

[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 200410098929.9

[51] Int. Cl.

C12Q 1/25 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

[43] 公开日 2006年6月21日

[11] 公开号 CN 1789425A

[22] 申请日 2004.12.16

[21] 申请号 200410098929.9

[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

[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2页 说明书10页 附图9页

[54] 发明名称

可调控分子马达微动力生物传感器

[57] 摘要

本发明属于纳米器件动力引擎的纳米生物传感器领域，更具体地涉及一种可调控分子马达微动力生物传感器。另外，本发明还涉及该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。本发明用荧光探针作为分子马达旋转的灵敏信号传感器，并利用抗体技术实现对分子马达旋转的调控。本发明提供的分子马达微动力生物传感器具有灵敏度高、可调控等优点，有望发展成新一代微动力分子传感器，有极其广泛的应用和巨大的经济与社会效益。

1. 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；
 - 5 (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；
 - 10 (7) 支架材料和双层脂膜的固定材料。
2. 按照权利要求 1 的分子马达微动力生物传感器，其中所述荧光探针是位于膜外侧的 Lipids-荧光素。
3. 按照权利要求 1 的分子马达微动力生物传感器，其中所述荧光探针是位于膜内侧的荧光素。
- 15 4. 按照权利要求 1-3 中任何一项的分子马达微动力生物传感器，其中所述分子马达旋转是由 ATP 水解驱动的。
5. 按照权利要求 1-3 中任何一项的分子马达微动力生物传感器，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。
6. 按照权利要求 5 的分子马达微动力生物传感器，其中所述跨膜电
20 化学电位差是由光能或化学能转换的。
7. 按照权利要求 1-6 中任何一项的分子马达微动力生物传感器，其中将 F_0F_1 -ATP 酶的 β 亚基与该 β 亚基的抗体（第一抗体）结合，和备选地进一步与第二抗体（特异性识别第一抗体的 IgG）结合来调控分子马达的旋转速度。
- 25 8. 按照权利要求 1-7 中任何一项的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，其中
 - (1) 将按照权利要求 1-7 中任何一项的分子马达微动力生物传感器与生物大分子、病毒分子特异性抗原的抗体结合；
 - (2) 将（1）中获得的分子马达微动力生物传感器与待测样品接触；
 - 30 (3) 比较（2）中获得的分子马达微动力生物传感器和未与待测样

品接触的分子马达微动力生物传感器在光激发下的荧光强度。

9. 按照权利要求 8 的应用，其中所述分子马达微动力生物传感器是通过 β 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结合。

可调控分子马达微动力生物传感器

5 技术领域

本发明属于纳米器件动力引擎的纳米生物传感器领域，更具体地涉及一种可调控分子马达微动力生物传感器。另外，本发明还涉及该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。

10

背景技术

无论电子器件的发展、化学反应机理的研究还是对生命过程的认识，当今科学技术已全面进入微纳尺度时代，奇特功能的分子马达是新型的纳米机械材料等新技术的生长点，生物马达—纳米器件的动力引擎，纳米器件要投入实用，离不开能量的传递，也就是说需要分子数量级的微小马达。

有些技术革命是以新发现的能量—机械功转化的方式标志，例如蒸汽机的发明驱动了工业革命。分子马达（纳米马达）这一最新发现的能量转化技术，毋庸置疑地将会驱动一场不亚于工业革命的另一场革命—纳米器件革命，从而将人类带入一个崭新的纪元。

现阶段合成纳米马达刚刚处于雏形，所以目前人类还没有能力制造纳米引擎。但是大自然已经给我们提供了能够高效率地执行特定功能的生物纳米马达。生物马达产生动力的机理研究是当今科学研究最激动人心的领域。

25 生物膜中的 F-ATP 酶分子马达是多亚基复合物（如图 1），膜区部分的基本组成为： $a:b:c = 1:2: 10^{12}$ ，称为 F_0 -ATP 酶； F_1 在膜区外与 F_0 相偶联，称 F_1 -ATP 酶； F_1 -ATP 酶分子马达的组成： $\alpha:\beta:\gamma:\delta:\epsilon = 3:3:1:1:1$ 。 F_0F_1 -ATP 酶当质子从膜内向膜外流动时通过 F_0 -C 环旋转启动 F_1 的 γ 亚基顺时针方向而旋转运动，并在 F_1 部分的三个催化位点上将 ADP 和无机磷
30 合成 ATP；反之，当 F_1 水解时， $\alpha_3\beta_3$ 驱动 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 、 ϵ 和 c 环的 F_0 ，偶联启

动反时针方向旋转，将质子从细胞膜外向细胞膜内转运，因此 F_0F_1 -ATP 酶是一对互为可逆分子机器。在生理条件下， F_0F_1 -ATP 酶在线粒体内主要进行氧化磷酸化，在光合菌中进行光合磷酸化，分别将电子能（或光能）转化成质子梯度差，驱动 ATP 合成（*Trends in Biochemical Sciences*, 卷 27, 2002, 154-160）。

自 1997 年日本科学家公开世界上最小、最快、效率最高的旋转马达之后，世界上已有多个实验室重复和发展了分子马达的研究成果（*J. Biol. Chem.*, 276, 1665-1668, 2001）。上述研究用荧光标记的蛋白微丝（大约 1-2 μM 长度）连接到分子马达的 γ 亚基上，在荧光显微镜直接观察分子马达的旋转。但由于蛋白微丝（大约 1-2 μM 长度）对于 10 nm 的分子马达来说显然是很大的负荷，检测的灵敏度低，且不可调控。因此，尽管分子马达具有重要的应用前景，但是存在两个关键问题：（1）缺乏对分子马达的调控技术；（2）不能灵敏地将分子马达旋转的信号传递出来。这限制了分子马达研究和应用领域的发展。

15

发明内容

针对上述研究背景，本发明人深入研究，用荧光探针作为分子马达旋转的灵敏信号传感器，在不需要外接很重的负荷下就可以方便地获得分子马达的旋转信号，并利用抗体技术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件的应用。

因此，本发明的一个目的是提供一种可调控分子马达作为微动力生物传感器件（如图 2），其包含以下部分：

- （1）旋转马达： F_0F_1 -ATP 酶，如图 2 中的 3 和 4 所示；
- （2）光能转换装置：光反应中心与复合物（RC）和泛醌，如图 2 中的 9 所示；
- （3）电子转换装置：与光能转换装置为同一体系，如图 2 中的 11 所示，例如以复合物（Chromatophores）为例，其本身含有直径为大约 30-60 nm 的双层磷脂酶体，内有一个 F_0F_1 -ATP 酶，6-11 个 RC 光能转换复合物；
- （4）信号分子输出装置：是由光激发与发射装置（如图 2 中的 10

30

所示)和荧光探针(如图2中的5所示)组成;

(5) 能源系统: 由水, ATP, ADP, 无机磷, 和可见光组成(如图2中的12所示);

(6) 保护层: 双层脂膜作位内膜的功能性的保护层(如图2中的6所示);

(7) 支架材料和双层脂膜的固定材料: 分别如图2中的7和8所示。

在本发明的一个优选实施方案中, 上述荧光探针是位于膜外侧的Lipids-荧光素(DHPE, (Fluorescein(N-(fluorescein-5-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine triethyl-ammonium salt)(Molecular Probes 公司, 美国, F362)。Lipids-荧光素可以特异性地标记到细胞膜外侧, 其对环境 pH 变化极其敏感(Biochem, biophys, Acta 939, 289, 17, J. phys Chem. 81, 1755 (1977))。当标记在细胞膜外侧时, ATP 酶水解导致 F_1 -ATP 马达逆时针旋转, 同时将质子向细胞膜内转运, 使胞外的 pH 值上升, 在光激发下Lipids-荧光素的荧光信号增加。反之, 荧光素荧光信号降低。在本发明的另一个优选实施方案中, 上述荧光探针是位于膜内侧的荧光素(Molecular Probes 公司, 美国, F1300, fluorescein)。当将荧光素特异性地标记在细胞膜内侧时, 分子马达旋转水解导致质子向细胞膜内转运, 使胞内的 pH 值降低; 反之当 ATP 合成时, 质子向细胞膜外转运, 使胞内的 pH 值升高, 同样可以得到类似的结果。因此用该细胞膜单向 pH 值荧光探针技术可以将荧光强度与分子马达的旋转(或称质子转移能力)直接相关(如图3所示)。

在本发明的一个实施方案中, 分子马达旋转是由 ATP 水解驱动的。

在本发明的另一个实施方案中, 分子马达旋转是由能转换的跨膜电化学电位差驱动的。所述跨膜电化学电位差是由光能或化学能转换的。

在本发明的另一个实施方案中, 通过将 F_0F_1 -ATP 酶的 β 亚基与该 β 亚基的抗体(第一抗体)结合, 和备选地进一步与第二抗体(特异性识别第一抗体的 IgG)结合来调控分子马达的旋转速度。

本发明还提供上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，其中

(1) 将按照权利要求 1-7 中任何一项的分子马达微动力生物传感器与生物大分子、病毒分子特异性抗原的抗体结合；

5 (2) 将 (1) 中获得的分子马达微动力生物传感器与待测样品接触；

(3) 比较 (2) 中获得的分子马达微动力生物传感器和未与待测样品接触的分子马达微动力生物传感器在光激发下的荧光强度。

在本发明的一个实施方案中，所述分子马达微动力生物传感器是通过 β 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结合。

本发明提供的分子马达微动力生物传感器具有灵敏度高、可调控等优点，在经过适当修饰后（如结合生物大分子、病毒分子特异性抗原的抗体），可以在单分子水平上检测目标生物大分子或病毒分子等。本发明的分子马达微动力生物传感器有望发展成新一代微动力单分子传感器，

15 将使生物传感器的功能材料、纳米器件的制造技术水平跃上一个新台阶，并推动生物芯片、生物医药、环境、国防、能源、信息等众多领域的革命性进步，有极其广泛的应用和巨大的经济与社会效益。

附图说明

20 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。

图 1 是 F_0F_1 -ATP 分子马达的主要组成；

图 2 是本发明分子马达微动力生物传感器的示意图（1：待测的样品（抗原）；2： β 亚基抗体；3： F_1 -ATP 马达；4： F_0 -ATP 马达；5：信号分子（荧光探针）；6：脂双层；7：支架；8：固体表面；9：光能转换装置；

25 10：光能激发装置；11：电子转换装置；12：能源 ATP/ADP 和 H^+ ；13：微反应器的池体积与包裹（如 96 孔平板，荧光显微镜的样品池与盖等）；

图 3 是 Lipids-荧光素信号与 F_1 -ATP 酶分子马达旋转的偶联（ H^+ 浓度/荧光信号单方向标记在细胞内侧与分子马达旋转的偶联 A：ATP 水解前 B：ATP 水解后；图中小红点表示荧光分子单方向标记）；

30

图 4 是可调控分子马达微动力生物传感器的组装与工作原理;

图 5 是样品的测定过程;

图 6 (a) 是外侧荧光标记的荧光强度与 pH 值之间的关系; (b) 是外侧
5 侧荧光标记的荧光强度与 Na_2NO_3 浓度之间的关系; (c) 外侧荧光标记的
荧光强度与不同抑制剂之间的关系; (d) 内侧标记的荧光素的荧光强度
变化与 pH 值之间的关系 (pH 从左到右

4.2;5.0;5.4;6.0;6.4;7.0;7.4;7.8;8.2;8.6, 在 0.1 mM Tricine 缓冲体
系中);

图 7 (a) 是在不同负荷下 F_0F_1 -分子马达旋转速度的变化的曲线图 (C:
10 对照: 转运 120 个 H^+ /秒 (计算值); B: 加一抗后, 60 转/秒; A: 加一
抗和二抗后, 12 转/秒) (图从上到下分别为 A, B, C); (b) 是在不同负
荷下 F_0F_1 -分子马达旋转速度变化的柱形图 (10 个样品的平均值);

图 8 是光启动旋转研究的模式图 (体系建立过程中 F_0F_1 的模式图: A
表示完整的 F_0F_1 ; B 表示用 EDTA (10 mM) 处理使 F_0F_1 失去 F_1 -ATP 亚基; C
15 表示离心分离得到完整 F_1 ; D: 表示失去 δ 亚基后的 F_1 ; E 表示 F_0 与失
去 δ 亚基的 F_1 复合后的 F_0F_1 分子马达旋转实验体系);

图 9 表示光激发启动 F_0 -c- F_1 分子马达旋转的特异性检测病毒方法的
实验示意图。

图 10 光激发启动 F_0 -c- F_1 分子马达旋转的特异性检测病毒方法结果。

20

具体实施方式

为了更好地理解本发明, 下面通过实施例予以进一步的举例说明,
但所举实施例并非是对本发明进行限定。

实施例 1 可调控分子马达微动力生物传感器的组装

25 如图 4 所示, 进行分子马达微动力生物传感器的组装。

(1) 分子器件光合作用的复合物 (Chromatophores) 制备

培养光合作用细菌 (*R. Capsulatus*, I 20 来源于中科院微生物所细
胞库, (保藏号 1.2359))。培养基: KH_2PO_4 , 1.0 g, MgCl_2 0.5 g, CaCl_2 ,
0.1g, NaCl 1.0 g, 醋酸钠 1.0 g, 琥珀酸钠 1 g, 酵母膏, 1.0 g, NaHCO_3
30 0.5g, 蛋白胨 0.5 g (OXOID 英国), 微量元素 1.0 ml, 维生素液 1.0 ml,

蒸馏水 1.0 L, pH 6.8, 8 磅, 高压灭菌 30 分钟。维生素液成分: 生物
素 0.1 g (进口分装), 烟酸 0.35 g, 烟酸硫胺素(Thiamine dichloride)
0.3 g, 泛酸钙(Ca-panthothenate) 0.1 g, 维生素 B₁₂(Vitamin B₁₂, 0.05
g, 盐酸吡多胺(Pyridoxolium Hydrochloride, Fluka) 0.1 g, 蒸馏水
5 1.0 L;微量元素成分: FeCl₂ 4H₂O 1.8 g; CoCl₂ 6H₂O 0.25 g; NiCl₂ 6H₂O,
0.01 g; CuCl₂ 2H₂O 0.01 g, MnCl₂ 4H₂O 0.07 g; ZnCl₂ 0.1 g, B₃PO₄ 0.5
g, Na₂SeO₃5H₂O 0.01 g, NaMoO₄ H₂O 0.03 g, 蒸馏水 1.0 L) 温度 30-35
°C。收获: 细菌的培养温度为 28°C, 在光照(4,000 Lx)下培养 5-7 天, 5000
g 离心收集。载体(Chromatophores)的提取: 样品用 TS 缓冲液(50 mM,
10 Tricine (三(羟甲基)甲基甘氨酸, Amresco 进口分装) pH 8.0, 0.25 M
蔗糖; 5 mM MgCl₂)洗涤一次, 然后再加入 15 ml 的 TS 缓冲液, 悬浮后, 加
入 1 mg/ml 的溶菌酶(sigma 分装), 在冰中孵育 30 分钟, 超声(20% 振
幅, Cole Parmer CPX 600 超声仪 13#探头, 昆山市超声仪器公司 KQ218 型
超声仪) 10 分钟, 25,000 g 离心 30 分钟, 保留上清, 再将上清 180,000 g
15 在 4°C 离心 90 分钟, 沉淀为载色体(Chromatophores)。此复合物为含
一个分子马达 F₀F₁-ATPase, 多个光转换载体(图 2 中部分的 3, 9)。

(2) 荧光探针的单方向标记

在上述复合物中加入荧光(商品号:F-362 分子探针公司荧光素 DHPE
(荧光素-磷脂))作为细胞外的荧光发射体, (F1300, 分子探针公司荧
20 光素, 作为细胞内的探针), 剩余的通过离心(10000 g/30 min, 4°C)
洗去。

(3) 双层脂膜的制备

用大豆磷脂制备, 将 100 mg 纯化的大豆磷脂溶于三氯甲烷, 用氮气
吹干, 后再加入适量的乙醚振荡, 用氮气吹干, 盖好密封, 保存于-20°C,
25 取一小瓶(20 mg)已处理好的磷脂, 加入 1 ml Tris 缓冲液, 用 Cole Parmer
CPX 600 超声仪 13#探头冰浴超声 3-5 分钟(振幅 5%-10%之间)至悬液
透明, 为脂质体。

(4) 光能转换装置

由生物与化学分子复合材料组成: 如 LH1RC 和泛醌(光反应中心与复
30 合物 1, 从光合菌 *R. Rubrum*, ATCC No: 11170 中提取, 泛醌(Qb, Sigma,

产品) 纯化, 按文献 Nadia Gabellini 等 Biochimica, Biophysica Acta, (1989) 974, 202-210 的方法重组, 或 biochim. biophys. Acta, (1989), 202-210 的方法重组)。

(5) 支架材料与双层脂膜固定

- 5 固体表面 (如玻璃), 先用多聚赖氨酸涂铺, 然后用生物素-AC₅-sulfo-0su (Dojindo, Japan) 连接后再用链霉抗生物素-连接, 双层脂膜装有-脂-生物素, (PE-生物素 (Avidin 公司产品), 溶于乙醇 (1 mg/ml, 2 μ l), 加入到双层脂膜 (20 mg/ml) 中约 2-3 分钟后, 用 10,000 g/30 min 离心一次, 将装有双层脂膜的装有-脂-生物素的样品与固体表面
- 10 的链霉抗生物素-连接。根据需要, 用 β 亚基抗体与 F₁-ATP 马达的 β 亚基专一性结合, 用另一 IgG (羊抗兔, sigma, 进口分装) 二抗可以特异性识别 β 亚基的一抗, 这样就组成了一对负荷只差别三个分子的分子马达 (3 个 β 亚基)。

由此完成本发明分子马达微动力生物传感器的组装。

15 实施例 2 零负荷下分子马达微动力生物传感器的荧光信号

(1) 传感器检测的方法

- 将样品分别装在玻璃表面/或装入荧光池 (1ml) (日立仪器, F-4500 型号), 在 488 nm 下激发, 520 nm 为发射波长; 当样品在 2 mM ATP (sigma 公司) 启动下, 本发明的分子马达将细胞外的质子向细胞内转运, F₁ 逆
- 20 时针方向旋转, 可使细胞外的 pH 从 8.0 增加到 9.0, 这时荧光探针 Lipids-荧光素组装在细胞膜外侧 (或内侧), 可以方便地将信号记录下来, 如果这时分子马达载重不同的负荷, 如带有一分子的抗体时其旋转的速度就可以产生明显的变化, 该变化用组装在细胞膜外侧 (或内侧) 的荧光探针 Lipids-荧光素 (或荧光素) 就能方便地记录下来。

25 (2) 零负荷下 F₁ 逆时针方向旋转的证明

- 跟据分子马达工作原理, F₀F₁-马达为可逆机器, 当 ATP 水解成 ADP 和磷时, 三个 β 亚基分别处于三个不同的构象, 三个不同的构象驱动 γ 亚基逆时针旋转, 并且伴随着质子从细胞外向细胞内转移; 反之, 当跨膜质子转运通过 F₀ 驱动 F₁-顺时针方向旋转, 并将 ADP 和磷合成为 ATP,
- 30 成为生命过程中的“货币”。因此, 本体系中当 ATP 水解成 ADP 和磷时,

伴随着质子从细胞外向细胞内转移；这时溶液环境中的 pH 值就会改变，而且随 F_1 -逆时针方向旋转数增加，荧光值也增加。另外 ATP 酶的抑制剂对分子马达的旋转也会产生影响，从而影响荧光值（除非另外指出，本发明以外侧标记的荧光探针 Lipids-荧光素为例，如图 6 (a), (b) 和 5 (c)）。

从图 6 (a), (b) 和 (c) 可以看到，探测分子马达旋转的生物传感器的探测原理是：分子马达旋转速度与 F_0F_1 -分子马达直接偶联相关。图 6(a)表示了荧光强度与 pH 直接相关；图 6(b)说明荧光强度变化与 Na_2SO_3 浓度关系相关， Na_2SO_3 是 F_1 -ATP 酶的激活剂；图 6 (c) 不同 ATP 酶激活剂 10 和抑制剂对荧光强度的影响， NaN_3 是 F_1 -ATP 酶的抑制剂，PNP-AMP 是 F_1 -ATP 酶的抑制剂，DCCD（二环己基碳二亚胺）是 F_0 离子通道的抑制剂，因此，上述主要抑制剂都能抑制 Na_2SO_3 激活，并与质子通道相关。说明本方法荧光探针与单方向标记与 F_0F_1 -ATP 马达的偶联可以作为 H^+ -ATP 酶离子通道（分子马达）的生物传感器。

15 当使用内侧标记的荧光素时，可获得类似的结果，如图 6 (d) 所示。

实施例 3 不同负荷下分子马达微动力生物传感器的荧光信号

β 亚基抗体的制备：嗜热菌 *Bacillus*, PS3 的表达与 β 亚基纯化参照文献(科学通报, 2004, (13)1342-1347)进行，将纯化的 β 亚基用完全佐剂以 1:1 乳化后，在 250g 家兔背部多点免疫(开始每两周注射 1 ml)，20 一个月后，再加强免疫 1-2 次，得到多克隆抗体。

在实施例 1 中组装的分子马达微动力生物传感器基础上，用 β 亚基抗体与 F_1 -ATP 马达的 β 亚基专一性结合，用另一 IgG（羊抗兔，sigma，进口分装）二抗可以特异性识别 β 亚基的一抗，这样就组成了一对负荷 25 只差别三个分子的分子马达（3 个 β 亚基）。

依据实施例 2 所述的检测方法，测定在不同负荷下分子马达微动力生物传感器的荧光信号（如图 7 (a) 和 7 (b)）。分子马达平均旋转速度的推算方法：用样品取 20 μ l 长，直径 0.289 mm 的毛细管(micropipets vwr Scientific 公司产品)离心 15,000 转/90 min 得到，压塑体积比为 2.5:38，30 计算 1 μ l 溶液的细胞为 1.2×10^{12} 个，直径为 60 nm，已知样品的浓度

和体积和 pH 值的变化, 就可以推算出平均旋转速度 (每秒转运 H^+ 数)。(C= $F^2/2.3RT \times \beta$, 其中 $\beta = -\Delta [H^+ \text{总量}]/\text{pH}$, Biophysical Journal, (86), 2004, 4094-4109)

图 7 (b) 进一步说明, 当分子马达连接不同负荷如一抗、一抗加二
5 抗时, 其旋转速度就产生明显变化, 同时荧光强度也产生明显变化。因此, 通过改变分子马达的负荷就能控制分子马达的旋转, 实现对分子马达的调控。

实施例 4 光激发分子马达的旋转和分子马达特异性检测病毒

10

为了证明光激发驱动分子马达的旋转, 用光激发跨膜质子转运启动 F_0 调控 F_1 旋转并检测在不同负荷条件下旋转速度的变化, 我们将 F_1F_0 -ATP 分子马达的结构进行如图 8 所示修饰。

所用材料为细菌 pSWM92/DK8 表达的 δ W28L, F_1 是 A. E. Senior 教授 (美国 Rechester, 大学医学中心) 赠送。 F_1 的纯化和 δ 去除按文献
15 Senior: Jaachim Webber, Susan Wilke, Mount, 和 Alan E. Senior, Quantitative Determination of Binding affinity of Subunit in *E. Coli*, F_1 -ATPase, J.B.C. 272(21): 18390-18396 (2002), 并与去除 F_1 的 chromatophores 杂交后将样品在 -20°C 下保存。

20 在该实验体系中缺少了 δ 亚基后, 质子梯差启动 F_0 旋转与 F_1 偶联过程中, 不能进行 ATP 合成, 而是质子梯差的能量传递给 F_1 产生转动量 (体系中加入 NaN_3 和 ATP, 目的是抑制 ATP 的水解)。当光启动 (用 550 nm 以上的波长, 光照 20 分钟) 光合菌中的电子转移时, 并偶联质子从胞外向胞内转移, 形成跨膜梯差, 当停止光照后, 跨膜梯差启动 F_c -和 F_1 - $\alpha_3\beta_3\gamma$ - ϵ
25 ϵ 旋转, 该体系的旋转与 F_1 上的负荷直接相关。当 F_1 与禽流感病毒 β 亚基抗体 (预先结合生物素) 与链霉抗生物素-连接, (该链霉抗生物与生物素素素- F_0F_1 -ATP 马达预先结合在玻璃表面)。

另外病毒分子 (禽流感病毒 (H9)): 哈尔滨兽医研究所提供抗体, 禽流感病毒样品的制备与纯化按文献 (动物病毒学, 科学出版社, (1997),
30 殷震, 刘景华主编) 预先与生物素连接后, 加入上述 F_0F_1 -ATP 马达-生物

素-链霉抗生物素-生物素-病毒体系(见图 10), 荧光信号观察: 用 opton Axiovert 405M, 倒置荧光显微镜, CCD Princeton instrument 公司, Model: RTE/CCD-782, 中科院西安精密光学研究所生产像增强器, G2 II 18/18。

- 5 如图 9 所示, C (对照) 的荧光强度在 10 分钟后下降大约 30%, 该结果说明 F_0 驱动 F_1 旋转, 同时质子从胞内向外转运, 使体系的荧光强度发生下降; DCCD, 在体系中加入 2 mM DCCD, 阻断 F_0 的质子通导, 这时体系的荧光强度在 15 分钟后看不到变化; 病毒, 禽流感病毒 H9 (按文献方法得到), 用禽流感病毒的抗体与生物素结合后再与 β 亚基抗体上的链霉
- 10 抗生物素结合, 洗去多余生物素, 然后用禽流感病毒与禽流感病毒的抗体产生特异性的结合, 用 PBS 洗去非特异性部分, 这时虽然存在质子从胞内向外转运, 但是 F_1 的负载使 F_1 旋转速度变慢, 从而调控 F_0 的质子通导的转运, 这时体系荧光强度看不到变化。因此与光激发启动 F_1 旋转与其负荷直接相关 (上述实验以 10 个样品的平均值)。本实施例证明本发
- 15 明的分子马达微动力生物传感器可以用于在单分子水平上检测病毒及大分子。

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。

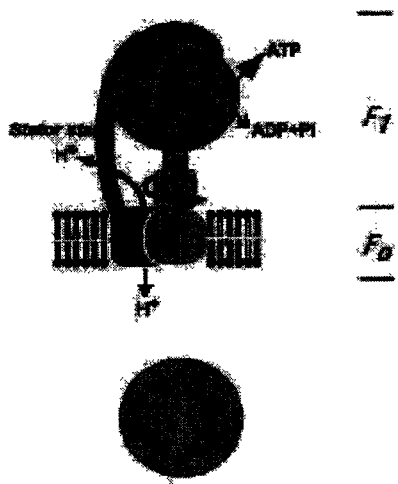


图 1

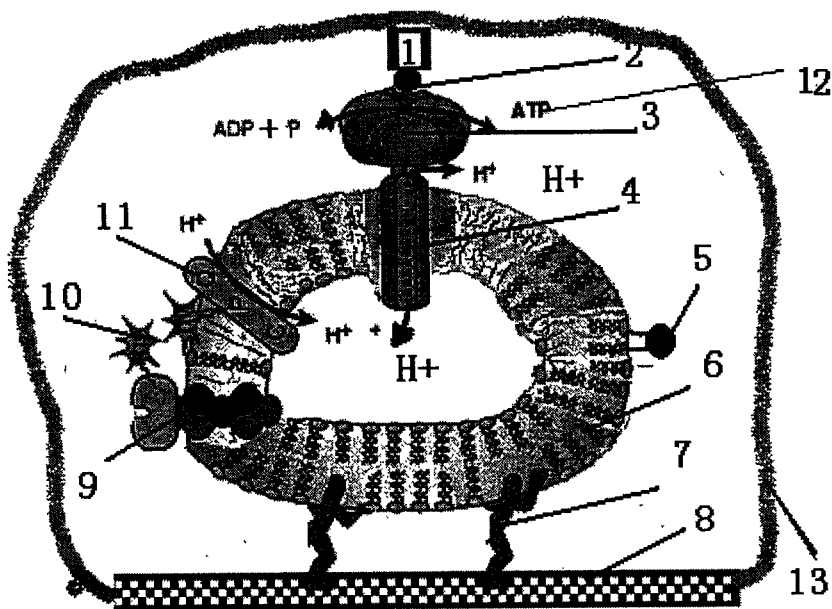
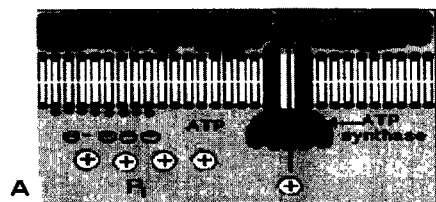
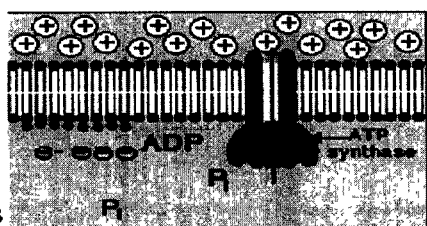


图 2

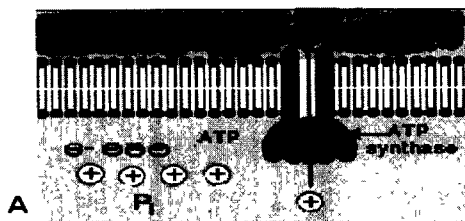


A

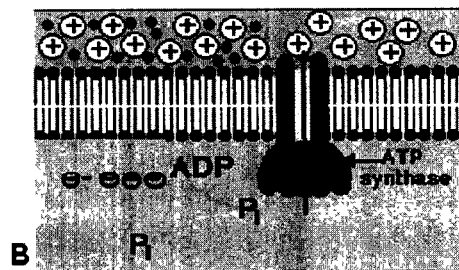


B

(a) 外侧荧光标记



A



B

(b) 内侧荧光标记

图 3

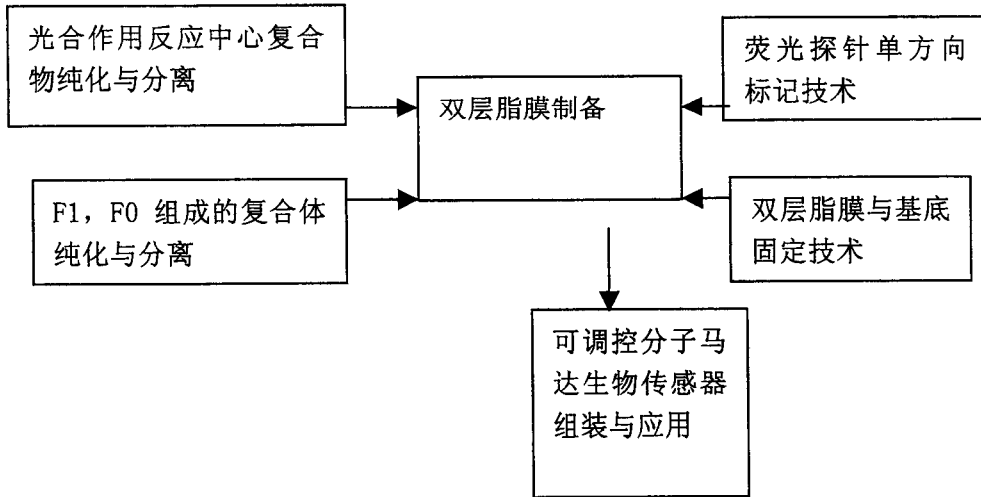


图 4

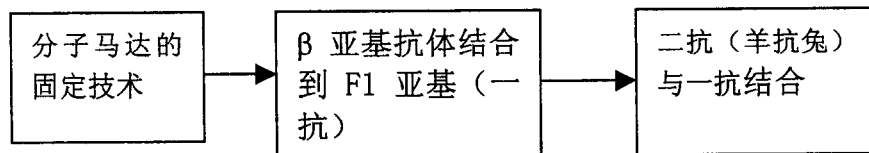


图 5

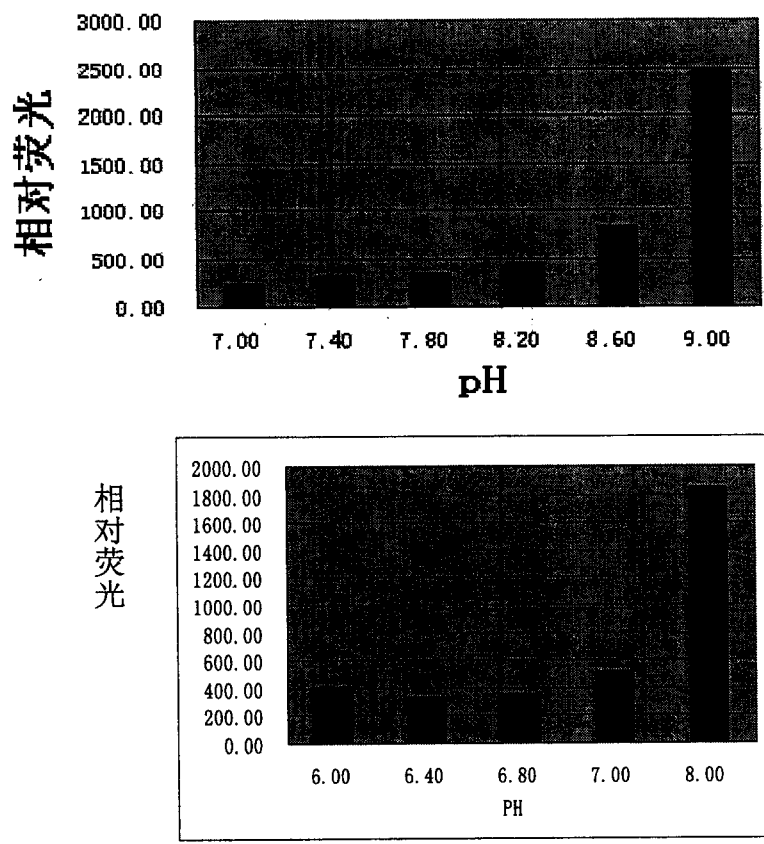


图 6 (a)

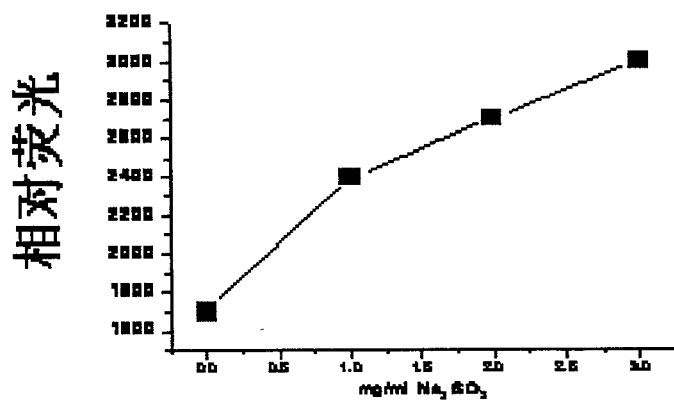


图 6 (b)

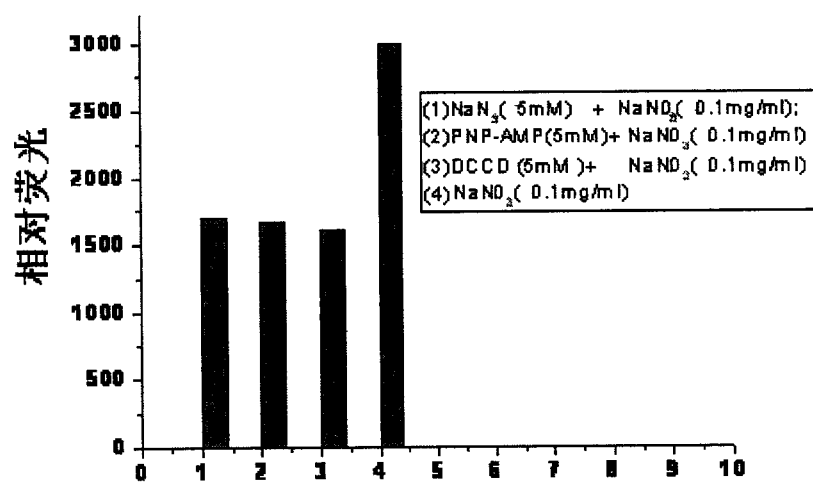


图 6 (c)

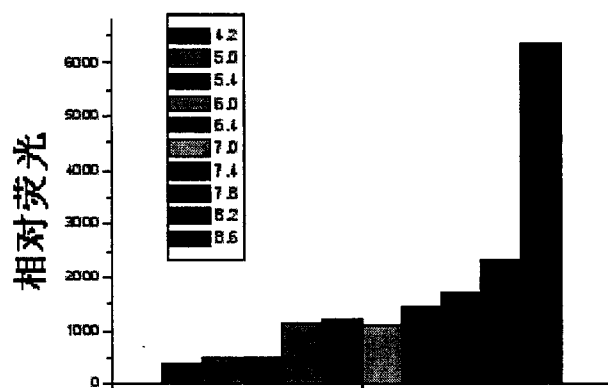


图 6 (d)

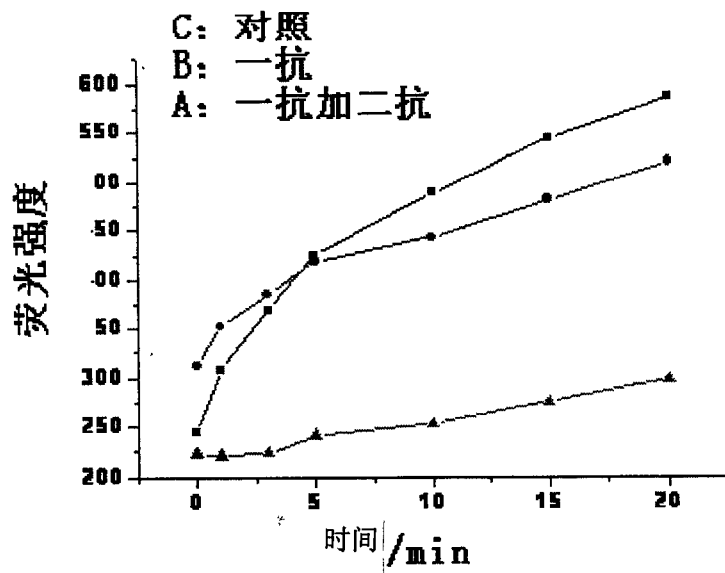


图 7 (a)

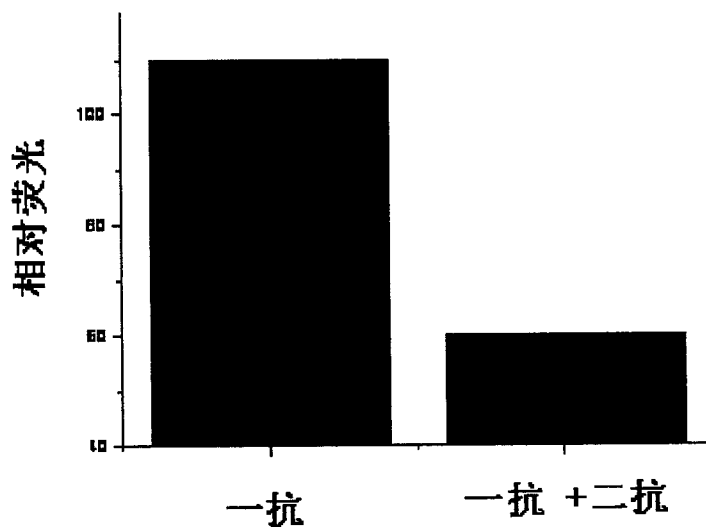


图 7 (b)

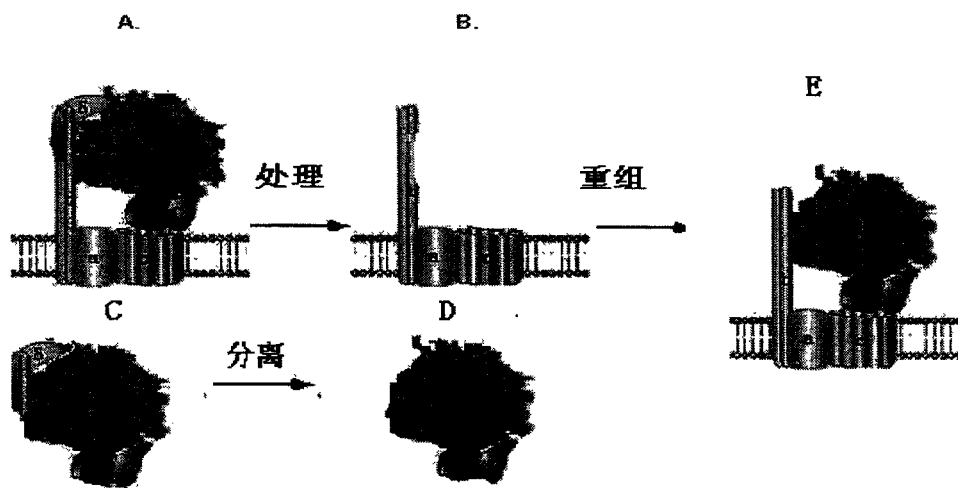


图 8

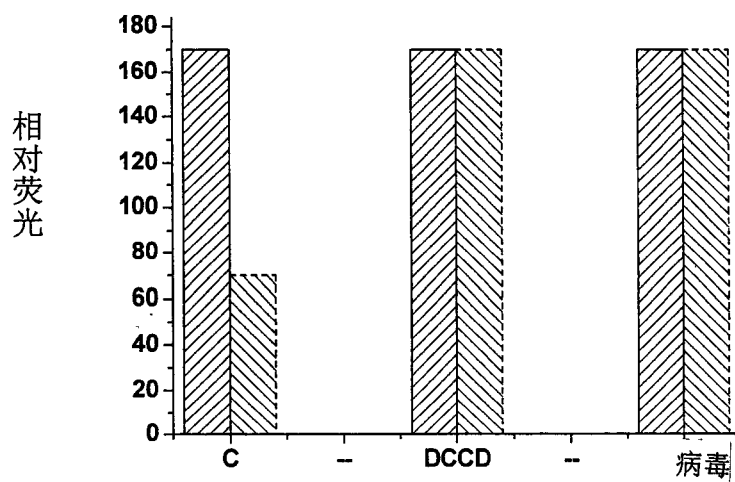


图 9

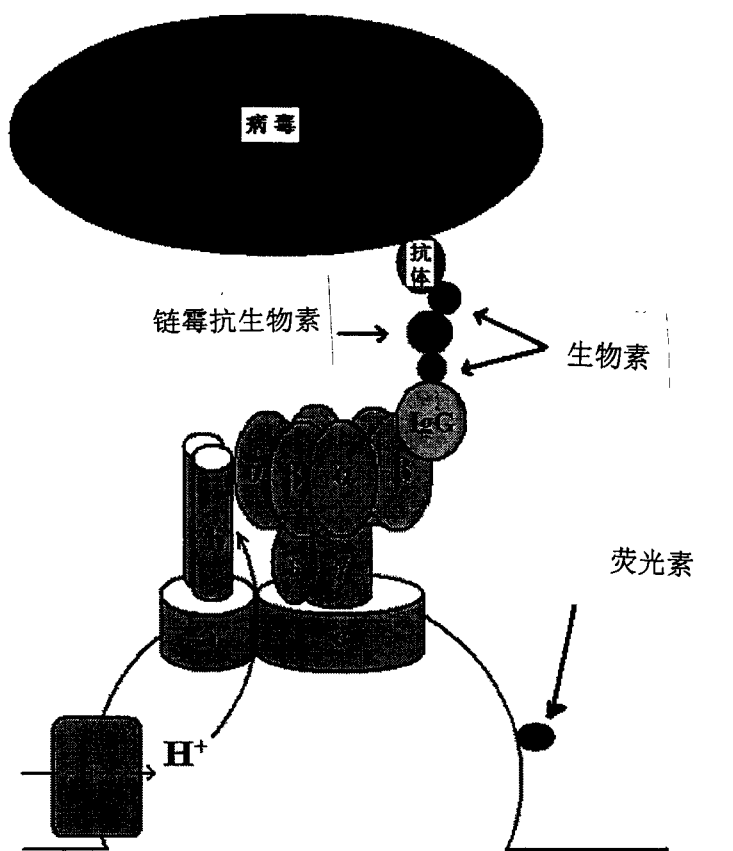


图 10