物分子马达共振传感器的构建及检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种生物分子马达共振传感器的构建及检测方法。本发明在构建旋转式生物传感器过程中,发现了负载与转速之间存在激活/压制的现象,而且信号的变化与负载之间存在非线性关系。常用力学理论不能解释旋转与负载之间的非线性现象,但是可用共振理论来描述。本发明,将分子马达旋转型传感器发展成为共振型的传感器。此类生物传感器的调控因素更加复杂,各种调控要求更高,但是一旦找到了共振的条件将它的应用发展到了一个更高的水平,是生物传感器较大的原理与技术突破,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。

1. 一种改进的分子马达生物传感器,该载色体上含有分子马达  $F_0F_1$ -ATPase,并且所述  $F_0F_1$ -ATPase 的  $\epsilon$  亚基上连接有特异的识别分子。
2. 根据权利要求 1 所述的分子马达生物传感器,其中所述载色体是经过密度梯度离心获得的大小在 50-60nm 之间且 ATPase 酶活性较高的载色体。
3. 根据权利要求 1 所述的分子马达生物传感器,其中  $\epsilon$  亚基和识别分子通过  $\epsilon$  亚基抗体连接,所述  $\epsilon$  亚基抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。
4. 根据权利要求 1 所述的分子马达生物传感器,其中  $\epsilon$  亚基所连接的识别分子是可以与待测物质特异结合的分子,从而引起双浓度变化。
5. 根据权利要求 2 所述的分子马达生物传感器,其中  $\epsilon$  亚基和识别分子的连接方式可以通过生物素-链酶亲和素(或其衍生物)-生物素系统连接,也可以是通过 NHS-sulfo 和 EDC 将氨基和羧基连接,还可以是通过互补 DNA 链进行连接。
6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的分子马达生物传感器,其中在液相中进行结合反应、ATP 合成或者水解反应。
7. 根据权利要求 6 所述的分子马达生物传感器,其中分子马达和样品的结合与 ATP 合成反应可同时进行。
8. 根据权利要求 1-7 所述任一项分子马达生物传感器,其检测原理是以  $\epsilon$  亚基连接不同负载可以协同共振的方式调控  $F_0F_1$ -ATPase 分子马达的活性。
9. 根据权利要求 1-7 所述任一项分子马达生物传感器在蛋白质、核酸、病毒、细菌检测以及小分子检测中的应用。

## 一种生物分子马达共振传感器的构建及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于纳米分子马达传感器生物新技术领域,发现了转式 ATP 马达与共振的相关性,涉及了 ATP 马达传感器的共振传感器设计,组装与生物领域中的应用。

### 背景技术

[0002] 共振是物理学上专业术语,产生共振的重要条件之一,就是具有弹性,而且一件物体受外来的频率作用时,它的频率要与后者的频率相同或基本相近。共振不仅在物理学上运用频率非常高。而且,共振是宇宙间一切物质运动的一种普遍规律,当然共振也是普遍存在于生命中了。但是应用共振现象组建生物分子马达超灵敏的共振传感器,未见报导。

### 发明内容

[0003] 本发明人在构建旋转式生物传感器过程中,发现了负载与转速之间存在激活/压制的现象,而且信号的变化与负载之间存在非线性关系。常用力学理论不能解释旋转与负载之间的非线性现象,但是可用共振理论来描述。本发明,将分子马达旋转型传感器发展成为共振型的传感器。此类生物传感器的调控因素更加复杂,各种调控要求更高,但是一旦找到了共振的条件将它的应用发展到了一个更高的水平。即使当每个孔的抗体分子数在 (pg/ml, well) 时,但是其测定抗原的灵敏度可达到 (fg/ml, well),要超过其抗体分子数本身的 1000 倍以上;使传感器的信号放大与超灵敏的检测成为可能。并可将其原理广泛应用于生物大分子的各个领域。

[0004] 在专利 200410098929.9(公开日:2006年6月21日, CN1789425, 已授权)中,我们基于 F-ATPase 分子马达的特殊结构功能研究发明了一种可调控分子马达微动力生物传感器,该传感器利用抗体技术通过  $\beta$  亚基抗体-生物素-链酶抗生物素-生物素与生物大分子,病毒分子特异性抗原的抗体相连接来实现对分子马达旋转功能的调控和作为生物微动力传感器在固相的应用。

[0005] 本发明是对申请号为 200410098929.9 的中国专利(公开日:2006年6月21日, CN1789425, 已授权)进行的进一步重要改进,首先,构建了转子旋转式生物传感器技术,将以前分子马达传感器的定子调控测定技术,发展成为转子旋转式生物传感器技术,并且发现,转子旋转式生物传感器是一个共振式旋转生物传感器,具有多个共振频率,由于上述重要的变化,对于分子马达的制备技术,调控方法等也有重要改进,从而将分子马达微动力生物传感器推向了一个更加敏感,更加快速,更加方便应用的新高度。

[0006] 本发明为实现上述目标所实施的技术方案是:基于  $\epsilon$  亚基作为转子调控原理,分子马达旋转速度的调控,引入了不仅是取决于负载的大小,而且取决于浓度变化与共振之间的关系,对此类生物传感器的调控因素更加复杂,各种调控要求高,但是一旦找到了共振的条件,就能得到比其它技术更加灵敏的测定生物大分子的方法。用密度梯度离心制备大小均一、活性高的载色体,利用  $\epsilon$  亚基特异抗体对抗原、核酸及小分子进行了超灵敏快速检测。该方法适合芯片通量以及自动化的操作。将分子马达微动力传感器的应用发展,更

加,灵敏,快速,方便与实用。

[0007] 本发明与 CN1789425 主要区别为:(1)  $F_0F_1$ -ATPase 分子马达活性的调控原理不同, CN1789425 的原理是转速随负载重量变化而改变(定子调控),而本发明是我们发现  $F_0F_1$ -ATPase 分子马达活性由  $F_0F_1$ -ATPase 分子马达  $\epsilon$  亚基负载转子共振调控的现象,并且利用此原理可设计全新的生物传感器,根据  $\epsilon$  亚基负载可调控双浓度变化,本发明通过将识别探针(抗体,核酸)连接到  $\epsilon$  亚基来调控分子共振调控的现象(转子调控),(2) 本发明将在固/液相中进行旋转马达生物传感器的制备以及检测工作,使得制备过程以及检测过程方法大大加快,并且生物活性和均一性得到显著提高,有利于旋转式生物传感器技术应用于高通量的检测以及自动化的实施。(3) 本发明对于 ADP 的纯度要求很高(Amresco ADP 货号:0160,纯度达到 99%),从而使生物传感器技术能够检测出共振调控的现象,更灵敏的活性变化:(4) 实时动态法:传统抗体抗原结合(配体受体结合)反应存在两个阶段 a. 快速反应阶段(特异识别,如亲和力,氢键,疏水作用等);b. 分子构象变化. 传统抗体抗原 Elsia 技术需要两个阶段才能观察,本发明将分子马达生物传感器与靶分子的结合和检测两个步骤合并为一步进行,边结合边检测,不需要去除游离分子,只需要快速反应阶段,大大提高了检测速度,可达到数秒之内实时动态法;(5) 由于引入了高纯度的 ADP,超灵敏可达到分子水平。(6) 本发明可用于抗原检测,也可用于 RNA, DNA 的检测,核酸检测不需要进行扩增,克服了扩增带来的假阳性问题。

[0008] 具体来说,本发明涉及如下各项:

[0009] 1. 一种改进的分子马达生物传感器的均一化制备技术(包括载染色体)。该载染色体上含有分子马达  $F_0F_1$ -ATPase,并且所述  $F_0F_1$ -ATPase 的  $\epsilon$  亚基上连接有特异的识别分子。

[0010] 2. 根据以上 1 所述的分子马达生物传感器,载染色体是经过密度梯度离心获得的大小在 50-60nm 之间,且 ATPase 酶活性较高的载染色体。

[0011] 3. 根据以上 1 所述的分子马达生物传感器, $\epsilon$  亚基和识别分子通过  $\epsilon$  亚基抗体连接。

[0012] 4. 根据以上 1 所述的分子马达生物传感器, $\epsilon$  亚基所连接的识别分子是可以与待测物质特异结合的分子,从而引起双浓度变化;

[0013] 5. 根据以上 2 所述的分子马达生物传感器, $\epsilon$  亚基和识别分子的连接方式可以通过生物素-链酶亲和素(或其衍生物)-生物素系统连接,也可以是通过 NHS-sulfo 和 EDC 将氨基和羧基连接,还可以是通过互补 DNA 链进行连接。

[0014] 6. 根据以上 1-5 任一项分子马达生物传感器,在液相中进行结合反应、ATP 合成或者水解反应,由于在液相中,分子之间更容易相互碰撞发生反应,大大缩短了反应时间。

[0015] 7. 根据以上 6 所述,分子马达和样品的结合与 ATP 合成反应可同时进行,边转边测,增加分子碰撞概率,进一步缩短反应检测时间。

[0016] 8. 根据上述 1-7 所述任一项分子马达生物传感器,在蛋白质,核酸,病毒,细菌检测以及小分子检测中的应用。

[0017] 9. 根据上述 1-8 所述任一项分子马达生物传感器,其检测原理是以  $\epsilon$  亚基连接不同负载可以协同共振的方式调控  $F_0F_1$ -ATPase 分子马达的活性为基础。

[0018] 10. 共振调控的分类与检测方法形态:

[0019] 10.1 共振原理:

[0020] 
$$Fn = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\mu}{I}}$$
 ([http://en.wikipedia.org/wiki/Harmonic\\_oscillator](http://en.wikipedia.org/wiki/Harmonic_oscillator)),

[0021] 根据此原理,其共振具有多周期,其次,  $\mu$  与转动能成正比,与 I 负载成反比,当  $\mu / I$  大于零时,其 Fn 与负载成正比,反之,当  $\mu / I$  小于零时,Fn 与负载成反比,因此其共振频率与负载之间存在激活 / 压制的现象 (如图,1,2,3,). 要根据应用需求,确定浓度范围后,作 (激活 / 压制) 的曲线,然后,在此范围确定,用激活曲线 (正共振),或压制曲线 (负共振),

[0022] 由于:  $\tau = I\ddot{\theta} + \Gamma\dot{\theta} + \mu\theta$  ([http://en.wikipedia.org/wiki/Harmonic\\_oscillator](http://en.wikipedia.org/wiki/Harmonic_oscillator)), 式中的  $\mu$  为:扭转常数; I 为瞬间惯性,  $\Gamma$  为旋转的摩擦力;  $\tau$  为驱动扭矩;  $\theta$  为角度,  $\dot{\theta}$  为角速度;  $\ddot{\theta}$  为加速度; 所以,共振频率的确定,要在转速,负载,大量实验的基础上按需求来确定. 而不是简单的转速与负载成反比的调控.

[0023] 10.2 共振调控的分类:

[0024] 10.2.1 上述该共振频率是在一个固定的条件下确定的,或称为定域式共振传感器。分子马达抗体 - 抗原的结合需要有一个过程 (时间), 然后起转动旋转,称为共振频率的确定是在一个固定式。

[0025] 10.2.2 分子马达还有一个特点,它的转子的旋转作用,可以发展为实时测定技术: 即边结合,边捕捉,边测定,也就是共振频率可以随传感器转速的变化而改变,或称为,可调式共振频率共振传感器。该转动式共振传感器,将信号转变,即边结合,边捕捉,边测定为一体,称为共振频率可调式; 可以在很短时间内完成 (1-5 分钟), 从而将分子马达共振传感器的应用提高到了一个水平。

[0026] 10.3 检测方法的形态: 共振传感器可以液相也可以固相。

[0027] 10.3.1 共振传感器液相法特点: 共振频率与负载之间存在激活 / 压制的双曲线的现象

[0028] 共振传感器固相法特点: 共振频率与负载之间存在激活 / 压制的双曲线的现象

[0029] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0030] 1. 一种改进的分子马达生物传感器,该载体上含有分子马达  $F_0F_1$ -ATPase, 并且所述  $F_0F_1$ -ATPase 的  $\epsilon$  亚基上连接有特异的识别分子。

[0031] 2. 根据以上 1 所述的分子马达生物传感器,其中所述载体是经过密度梯度离心获得的大小在 50-60nm 之间且 ATPase 酶活性较高的载体。

[0032] 3. 根据以上 1 所述的分子马达生物传感器,其中  $\epsilon$  亚基和识别分子通过  $\epsilon$  亚基抗体连接,所述  $\epsilon$  亚基抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0033] 4. 根据以上 1 所述的分子马达生物传感器,其中  $\epsilon$  亚基所连接的识别分子是可以与待测物质特异结合的分子,从而引起双浓度变化。

[0034] 5. 根据以上 2 所述的分子马达生物传感器,其中  $\epsilon$  亚基和识别分子的连接方式可以通过生物素 - 链酶亲和素 (或其衍生物) - 生物素系统连接,也可以是通过 NHS-sulfo 和 EDC 将氨基和羧基连接,还可以是通过互补 DNA 链进行连接。

[0035] 6. 根据以上 1-5 任一项所述的分子马达生物传感器,其中在液相中进行结合反应、ATP 合成或者水解反应。

[0036] 7. 根据以上 6 所述的分子马达生物传感器,其中分子马达和样品的结合与 ATP 合

成反应可同时进行。

[0037] 8. 根据以上 1-7 所述任一项分子马达生物传感器,其检测原理是以  $\epsilon$  亚基连接不同负载可以协同共振的方式调控 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase 分子马达的活性。

[0038] 9. 根据以上 1-7 所述任一项分子马达生物传感器在蛋白质、核酸、病毒、细菌检测以及小分子检测中的应用。

[0039] 本发明借助分子马达结构,功能与原理的研究进展,提出了 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase 的  $\epsilon$  亚基可以协同共振的方式调控 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase 分子马达的活性,且与其负载相关的共振原理,提出了新的转动式分子马达生物传感器共振调控的分类与检测方法形态,并利用液相的均一性,进一步提高分子马达生物传感器的检测灵敏度,缩短检测时间,简化检测步骤,同时也可以用于固相方法,建立适于高通量和自动化操作的检测方法和超灵敏分子马达生物传感器。可广泛用于医疗,环境,食品,国防,能源,信息等领域,具有及其广泛的应用价值和巨大的经济社会效益。

[0040] 发明详述

[0041] 本发明原理及实现过程如下:

[0042] 1. 均一化载色体的制备:

[0043] 从 *thermumicrobium roseum*(ATCC 27502) 菌中按比例 1:100 接种到液体培养基(见附录),60°C,150rpm,培养 24h。然后 4000rpm,30min,4°C 离心收集菌体。用提取 Buffer(20mM Tris-Cl pH8.0,100mM NaCl,2mM MgCl<sub>2</sub>,1mM DTT) 重悬菌体,离心去上清(6000rpm,10min,4°C)。加入提取 Buffer 重悬菌体(约 1g 加入 10ml Buffer),再加入终浓度 1mM PMSF,冰上超声破碎 30min(超声 5s,停 8s)。将破碎菌体离心(25,000g,30min,4°C),去沉淀取上清。将上清超速离心(145,000g,1h,4°C),取沉淀即为 Chromatophore(载色体),再经过密度梯度离心获得大小均一的 chromatophore。最后用提取用 Buffer 重悬沉淀并加入终浓度 50% 的甘油 -80°C 保存。

[0044] 2.  $\epsilon$  亚基单克隆抗体的制备

[0045] 杂交瘤细胞的制备:按照《抗体制备与使用实验指南》(G. C. 霍德华 M. R. 凯瑟著,张权庚张玉祥丁卫王炜主译,2010) 中的方法进行。

[0046] 3. 抗体与核酸探针的生物素化:

[0047] 3.1. 抗体的生物素化

[0048] 将抗体(单克隆抗体常规技术制备)用 pH 9.6 碳酸 buffer(0.1mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>) 将抗体稀释到 1mg/ml-10mg/ml,取 5ml 加入 62ul 50mM NHS-biotin,4°C 反应 8 小时,之后在 PBS(pH7.4) 透析液中透析 4 次,每次 8 小时。将透析好的生物素化  $\epsilon$  抗体加 50% 甘油分装保存于 -80°C 冰箱。

[0049] 3.2. 核酸探针的生物素化:

[0050] 可通过生物公司直接合成生物素化的核酸探针。

[0051] 4. 分子马达的组装

[0052] 4.1. 取 10 个 1.5ml 进口离心管,每管中加入 150ul Chromatophore 原液用 500ul PBS 稀释,各加入 60ug N-biotin 标记  $\beta$  亚基抗体,用 PBS 补加至 1ml,37°C 反应 1h

[0053] 4.2. 每管用 PBS 补加至 1.4ml,4°C 40000rpm 超速离心 10min;弃上清,将沉淀用 500ul PBS 重悬;

[0054] 4.3. 每管中加入 Avidin(2mg/ml)2ul,用 PBS 补加至 1ml,室温摇床上(转速 50-100 转每分钟)反应 15min;

[0055] 4.4. 每管用 PBS 补加至 1.4ml,4℃ 30000rpm 超速离心 10min,弃上清,将沉淀用 500ul PBS 重悬

[0056] 4.5. 每管中加入 N-biotin 标记 P24 抗体 (3mg/ml)2ul,用 PBS 补加至 1ml,室温摇床上(转速 50-100 转每分钟)反应 15min;

[0057] 4.6. 每管用 PBS 补加至 1.4ml,4℃ 30000rpm 超速离心 10min,弃上清,用 150ul 含 30%甘油的 PBS 重悬 Chromatophore,在管壁上标明制作日期、连接体系、制作人等信息,放入 -20℃冰箱备用。

[0058] 5. 液态法检测方法

[0059] 连有特异探针的组装好的分子马达与靶分子在液相中结合,在均一的液态环境中反应,可使反应能够均匀快速的进行,由于嗜热菌来源的酶耐热,我们通过在 37 摄氏度反应,使分子间的碰撞概率增加,又不使酶失活,加快了反应速度,增强了反应效果。

[0060] 5.1. 抗原抗体结合在 37℃结合 30 分钟,核酸结合通过在 95 度变性之后冰上迅速冷却,然后在 42℃结合 5 分钟,然后置于冰上。

[0061] 5.2. ATP 合成反应:将分子马达与靶分子的混合物与含有 0.5mM ADP 的合成 buffer 按照 1 : 10 的体积比例混合,37℃反应 5 分钟,然后用终浓度为 0.5% TCA 终止反应,之后用 pH8.0 的 Tricine 缓冲液稀释 5 倍后置于冰上待测。对照为 0.5% TCA 与分子马达结合失活酶活性。同时设置阴性对照与阳性对照。操作相同。该方法不需离心去除分子马达。

[0062] 5.3. 化学发光检测

[0063] 按照商品化荧光素 / 荧光素酶检测 ATP 的方法进行 ATP 含量检测。

[0064] 具体的:取 20ul 5.2 中反应好的样品,加入 30ul 荧光素荧光素酶工作液,在 96 孔化学发光仪上读取荧光强度值。

[0065] 6. 共振原理

[0066] 组装好的分子马达生物传感器 ATP 合成和水解活性随检测靶分子浓度的升高呈现双向变化的共振现象,而这种共振关系同组装好的分子马达与靶分子之间的浓度比例相关,利用这种相关性,我们可以用共振频率的不同来检测出不同浓度的靶标分子。同时也可以通过制备不同浓度的新型分子马达传感器来用于检测不同浓度范围的样品,达到在不同检测范围均具有高检测灵敏度和高活性的目的。

[0067] 本发明通过以下具体方案实现,为了更好的理解本发明,下面结合附图和实施例进一步举例说明,但不应理解为对本发明的限制。

## 附图说明

[0068] 图 1. 分子马达组装原理图;

[0069] 图 2.  $F_0F_1$ -ATPase 的共振现象;

[0070] 图 3. 连有 P24 特异抗体的分子马达 ATP 合成活性随 P24 抗原浓度的共振变化;

[0071] 图 4. 连有 P24 特异抗体的分子马达 ATP 水解活性随 P24 抗原浓度的共振变化;

[0072] 表 1 图 4 中 P24 或者 HBsAg 的浓度

[0073] 图 5. TNT 实时快速检测；

[0074] 图 6. ATPase 合成法检测布鲁氏菌 DNA。

### 具体实施方式

[0075] 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。

[0076] 本发明的目的是通过下面的技术方案实现的：

[0077] 实施例 1 一种分子马达生物传感器的组装

[0078] 分子马达组装原理图 1 所示,其组装过程如下：

[0079] 1.1 均一化的 chromatophore 的制备

[0080] chromatophore 粗提物的制备与中国专利 CN1789425 相同。制备均一化的 chromatophore 则通过密度梯度离心获得。具体方法如下：制备蔗糖梯度：20% (2ml), 40% (2ml), 50% (2ml), 55% (2ml), 60% (1ml), 将粗提的 chromatophore 缓慢加到顶端, 在 38000rpm 离心力下, 4℃ 离心 1.5 小时, 取 chromatophore 层, 加 50% 甘油保存与 -80℃。

[0081] 1.2 ε 抗体的生物素化：

[0082] 将 ε 亚基抗体 (单克隆抗体常规技术制备) 用 pH9.6 碳酸 buffer (0.1mMNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>) 将抗体稀释到 1mg/ml-10mg/ml, 取 5ml 加入 62ul 50mMNHS-biotin, 4℃ 反应 8 小时, 之后在 PBS (pH7.4) 透析液中透析 4 次, 每次 8 小时。将透析好的生物素化 ε 抗体加 50% 甘油分装保存于 -80℃ 冰箱。

[0083] 1.3 生物素化 ε 抗体和探针的制备

[0084] 1.3.1 透析袋处理：剪一段长度合适的透析袋, 和透析袋夹子一同放入烧杯中。加入纯水及少量的 EDTA, 置于沸水浴中处理 5min, 用纯水清洗干净, 浸泡在纯水中置 4℃ 备用。

[0085] 1.3.2 配制碳酸 buffer (CB) (pH = 9.6) 1000ml

[0086] Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59g

[0087] NaHCO<sub>3</sub> 2.93g

[0088] H<sub>2</sub>O 定容到 1000ml

[0089] 1.3.3CB 透析过夜, 换 buffer。

[0090] 1.3.4 每 1mg 抗体加 10 μ l BNHS (50mM), 室温反应 4 小时。

[0091] 1.3.5PBS (pH = 7.4) 透析过夜, 换三次 buffer。

[0092] 1.3.6 配制 PBS (pH = 7.4) 1000ml

[0093] Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 29.01g

[0094] NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2.96g

[0095] 1.3.7 吸出, 加入 30% 甘油, 分装, 置于 -20℃ 保存。

[0096] 1.4 特异抗体与载色体的连接：

[0097] 1.4.1. 取 10 个 1.5ml 进口离心管, 每管中加入 150ul Chromatophore 原液用 500ul PBS 稀释, 各加入 60ug N-biotin 标记 β 亚基抗体, 用 PBS 补加至 1ml, 37℃ 反应 1h；

[0098] 1.4.2. 每管用 PBS 补加至 1.4ml, 4℃ 40000rpm 超速离心 10min；弃上清, 将沉淀用 500ul PBS 重悬；



[0099] 1.4.3. 每管中加入 Avidin(2mg/ml) 2ul, 用 PBS 补加至 1ml, 室温摇床上 (转速 50-100 转每分钟) 反应 15min;

[0100] 1.4.4. 每管用 PBS 补加至 1.4ml, 4°C 30000rpm 超速离心 10min, 弃上清, 将沉淀用 500ul PBS 重悬

[0101] 1.4.5. 每管中加入 N-biotin 标记 P24 抗体 (3mg/ml) 2ul, 用 PBS 补加至 1ml, 室温摇床上 (转速 50-100 转每分钟) 反应 15min;

[0102] 1.4.6. 每管用 PBS 补加至 1.4ml, 4°C 30000rpm 超速离心 10min, 弃上清, 用 150ul 含 30% 甘油的 PBS 重悬 Chromatophore, 在管壁上标明制作日期、连接体系、制作人等信息, 放入 -20°C 冰箱备用。

[0103] 实施例 2 化学发光法检测分子马达 ATP 合成和水解活性:

[0104] 2.1 化学发光法测定分子马达 ATP 合成活性实验步骤如下:

[0105] 取 5ul chromatophore, 加入 45ul 合成 buffer (50mM Tricine-NaOH, pH8.0, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10% 甘油, 2mM DTT, 1mM ADP), 37°C 反应 5 分钟, 加入 5ul 6% TCA 终止反应, 用 50mM Tricine-NaOH (pH8.0) 200ul 稀释后, 取 20ul 同 100ul ATP 检测试剂盒 (ENLITEN® ATP Assay System, 货号: FF2021, Promega) 中的 rL/L 工作液混合, 迅速测定荧光值 (RLU), chromatophore 先与 5ul 6% TCA 混合作为阴性对照。合成 buffer 作为本底。

[0106] 2.2 化学发光法测定分子马达 ATP 水解活性实验步骤:

[0107] 取 5ul chromatophore, 加入 45ul 水解 buffer (50mM Tricine-NaOH, pH8.0, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% 甘油, 2mM DTT, 50uM ADP), 37°C 反应 5 分钟, 加入 5ul 6% TCA 终止反应, 用 50mM Tricine-NaOH (pH8.0) 200ul 稀释后, 取 20ul 同 100ul ATP 检测试剂盒 (ENLITEN® ATP Assay System, 货号: FF2021, promega) 中的 rL/L 工作液混合, 迅速测定相对荧光强度值 (RLU), chromatophore 先与 5ul 6% TCA 混合作为阴性对照。合成 buffer 作为本底。

[0108] 实施例 3. 双浓度调控的发现:

[0109] 我们在进行 P24 检测的过程中, 发现随着 P24 浓度的增加, 分子马达的活性先增加后下降 (如图 2 所示), P24 抗原使用商品化抗原 (北京科跃中楷生物技术有限公司), 用 PBS 稀释成不同浓度, 检测方法同实施例 2, 其中 m 表示 P24 抗原的质量浓度, RLU 表示相对荧光强度。

[0110] 实施例 4. 运用分子马达生物传感器 ATP 合成活性检测 P24 抗原:

[0111] 将连有 P24 特异抗体的分子马达生物传感器与不同浓度 P24 抗原按照 10:1 的体积比例混合 (反应物 1), 37°C 反应 30 分钟。取 10ul 反应物 1 加入到 40ul ATP 合成 buffer 中 (50mM Tricine-NaOH, pH8.0, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10% 甘油, 1mM ADP), 37°C 反应 5 分钟, 然后置于冰上, 加入 6% TCA 5ul 混匀终止反应。用 ATP 检测试剂盒 (ENLITEN® ATP Assay System, 货号: FF2021, Promega) 检测反应前后 ATP 含量的变化。如附图 3 所示。

[0112] 实施例 5. 运用分子马达生物传感器 ATP 水解活性检测 P24 抗原

[0113] 将连有 P24 特异抗体的分子马达生物传感器与不同浓度 P24 抗原按照 10:1 的体积比例混合 (反应物 1), 37°C 反应 30 分钟。取 10ul 反应物 1 加入到 40ul ATP 水解 buffer 中 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% 甘油, 50 μM ATP), 37°C 反应 5 分钟, 然后置于冰上, 加入 6% TCA 5ul 混匀终止反应。用 ATP 检测试剂盒 (ENLITEN® ATP Assay System,

货号:FF2021, Promega) 检测反应前后 ATP 含量的变化。如附图 4 所示,其中 x 轴表示 P24 或者 HBsAg 的浓度(见表 1),

[0114] y 轴表示相对荧光强度。

[0115] 表 1 图 4 中 P24 或者 HBsAg 的浓度

[0116]

X 轴编号	1	2	3	4	5	6	7	8
P24 或 HBsAg 浓度 (mg/ml)	0	$10^{-12}$	$10^{-11}$	$10^{-10}$	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$

[0117] 实施例 6. TNT 实时快速检测

[0118] 将制备好的分子马达传感器(连接 TNT 检测系统的 Chromatophore)用 PBS 稀释 150 倍,取  $10\ \mu\text{L}$  加入 1.5ml EP 管中,另取含 ADP 0.25mM 的合成 buffer  $30\ \mu\text{L}$  及  $10\ \mu\text{L}$  含 TNT 的 PBS 作为样品(另一 EP 管加入 PBS 作为对照),混合,置于室温反应 5 分钟。在反应后的两管混合液中分别加入  $50\ \mu\text{L}$  荧光素-荧光素酶检测液,在双孔化学发光检测仪器上检测荧光强度,检测时间为 10 秒/样。结果如图 5 所示检测灵敏度可达 1fg/ml。

[0119] 实施例 7. 布鲁氏菌 DNA 检测

[0120] 将培养的布鲁氏菌于  $80^{\circ}\text{C}$  灭活 1 小时,使用商品化 DNA 提取试剂盒提取菌体 DNA,通过测定  $\text{OD}_{260}$  定量 DNA 浓度,用灭菌 Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液稀释 DNA 成不同浓度 (5fg/ml, 50fg/ml),用 ATP 合成法检测不同浓度 DNA,结果如图 6 所示,灵敏度 5fg/ml。

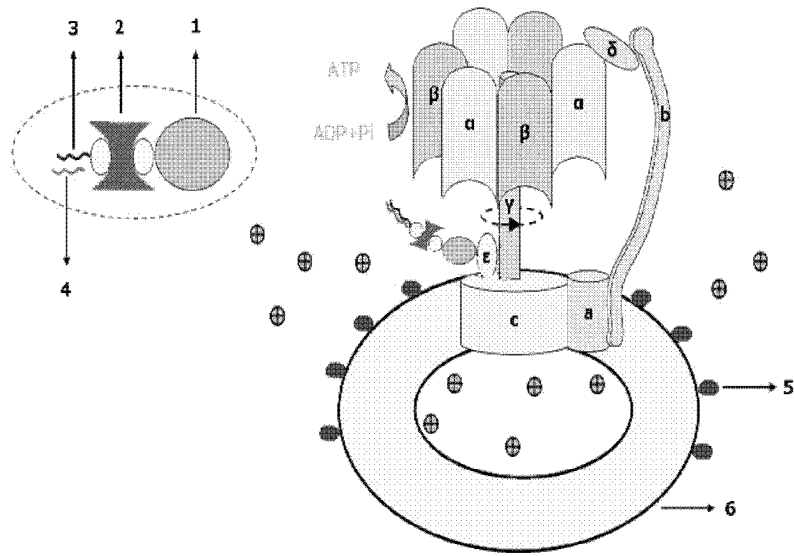


图 1

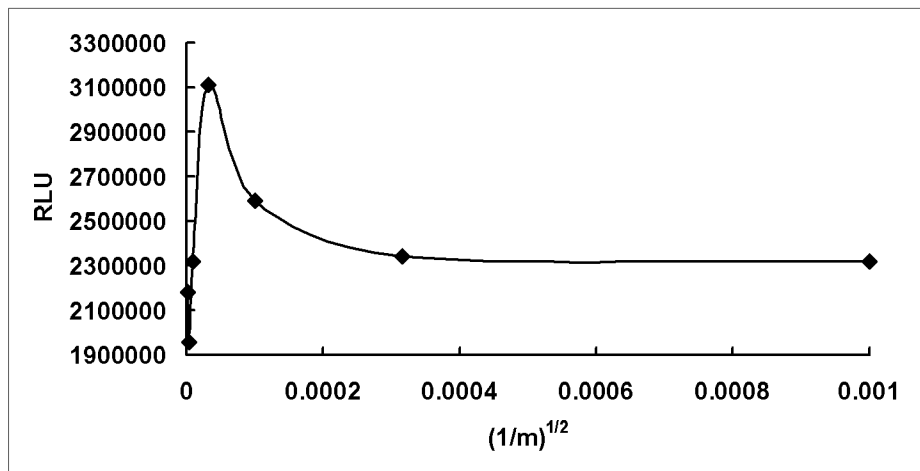


图 2

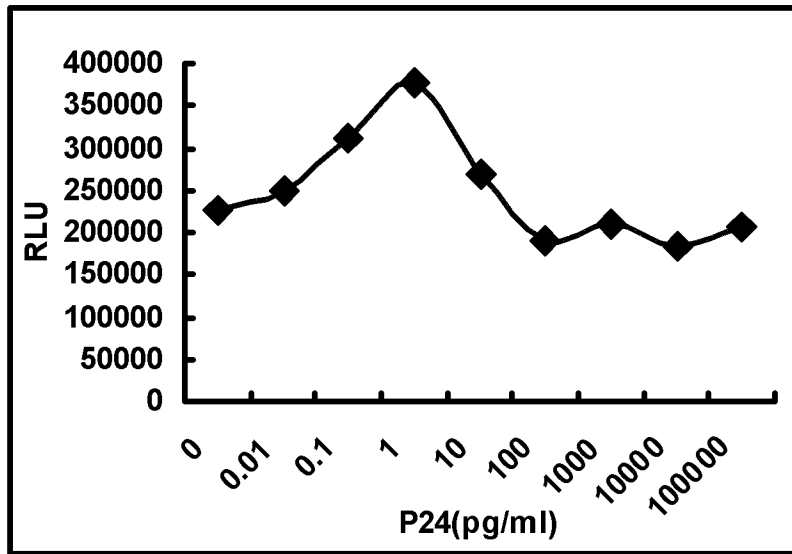


图 3

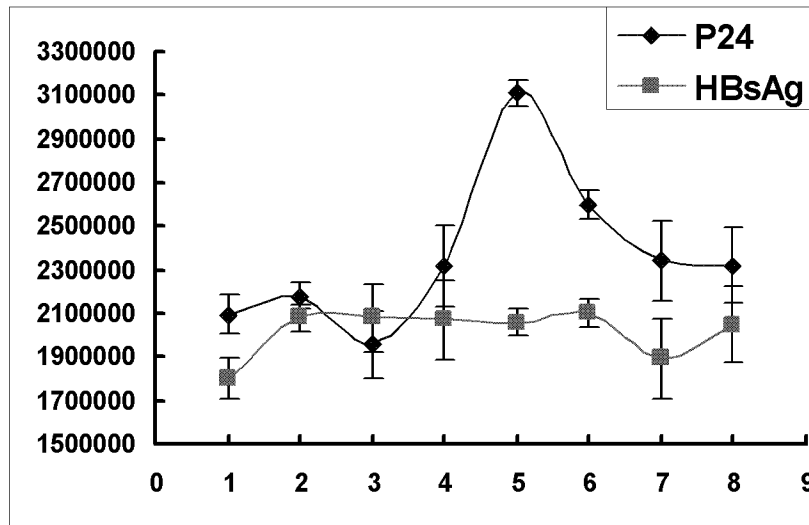


图 4

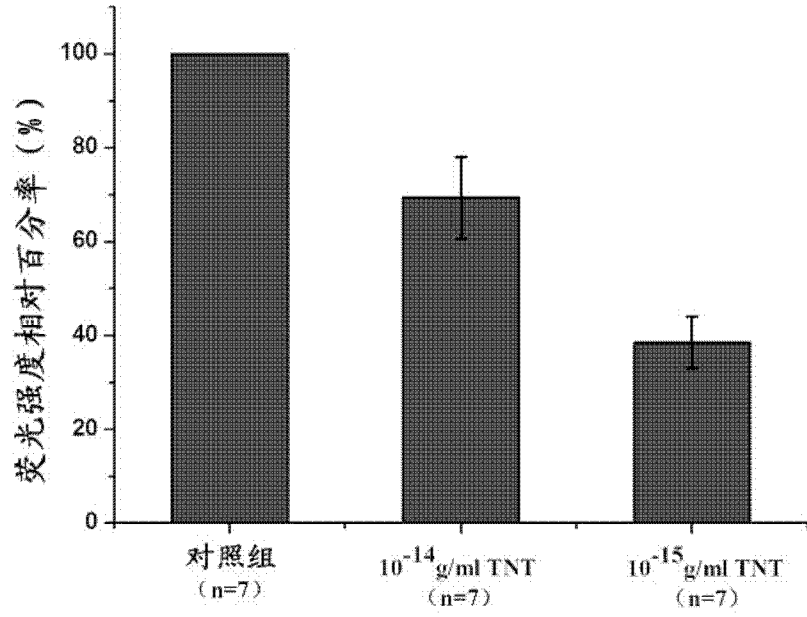


图 5

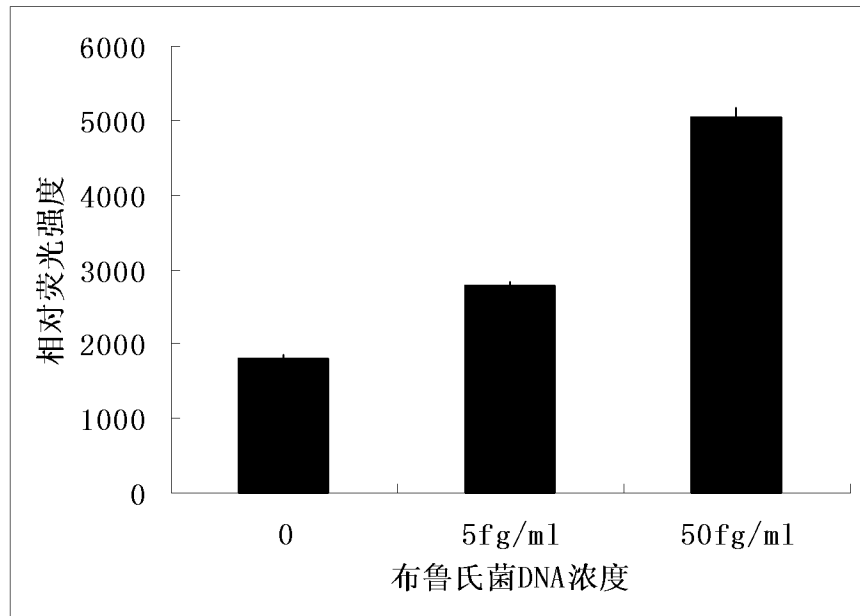


图 6