



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101744645 A

(43) 申请公布日 2010.06.23

(21) 申请号 200810240365.6

(22) 申请日 2008.12.17

(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

申请人 中国科学院武汉病毒研究所

(72) 发明人 乐加昌 陶宁 张先恩 李峰

(51) Int. Cl.

A61B 17/00(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

A61M 31/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 12 页

(54) 发明名称

纳米生物机器人及其应用

(57) 摘要

本发明从纳米生物机器人的角度,构建分子马达驱动的,以血栓抗体为导向的辅助快速溶栓的纳米机器人,通过分子马达在血栓局部的快速旋转,产生类似于微动力搅拌器的效应,并采用光驱动分子马达,实现纳米生物机器人的可调控性,加快药物与纤维蛋白的接触,实现纳米生物机器人的生物机械力学效应与药物酶解作用的协同,加速纤维蛋白溶解。

1. 一种纳米生物机器人,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 不含 δ 亚基,并且所述 F_0F_1 -ATPase 的 α 或 β 亚基上连接有纳米蛋白粒子。
2. 根据权利要求 1 的纳米生物机器人,其中所述 α 或 β 亚基是经由抗 α 或 β 亚基抗体与所述纳米蛋白粒子连接,其中所述抗 α 或 β 亚基抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。
3. 根据权利要求 2 的纳米生物机器人,其中所述抗 α 或 β 亚基抗体是通过生物素-链酶抗生物素-生物素与所述纳米蛋白粒子连接。
4. 根据权利要求 1 的纳米生物机器人,其中所述纳米蛋白粒子的粒径在 10nm 至 100nm 范围内,优选在 20nm 至 50nm 范围内。
5. 根据权利要求 1 的纳米生物机器人,其中所述纳米蛋白粒子进一步与一个 DNA 片段连接。
6. 根据权利要求 1 的纳米生物机器人,其中所述纳米蛋白粒子进一步与一个 DNA 片段连接,所述 DNA 片段与另一个 DNA 片段结合,所述另一个 DNA 片段的 5' 和 3' 端的序列分别与所述纳米蛋白粒子上的所述 DNA 片段互补。
7. 根据权利要求 1 的纳米生物机器人,其中所述载色体进一步与导向分子连接。
8. 根据权利要求 7 的纳米生物机器人,其中所述导向分子是抗体或核酸,优选所述导向分子是纤维蛋白原抗体,该纤维蛋白原抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。
9. 根据权利要求 8 的纳米生物机器人,其中所述纤维蛋白原抗体是纤维蛋白原多抗,并且通过生物素-链酶抗生物素-连接脂质的生物素与所述载色体连接。
10. 根据权利要求 1-9 任一项所述的纳米生物机器人在制备辅助药物中的应用,所述辅助药物用于促进活性药物在目标区域的扩散。

纳米生物机器人及其应用

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 马达构建的光驱动纳米机器人的设计,组装及在辅助药物扩散(溶栓)中的应用。

背景技术

[0002] 传统溶栓治疗方法包括药物溶栓、器械辅助溶栓。在急性心肌梗死的抢救治疗中,溶栓治疗是快速恢复心肌血流的有效方法,早期使用溶栓剂治疗可使急性心肌梗塞患者的病死率降低 30% [FEBS. Lett. 2005, 579 (15) :3303-3309]。目前溶栓药物中效果较好的是重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA),该药的主要优点是纤维蛋白的亲和力很高,溶栓速度快;缺点是易被肝脏清除,半衰期短(4 分钟-5 分钟),需要持续静脉滴注,因而用药剂量大、价格昂贵(高达 4000-5000 元/治疗单位剂量),当剂量超过 150mg 时,可因导致血小板聚集而诱发再栓塞、颅内出血等并发症 [N. Engl. J. Med., 1995, 333 (24) :1581-1587.]。

[0003] 器械辅助溶栓方面,介入治疗引人关注 [Nat. Clin. Pract. Neurol. 2007, 3 (1) : 45-53.],随着 Greenfield 首次运用静脉切开导管介入技术治疗肺栓塞,近年来介入技术逐渐进入血管栓塞的治疗领域。在心血管疾病的介入治疗中,通过在股静脉处开一个小口,插入中空的导丝,在 X 光机、核磁共振仪等成像设备的导引下,通过体外操纵导丝到达血管栓塞或狭窄部位,导丝前端可配置球囊、机械穿刺碎栓、血管内膜旋切和旋磨装置,对血栓或狭窄的血管内膜进行治疗,其特点是创伤小、安全可靠,对其适应症疗效明显。但由于传统加工技术在器件尺寸方面固有的局限,因此在导丝前端的可配置器件的设计原理、尺寸大小、动力学特性等方面存在着难以突破的技术障碍,介入治疗的应用范围仅局限于相对较大的血管,技术本身存在一些局限性,例如机械碎栓过程中会产生大量的血栓碎片,其在血管内的四散可能引发其他部位的小血管栓塞,尽管目前在碎栓的同时采取了吸栓的相应措施,但实际尚需进一步完善;而血管内膜旋切和旋磨装置在治疗过程中,可能会导致血管内膜的损伤,从而导致血栓的原位再形成,限制了该技术在临床上的进一步应用。因此美国医学会规定 rt-PA 是目前唯一许可的溶栓治疗措施。

发明内容

[0004] 本发明从纳米生物机器人的角度,构建分子马达驱动的,以血栓抗体为导向的辅助快速溶栓的纳米机器人,通过分子马达在血栓局部的快速旋转,产生类似于微动力搅拌器的效应,并采用光驱动分子马达,实现纳米生物机器人的可调控性,加快药物与纤维蛋白的接触,实现纳米生物机器人的生物机械力学效应与药物酶解作用的协同,加速纤维蛋白溶解。

[0005] 具体地,本发明提供以下各项:

[0006] 1. 一种纳米生物机器人,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 不含 δ 亚基,并且所述 F_0F_1 -ATPase 的 α 或 β 亚基上连接有纳米蛋白粒子。

[0007] 2. 根据以上 1 的纳米生物机器人,其中所述 α 或 β 亚基是经由抗 α 或 β 亚基抗体与所述纳米蛋白粒子连接,其中所述抗 α 或 β 亚基抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。

[0008] 3. 根据以上 2 的纳米生物机器人,其中所述抗 α 或 β 亚基抗体是通过生物素-链酶抗生物素-生物素与所述纳米蛋白粒子连接。

[0009] 4. 根据以上 1 的纳米生物机器人,其中所述纳米蛋白粒子的粒径在 10nm 至 100nm 范围内,优选在 20nm 至 50nm 范围内。

[0010] 5. 根据以上 1 的纳米生物机器人,其中所述纳米蛋白粒子进一步与一个 DNA 片段连接。在一个实施方案中,一个纳米蛋白粒子上的 DNA 片段与另一个纳米蛋白粒子上的 DNA 片段互补(或部分互补)结合,由此抑制纳米蛋白粒子的运动(旋转)。

[0011] 6. 根据以上 1 的纳米生物机器人,其中所述纳米蛋白粒子进一步与一个 DNA 片段连接,所述 DNA 片段与另一个 DNA 片段在该另一个 DNA 片段的 5' 或 3' 端互补结合,所述另一个 DNA 片段的 5' 和 3' 端的序列分别与所述纳米蛋白粒子上的所述 DNA 片段互补。在一个实施方案中,纳米蛋白粒子上的所述 DNA 片段与另一个游离 DNA 片段(部分或完全)互补结合,该游离 DNA 的 5' 和 3' 末端分别可以与相邻的两个纳米生物机器人上的纳米蛋白粒子上的 DNA 片段(部分或完全)互补结合,由此抑制纳米蛋白粒子的运动(旋转)。

[0012] 7. 根据以上 1 的纳米生物机器人,其中所述载色体进一步与导向分子连接。

[0013] 8. 根据以上 7 的纳米生物机器人,其中所述导向分子是抗体或核酸,优选所述导向分子是纤维蛋白原抗体,该纤维蛋白原抗体是多克隆抗体或单克隆抗体、或人工抗体、或重组抗体。

[0014] 9. 根据以上 8 的纳米生物机器人,其中所述纤维蛋白原抗体是纤维蛋白原多抗,并且通过生物素-链酶抗生物素-连接脂质的生物素与所述载色体连接。

[0015] 10. 根据以上 1-9 任一项所述的纳米生物机器人在制备辅助药物中的应用,所述辅助药物用于促进活性药物在目标区域的扩散。

[0016] 本发明还提供应用于疾病治疗的纳米生物机器人的构建方法,该方法包括如下步骤:

[0017] (1) 载色体(chromatophores)的制备

[0018] 培养光合作用细菌(R. Capsulatus I20, (保藏号 1.2359) 商购于中科院微生物所细胞库)。培养基: KH_2PO_4 , 1.0g, MgCl_2 0.5g, CaCl_2 , 0.1g, NaCl 1.0g, 醋酸钠 1.0g, 琥珀酸钠 1g, 酵母膏, 1.0g, NaHCO_3 0.5g, 蛋白胨 0.5g(OXOID 英国), 微量元素 1.0ml, 维生素液 1.0ml, 蒸馏水 1.0L, pH 6.8, 8 磅, 高压灭菌 30 分钟。维生素液成分: 生物素 0.1g(进口分装), 烟酸 0.35g, 烟酸硫胺素(Thiamine dichloride) 0.3g, 泛酸钙(Ca-panthothenate) 0.1g, 维生素 B_{12} (Vitamin B_{12} , 0.05g, 盐酸吡多胺(PyridoxoliumHydrochloride, Fluka) 0.1g, 蒸馏水 1.0L; 微量元素成分: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.8g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25g; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01g; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.07g; ZnCl_2 0.1g, B_3PO_4 0.5g, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03g, 蒸馏水 1.0L) 温度 30-35°C。收获: 细菌的培养温度为 28°C, 在光照(4,000Lx)下培养 5-7 天, 5000g 离心收集。载色体(Chromatophores)的提取: 样品用 TS 缓冲液(50mM, Tricine(三(羟甲基)甲基甘氨酸, Amresco 进口分装) pH 8.0, 0.25M 蔗糖; 5mM MgCl_2) 洗涤一次, 然后再加入 15ml 的 TS 缓冲液, 悬浮后, 加入 1mg/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) 10 分

钟, 25,000g 离心 30 分钟, 保留上清, 再将上清 180,000g 在 4℃ 离心 90 分钟, 沉淀为载色体 (Chromatophores)。此复合物为含一个分子马达 F_0F_1 -ATPase, 多个光转换载体。

[0019] (2) 60 μ l, 0.5 μ g/ μ l 的 chromatophores (带有分子马达) 与 0.5 μ l, 5.5mM 的 lipid-biotin 在 4℃ 连接 25 分钟; 然后加入 95 μ l, 29 μ M 的 avidin, 室温连接 5 分钟, 形成 (分子马达-lipid-biotin-avidin), 备用;

[0020] (3) 50 μ l, 17 μ M 的纤维蛋白原多抗, 与 4.25 μ l, 1mM N-biotin 室温连接 60 分钟, 形成 (N-biotin-纤维蛋白原多抗), 备用;

[0021] (4) 50 μ l, 350 μ g/ml 的纳米蛋白粒子 (粒径为 23nm), 与 85 μ l, 100 μ M 的 N-biotin 室温连接 60 分钟, 形成 (N-biotin-纳米蛋白粒子), 备用;

[0022] 纳米蛋白粒子的制备方法为: 纳米蛋白粒子为 SV40 主要衣壳蛋白 VP1, 重组 VP1 通过其 N 末端融合的组氨酸标签 (histag) 被纯化。携带质粒 pET32a-hisVP1 的大肠杆菌表达菌株在 500mL LB 培养基中 37℃ 长至 OD₆₀₀ 约 0.6, 加入 1mM 的 IPTG 并转入 25℃ 继续培养 9h。将菌体离心收集并重悬于 40mL 缓冲液 B (25mM Tris-HCl pH 7.8, 500mM NaCl, 5mMimidazole, 和 5% glycerol) 中超声破碎。菌体残渣通过 12000rpm 离心 30min 除去。将上清上样至镍亲和层析柱; 再先后用含有 40mM 和 80mM 咪唑 (imidazole) 的缓冲液 B 洗柱; 最后用含 500mM 咪唑的缓冲液 B 将 VP1 洗脱。所得 VP1 对缓冲液 D (10mM Tris-HCl pH 8.8, 200mM NaCl, 2mM EDTA, 30mM β -mercaptoethanol, 和 5% glycerol) 透析 20h, 然后在 4℃ 55000rpm 离心 1h, 取上清即得解聚状态的 VP1。蛋白浓度用考马斯亮蓝 G250 染色法测定。制备好的纳米颗粒保存于 4℃。

[0023] (5) 50 μ l, 17 μ M 的分子马达 β 亚基多抗, 与 4.25 μ l, 1mM N-biotin 室温连接 60 分钟, 形成 (N-biotin- β 亚基多抗), 然后加入 147 μ l, 29 μ M 的 avidin, 室温连接 5 分钟, 形成 (β 亚基多抗-N-biotin-avidin), 备用;

[0024] (6) 取 20 μ l 的 (分子马达-lipid-biotin-avidin), 与 4.4 μ l (N-biotin-纤维蛋白原多抗) 室温连接 5 分钟, 形成 (分子马达-lipid-biotin-avidin-N-biotin-纤维蛋白原多抗);

[0025] (7) 取 48 μ l (β 亚基多抗-N-biotin-avidin), 与 10 μ l (N-biotin-纳米蛋白粒子) 室温连接 5 分钟, 形成 (β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子);

[0026] (8) 取 17 μ l, 29 μ M 的 avidin, 与 100 μ l, 10 μ M 的 biotin-DNA1, 室温连接 5 分钟, 形成 (avidin-biotin-DNA1); 然后加入 5 μ l (β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子), 室温反应 5 分钟, 形成 (β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子-N-biotin-avidin-biotin-DNA1);

[0027] (9) 取 24.4 μ l (分子马达-lipid-biotin-avidin-N-biotin-纤维蛋白原多抗), 与 29.3 μ l (β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子-N-biotin-avidin-biotin-DNA1) 室温反应 60 分钟, 形成 (纤维蛋白原多抗-N-biotin-avidin-lipid-biotin-分子马达- β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子-N-biotin-avidin-biotin-DNA1); 然后加入 13 μ l, 10 μ M 的 DNA2, 室温反应 2h, 完成分子马达刹车片的安装。

[0028] 其中在步骤 (3) 中加入纤维蛋白抗体以实现纳米生物机器人与血栓的特异性结合。

[0029] 在上述方法中,加入纳米蛋白粒子(直径约为 23nm),其中将该纳米粒子用于纳米生物机器人螺旋桨的构建,用于产生足够的生物机械效应。

[0030] 在上述方法中,加入 DNA1 和 / 或 DNA2,利用 DNA 序列互补的效应,实现纳米生物机器人的刹车制动,从而实现在体内血栓局部也可以进行光照储能的目的。

[0031] 本申请还包括将纳米生物机器人应用于体内辅助药物溶栓及纳米动力装置辅助药物治疗的其他医学应用。

[0032] 相对于常规溶栓治疗技术的上述局限,纳米生物技术在疾病治疗领域体现出强劲的活力,构建纳米生物机器人,利用纳米机械力学特性协同传统药物的生化酶解效应溶栓,并利用纳米在器件尺寸方面的优势,将纳米生物机器人与血栓抗体相结合,在血栓局部发挥促溶作用,这将为血栓性疾病的治疗提供了新的思路。

[0033] 本发明用光驱动旋转式分子马达构建的生物纳米机器与血栓抗体结合,是一种全新的纳米生物机器人;该纳米生物机器人具备对血栓具有靶向结合能力和辅助药物快速溶栓能力,鉴于血栓性疾病中的脑血管疾病和心血管疾病目前位列全球人类疾病死因谱的第 1 位和第 3 位,而且据世界卫生组织预测,这两类疾病仍将是未来人类健康的首要威胁,而目前的治疗手段仅仅依赖于药物溶栓和介入治疗,因此本发明构建的能与血栓特异性结合的光驱动纳米机器人具有广阔的国内外应用前景及巨大的市场价值,是纳米生物机器人辅助药物溶栓的一个较大的技术突破,潜在的用户包括各大中型医院的脑血管及心血管病治疗的临床科室,产品投入使用后将产生直接的经济效益。在社会作用方面,纳米生物机器人辅助传统的单一药物溶栓,将极大的降低心脑血管疾病的死亡率和致残率,提高临床抢救与治疗的成功率及康复程度,减少病残,恢复一定的劳动能力,提高生活自理能力,提高病人的生活质量,为广大中风患者家庭及心肌梗死家庭减轻生活负担,具有很大的社会效益。

[0034] 发明详述

[0035] 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,区别在于在本发明中,分子马达不仅仅是作为一种生物传感器使用,而是将其作为纳米生物机器人的动力装置,构建了纳米生物机器,并将其应用于医学治疗中。

[0036] 借助于分子马达的结构,功能与原理的研究进展,提出了 F_1F_0 -ATP 马达全旋转式纳米机器人的新概念与新技术;提供一种 $F_1\beta$ (或 $F_1\alpha$) 亚基作为血栓抗体连接的靶位点的新技术;提出了 DNA 链作为刹车片在分子马达旋转启动控制中的新技术。

[0037] 本发明内容的要点:(1) 变静态溶栓为动态溶栓,即将传统的药物溶栓转变为药物在纳米生物机器人辅助下的溶栓;(2) 实现纳米生物机器人与血栓的靶向结合,即制备纤维蛋白抗体,通过生物素-亲和素-生物素连接体系与分子马达相连,实现纳米生物机器人在血栓表面的固定;(3) 为分子马达增加制动装置,将 DNA 互补双链的结合与解链两种状态作为分子马达的刹车控制装置的制动与去制动,解决调控纳米生物机器人旋转启动控制的关键问题,为纳米生物机器人应用于临床治疗提供控制技术。

[0038] 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。

[0039] 在本发明的一个实施方案中,提供一种纳米生物机器人(一种改进的生物载色体体系),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,其

中所述 F_0F_1 -ATPase 不含 δ 亚基,并且所述 F_0F_1 -ATPase 的 α 或 β 亚基上连接有纳米蛋白质粒子。

[0040] 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 δ 亚基的 C 端连接,而 δ 亚基的 N 端与 F_1 部分 α 亚基联接(图 1A)。

[0041] 本发明通过生物工程技术将 δ 亚基去掉[方法参见 Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006, 350(4):1013-1018.],对天然的 F_0F_1 -ATP 合酶进行重构,得到去 δ 的 F_0F_1 -ATP 合酶,在重构体中,分子马达的定子为 ab_2 ,转子为 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon c_n$ (图 1B),经此改造后,分子马达成为一种理想的纳米动力装置。天然分子马达中,可转动部分仅为活动范围非常有限的 $\gamma\epsilon$ 和 c_n (图 1A 中的深色部分),且包涵在酶分子内部,该结构大大限制了其作为分子马达的应用。而重构的分子马达,可转动部分为 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon c_n$,转子暴露在表面,方便进一步的工程化改造,例如在 α 或 β 亚基上接上各种生物材料构成的“螺旋桨”,那么可充分利用 F_0F_1 -ATP 合酶这一旋转分子马达的特性,广泛应用于生物、医学、纳米材料等领域。

[0042] 在本发明中,将所述纳米粒子用于纳米生物机器人螺旋桨的构建,用于产生足够的生物机械效应。所述纳米粒子随着 F_0F_1 -ATPase 的 α 或 β 亚基旋转,对载色体周围产生搅拌效应,可以促进载色体周围环境的生物或化学物质(包括药物)的扩散。如 CN1789425 所述,分子马达 F_0F_1 -ATPase 的旋转可以由 ATP 水解驱动,也可以由光能转换的跨膜电化学电位差驱动的,优选所述跨膜电化学电位差是由光能或化学能转换的。

[0043] 在本发明的另一个实施方案中,所述 α 或 β 亚基是经由抗 α 或 β 亚基抗体与所述纳米蛋白质粒子连接,其中所述抗 α 或 β 亚基抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。

[0044] 在本发明的另一个实施方案中,所述抗 α 或 β 亚基抗体是通过生物素-链酶抗生物素-生物素与所述纳米蛋白质粒子连接。

[0045] 在本发明中,对于纳米蛋白质粒子的粒径没有特别限制(也可以是磁性的材料),只要其作为“螺旋桨”能够产生搅拌作用即可。在本发明的一个优选实施方案中,所述纳米蛋白质粒子的粒径在 10nm 至 100nm 范围内,更优选在 20nm 至 50nm 范围内。

[0046] 在本发明的另一个实施方案中,所述纳米蛋白质粒子进一步与一个 DNA 片段(在本文中也称为 DNA1)连接。该 DNA 片段是起“刹车片”的作用,控制纳米蛋白质粒子的旋转。在一个实施方案中,该 DNA 片段是通过生物素-链酶抗生物素-生物素与所述纳米蛋白质粒子连接。对于该 DNA 片段的序列没有特别限制。优选地,一个纳米蛋白质粒子上的 DNA 片段与另一个纳米蛋白质粒子上的 DNA 片段互补(或部分互补)结合,由此抑制纳米蛋白质粒子的运动(旋转)(示意图参见图 4B 和 5B)。

[0047] 在另一个实施方案中,对 DNA1 的序列没有特别要求,可以另外加入一个游离 DNA 片段(在本文中也称为 DNA2),DNA2 的设计原理为序列的两侧为对称序列,且 5' 和 3' 端的序列分别与 DNA1 互补,其长度按照设计要求,可以进行相应调整。由此, DNA2 可以分别与相邻的两个载色体 F_0F_1 -ATPase 上的 DNA1 互补结合,形成部分 DNA 双链,由此使得分子马达不能旋转(参见图 4A 和 5A)。

[0048] 在本发明的另一个实施方案中,所述载色体进一步与导向分子连接。与导向分子连接的目的是为了将包含带有“螺旋桨”的分子马达的纳米生物机器人导向需要“螺旋桨”

搅拌的区域。所述区域可以是需要给药的任何生物体内或体外部位,例如肿瘤部位,病毒感染部位,炎症部位,血栓形成部位等任何病灶部位。相应地,所述导向分子可以是蛋白质抗体(例如,生物大分子、病毒分子特异性抗原、炎症因子、趋化因子、肿瘤因子、血栓形成因子的抗体)或核酸(如反义 RNA,探针、核酸适体等)。在本发明的一个优选实施方案中,所述导向分子是纤维蛋白原抗体,该纤维蛋白原抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。在本发明的另一个优选实施方案中,所述导向分子是通过生物素-链霉抗生物素-连接脂质的生物素与所述载体连接。本发明使用的生物素可以是 N-生物素的形式。

[0049] 在本发明的另一个实施方案中,将上述纳米生物机器人在制备辅助药物中的应用,所述辅助药物用于促进活性药物在目标区域(各种病灶区域或给药区域)的扩散。

[0050] 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机器人和活性药物,其中所述纳米生物机器人可以促进所述活性药物在目标区域的扩散。

[0051] 鉴于血栓性疾病中的脑血管疾病和心血管疾病目前位列全球人类疾病死因谱的第 1 位和第 3 位,而目前的治疗手段仅仅依赖于药物溶栓和介入治疗,因此本发明构建的能与血栓特异性结合的光驱动纳米机器人具有广阔的国内外应用前景及巨大的市场价值,是纳米生物机器人辅助药物溶栓的一个较大的技术突破,潜在的用户包括各大中型医院的脑血管及心血管病治疗的临床科室,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。

[0052] 目前肿瘤位列人类疾病死因谱的第 2 位,而目前化疗由于全身大剂量用药导致的副作用,限制了抗肿瘤药物的效果。因此本发明构建的能与肿瘤特异性结合的光驱动纳米机器人具有广阔的国内外应用前景及巨大的市场价值,是纳米生物机器人辅助药物抗肿瘤治疗的一个较大的技术突破,潜在的用户包括各大中型医院的肿瘤治疗的临床科室,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

[0053] 图 1 是分子马达的重构(去 δ 亚基的 F_0F_1 -ATP 合酶)示意图;




[0054] 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 δ 亚基的 C 端连接,而 δ 亚基的 N 端与 F_1 部分 α 亚基联接(图 1A)。

[0055] 本发明通过生物工程技术将 δ 亚基去掉[参见 Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006, 350(4):1013-1018.],对天然的 F_0F_1 -ATP 合酶进行重构,得到去 δ 的 F_0F_1 -ATP 合酶,在重构体中,分子马达的定子为 ab_2 ,转子为 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon c_n$ (图 1B),经此改造后,分子马达成为一种理想的纳米动力装置。天然分子马达中,可转动部分仅为活动范围非常有限的 $\gamma\epsilon$ 和 c_n (图 1A 中的深色部分),且包涵在酶分子内部,该结构大大限制了其作为分子马达的应用。而重构的分子马达,可转动部分为 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon c_n$,转子暴露在表面,方便进一步的工程化改造,例如在 α 或 β 亚基上接上各种生物材料构成的“螺旋桨”,那么可充分利用 F_0F_1 -ATP 合酶这一旋转分子马达的特性,广泛应用于生物、医学、纳米材料等领域。

[0056] 图 2 是纳米生物机器人的光驱动实现;

[0057] F_0F_1 -ATP 酶位于载色体（也称为脂囊泡，chromatophore）上，脂囊泡相当于一个质子（ H^+ ）的贮存库，脂囊泡来自于光合细菌，脂囊泡上有光合反应中心。光照时，通过光合反应中心，质子由脂囊泡外进入囊泡内，随光照时间增加囊泡内的质子浓度增高，质子势能储存在脂囊泡中。经一定时间储能后，升高温度至 $37^\circ C$ ，用质子梯差启动 F_0F_1 -ATP 酶的旋转，在这个过程中，质子的流动推动分子马达的旋转，即质子能转化为生物机械能。在此过程中，实现纳米生物机器人的光控制。

[0058] 本发明的实验中光照储能方式包括两种，第一种为在体外冰上进行光照，光照储能后升温至 $37^\circ C$ 后注入体内促进药物溶解，第二种为体内原位光照，此时分子马达的旋转的制动与启动依靠 DNA 双链刹车进行控制，当 DNA 双链处于结合状态时，分子马达处于制动状态，脂囊泡中的质子无法流出，在这种状态下，原位光照可以增加囊泡内的质子梯度，储存质子势能，当质子势能储存到一定程度，DNA 双链打开，分子马达开始旋转，从而实现分子马达在体内的光驱动。

[0059] 图 3. 微混合器加速溶栓的工作原理示意图（注：：溶栓药物；：血栓中的纤维蛋白；：纤维蛋白碎片）；

[0060] A 为实验组，为微混合器加速溶栓工作原理，经过光照，微混合器中分子马达储能；约 $37^\circ C$ 热启动后，分子马达开始旋转，通过搅拌作用，药物快速与纤维蛋白结合，作用时间大大缩短，溶栓依靠药物的生化酶解及生物机械效应的协同作用，溶栓过程明显加快。

[0061] B 为对照组，为常规的药物治，在溶栓药物的作用下，纤维蛋白降解为碎片，进入溶液，血栓分解，溶栓效应仅仅依靠药物被动扩散作用，药物与纤维蛋白之间也是单一的生化酶解效应，药物与纤维蛋白之间接触靠弥散作用，作用时间相对较长，效应单一；

[0062] 图 4 为纳米生物机器人安装刹车装置；

[0063] 利用生物素末端修饰的短的 DNA 互补双链作为分子马达的刹车装置，DNA 链通过末端的生物素与分子马达相连，而 DNA 双链的结合与解聚两种状态对应分子马达的制动与去制动，设计、合成适当长度及 GC 含量的 DNA 双链，实现在室温状态下分子马达不启动，到达血栓部位后，通过局部原位光照储能，能量储存到一定程度足以克服 DNA 双链的制动作用，DNA 双链解开，启动分子马达旋转，辅助药物溶栓，从而达到降低溶栓药物用量，加快血栓溶解的目的。

[0064] (1) 体外光照，储存质子梯度。在冰上光照时，质子由脂囊泡外通过光合反应中心进入囊泡内，形成质子势能，配合低的环境温度，低温可以限制马达的旋转，可以实现脂囊泡内质子势能的储存。

[0065] (2) 纳米生物机器人与特定部位的固定技术。纳米生物机器人进入血栓局部，环境温度为 $37^\circ C$ ，相邻分子马达螺旋桨上连接的 DNA 双链呈互补结合状态，限制了分子马达的旋转，这种状态（分子马达不旋转）有利于纤维蛋白抗体导引纳米生物机器人与纤维蛋白特异性结合。

[0066] (3) 血栓局部原位短时间光照，质子驱动力大于 DNA 双链结合力时，启动纳米生物机器人旋转。

[0067] 图 5 刹车装置示意图；

[0068] 采用光照设备，在血栓对应的局部进行光照，适当增加血栓局部的脂囊泡内的质子势能，使其达到纳米生物机器人启动所需的质子驱动力，此时限制分子马达旋转的 DNA

双链解链,纳米生物机器人开始旋转,在血栓局部,辅助溶栓药物快速溶栓。

[0069] 图 6 刹车装置解除前后的荧光变化图;

[0070] 对照组荧光强度无变化;光照 30 分钟组,荧光强度依然无变化,显示在此光照条件下,刹车片处于制动状态,无分子马达的旋转及其伴随的质子的膜内外转运;光照 60 分钟组,荧光强度明显上升,显示经过较长时间的光照储能,能量已经足以克服刹车片的束缚,纳米机器人携带的分子马达开始旋转,质子由 chromatophore 膜内泵到膜外,膜内 pH 升高,经过超声标记及离心洗涤,F1300 标记在膜内,膜内 pH 升高将引起对 pH 敏感的 F1300 的荧光强度变化,荧光强度升高,表明分子马达已启动,开始旋转。

[0071] 图 7 纳米机器人刹车装置解除前后的溶栓效果示意图;

[0072] 首先,采用 DNA 互补链使纳米机器人的旋转装置处于制动状态(处于刹车状态),然后,实验组采用冰上光照 1 小时,然后短时原位局部光照,储存的质子势能突破刹车的制动作用,启动纳米机器人工作,加入低浓度溶栓药物,观察溶栓效果。对照组冰上光照 30 分钟,光照储能不足以解除刹车装置。结果可见刹车状态解除组,血栓的溶解明显加快。

[0073] 图 8 分子马达与溶栓药物协同作用加快溶栓的示意图;

[0074] 兔耳缘静脉取血,24 小时 4℃ 自然凝血,取 6mg 栓体与 20 μ l 连接有血栓抗体的分子马达室温反应 60 分钟,塞入毛细玻璃管中,加入 10 μ l, 4500U/ml 的蚓激酶,封闭毛细管末端,对照组不光照,实验组冰上光照 60 分钟后,37℃ 反应 6 小时后观察试验结果。其中光照组毛细管末端以绿色封闭,对照组毛细管末端以白色封闭,可见两组初始状态一致,反应后光照组栓体溶解速度明显快于对照组,柱体长度约为对照组的 50%。

[0075] 图 9 纳米生物机器人进入血栓;

[0076] 光照组毛细管末端以绿色封闭,对照组毛细管末端以白色封闭。毛细玻璃管中的血栓在 10 μ l, 4500U/ml 的蚓激酶作用下,血细胞首先从血栓中游离出来(图 9A),血细胞在血栓中占据的空间腾出来之后,纳米机器人通过连接的血栓抗体,进入到血栓内部(图 9B),可见光照组血栓的颜色比对照组深,这是纳米生物机器人进入血栓柱体所致。实验在毛细玻璃管中进行,体内实验数据见图 13。

[0077] 图 10 纳米生物机器人进入血栓的微观图像;

[0078] 毛细玻璃管中的血栓在 10 μ l, 4500U/ml 的蚓激酶作用下,血细胞首先从血栓中游离出来(图 10A),血细胞在血栓中占据的空间腾出来之后,纳米机器人通过连接的血栓抗体,进入到血栓内部(图 10B),加快溶栓药物的溶栓作用。结果见图 10。

[0079] 图 11 纳米生物机器人进入血栓的微观图像;

[0080] 纳米机器人用量子点进行荧光标记,在荧光显微镜下可见纳米机器人通过连接的血栓抗体,逐步进入到血栓内部。结果见图 11。图中荧光点为纳米机器人。图 11 与图 10 的区别在于图 11 中对纳米机器人进行了荧光标记。

[0081] 图 12 小鼠肺动脉栓塞模型示意图;

[0082] 小鼠眼球取血 1ml,注入 1.5ml 的聚乙烯管中,置于冰箱中,4℃ 保存 24h,形成血栓,PBS 洗涤后备用。临用前用剪刀处理成小血栓,然后冰上超声 5 分钟,进一步将血栓破碎,形成血栓混悬液。取 2 月龄 BALB/c 小鼠 1 只,尾静脉注射血栓混悬液 250 μ l,构建小鼠急性肺动脉栓塞模型(见图 12)。图 12A 可见,肺组织中多处血栓栓塞;图 12B 可见单个肺动脉管腔中的血栓,血栓由箭头指示。

[0083] 图 13 纳米生物机器人对血栓靶向结合的体内试验；

[0084] 通过尾静脉注射 F1300 标记的纳米生物机器人溶液 $100 \mu\text{l}$, 1 小时后断颈处死小鼠, 冰冻切片观察肺动脉栓塞情况, 可见荧光标记的纳米生物机器人与血栓的靶向结合。结果见图 13 (血栓由箭头指示)。图 13A 是可见光下的肺血管栓塞图像, 图 13B 是荧光下的肺栓塞图像, 血栓没有标记荧光, 荧光物质 F1300 标记在纳米生物机器人上, 血栓部位呈现荧光图像, 而周围血管及肺组织中未见荧光物质, 说明纳米生物机器人高度特异的靶向结合到血栓上。

[0085] 图 14. 荧光标记的纳米生物机器人与血栓的靶向结合。血栓形态为附壁血栓, 管腔未全部堵塞, 是一个血管横切的图像；

[0086] 图 15. 荧光标记的纳米生物机器人与血栓的靶向结合。血栓形态是一个血管纵切的图像；

[0087] 图 16. 荧光标记的纳米生物机器人与血栓的靶向结合。血管横切的图像；

[0088] 图 17. 荧光标记的纳米生物机器人与血栓的靶向结合。将图 16 对应血管经过共聚焦双荧光成像扫描后构建的双荧光叠加图像；

[0089] 图 18. 动物体内血栓溶解实验。

具体实施方式

[0090] 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。

[0091] 本发明的目的是通过下面的技术方案实现的：

[0092] 1. 分子马达及光合作用的复合物 (Chromatophores) 制备

[0093] 载色体 (Chromatophores) 的制备与中国专利申请号 200410098929.9 相同。具体地, 培养光合作用细菌 (*R. Capsulatus* I 20, (保藏号 1.2359), 商购于中科院微生物所细胞库)。培养基: KH_2PO_4 , 1.0g, MgCl_2 0.5g, CaCl_2 , 0.1g, NaCl 1.0g, 醋酸钠 1.0g, 琥珀酸钠 1g, 酵母膏, 1.0g, NaHCO_3 0.5g, 蛋白胨 0.5g (OXOID 英国), 微量元素 1.0ml, 维生素液 1.0ml, 蒸馏水 1.0L, pH 6.8, 8 磅, 高压灭菌 30 分钟。维生素液成分: 生物素 0.1g (进口分装), 烟酸 0.35g, 烟酸硫胺素 (Thiamine dichloride) 0.3g, 泛酸钙 (Ca-panthothenate) 0.1g, 维生素 B_{12} (Vitamin B_{12} , 0.05g, 盐酸吡多胺 (Pyridoxolium Hydrochloride, Fluka) 0.1g, 蒸馏水 1.0L; 微量元素成分: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.8g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25g; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01g; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.07g; ZnCl_2 0.1g, B_3PO_4 0.5g, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03g, 蒸馏水 1.0L) 温度 $30\text{--}35^\circ\text{C}$ 。收获: 细菌的培养温度为 28°C , 在光照 (4,000Lx) 下培养 5-7 天, 5000g 离心收集。载色体 (Chromatophores) 的提取: 样品用 TS 缓冲液 (50mM, Tricine (三 (羟甲基) 甲基甘氨酸, Amresco 进口分装) pH 8.0, 0.25M 蔗糖; 5mM MgCl_2) 洗涤一次, 然后再加入 15ml 的 TS 缓冲液, 悬浮后, 加入 1mg/ml 的溶菌酶 (Sigma 分装), 在冰中孵育 30 分钟, 超声 (20% 振幅, Cole Parmer CPX600 超声仪 13# 探头) 10 分钟, 25,000g 离心 30 分钟, 保留上清, 再将上清 180,000g 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 $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$, 多个光转换载体。

[0094] 2. 纳米生物机器人的组装

[0095] (1) $60 \mu\text{l}$, $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的分子马达与 $0.5 \mu\text{l}$, 5.5mM 的 lipid-biotin (Avanti 公

司,货号:870285,1-油酰-2-(12-生物素基(氨基十二烷酰))-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺,1-Oleoyl-2-(12-biotinyl(aminododecanoyl))-sn-Glycerol-3-Phosphoethanolamine)在4°C连接,连接方式为lipid-biotin与脂囊泡chromatophore相连[Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006, 350(4):370-374.],连接25分钟;然后加入95 μl,29 μM的avidin,室温连接5分钟,形成(分子马达-lipid-biotin-avidin),备用;

[0096] (2)50 μl,17 μM的纤维蛋白原多抗[制备方法参见:首都医科大学学报,1998,19(1):63-64],与4.25 μl,1mM N-biotin(Fluka公司,货号:14405)室温连接(生物素通过噻吩环戊酸侧链上的羧基与蛋白共价结合)[参见:复旦学报(自然科学版),2003,42(6):1020-1024],60分钟,形成(N-biotin-纤维蛋白原多抗),备用;

[0097] (3)50 μl,350 μg/ml的纳米蛋白粒子(所用纳米蛋白粒子为SV40主要衣壳蛋白VP1(氨基酸序列的GenBank Accession no. AF316139.1),重组VP1通过其N末端融合的组氨酸标签(histag)被纯化。携带质粒pET32a-hisVP1的大肠杆菌表达菌株在500mL LB培养基中37°C长至OD₆₀₀约0.6,加入1mM的IPTG并转入25°C继续培养9h。

[0098] pET32a-hisVP1质粒的详细构建过程如下:

[0099] SV40VP1基因(GenBankAccession no. AF316139.1)片段以SV40基因组为模板,以5' TACTTCTGCTCTAAAGATCTATGAAG(P1)和5' ACAACTCGAGCAATAGCATCACAAA(P2)为引物扩增获得,BglIII-XhoI双酶切后插入载体pQE30(Qiagen)的BamHI-SalI位点,从而获得载体pQEVVP1。然后以pQEVVP1为模板,以5' GAAATTACATATGAGAGGATCGC(P3)和P2为引物扩增获得5'端融合了histag的VP1编码序列,该片段经NdeI-XhoI双酶切后,与NdeI-XhoI完全酶切的pET32a(+)(Novagen,美国)载体片段连接,获得载体pET32hisVP1,用于VP1的表达。

[0100] 将菌体离心收集并重悬于40mL缓冲液B(25mM Tris-HCl pH 7.8,500mM NaCl,5mM imidazole,和5% glycerol)中超声破碎。菌体残渣通过12000rpm离心30min除去。将上清上样至镍亲和层析柱;再先后用含有40mM和80mM咪唑(imidazole)的缓冲液B洗柱;最后用含500mM咪唑的缓冲液B将VP1洗脱。所得VP1对缓冲液D(10mM Tris-HCl pH8.8,200mM NaCl,2mM EDTA,30mM β-mercaptoethanol,和5% glycerol)透析20h,然后在4°C 55,000rpm离心1h,取上清即得解聚状态的VP1。蛋白浓度用考马斯亮蓝G250染色法测定。制备好的纳米颗粒保存于4°C。粒径为23nm),与85 μl,100 μM的N-biotin室温连接(生物素通过噻吩环戊酸侧链上的羧基与蛋白共价结合)60分钟,形成(N-biotin-纳米蛋白粒子),备用;

[0101] (4)50 μl,17 μM的分子马达β亚基多抗,与4.25 μl,1mM N-biotin室温连接(生物素通过噻吩环戊酸侧链上的羧基与蛋白共价结合)60分钟,形成(N-biotin-β亚基多抗),然后加入147 μl,29 μM的avidin,室温连接5分钟,形成(β亚基多抗-N-biotin-avidin),备用;

[0102] (5)取20 μl的(分子马达-lipid-biotin-avidin),与4.4 μl(N-biotin-纤维蛋白原多抗)室温连接5分钟,形成(分子马达-lipid-biotin-avidin-N-biotin-纤维蛋白原多抗);

[0103] (6)取48 μl(β亚基多抗-N-biotin-avidin),与10 μl(N-biotin-纳米蛋白粒子)室温连接5分钟,形成(β亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子);

[0104] (7) 取 $17 \mu\text{l}$, $29 \mu\text{M}$ 的 avidin, 与 $100 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{M}$ 的 biotin-DNA1, 室温连接 5 分钟, 形成 (avidin-biotin-DNA1); 然后加入 $5 \mu\text{l}$ (β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子), 室温反应 5 分钟, 形成 (β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子-N-biotin-avidin-biotin-DNA1);

[0105] DNA1 的碱基序列为 (21bp):

[0106] $5' \rightarrow 3'$: biotin-ATTCGTAATCGTTTAAAGATC

[0107] 其中 DNA1 序列与 biotin 的连接为北京奥科生物公司完成。

[0108] DNA1 序列与 biotin 的连接方法为:

[0109] 1. 将 $0.1 \mu\text{mol}$ 氨基修饰核苷酸溶于 0.7ml 无菌蒸馏水中。

[0110] 2. 加入 0.1ml 的 1.0M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 缓冲液, pH 值为 9.0。

[0111] 3. 将 10mg/ml 的酯类试剂 Biotin-X-NHS-Ester 溶液溶于二甲基甲酰胺中。取配好的此溶液 0.2ml 加入反应混合物中。

[0112] 4. 室温放置 2 小时。

[0113] 5. 用反相 HPLC 法纯化生物素化寡核苷酸。

[0114] 该 DNA 序列与下述的 DNA2 序列的一侧序列为互补序列, 按照设计要求, 两者达到互补的要求即可, 序列可以替代, DNA 长度可根据设计要求进行调整, 长度非严格限定。

[0115] (8) 取 $24.4 \mu\text{l}$ (分子马达-lipid-biotin-avidin-N-biotin-纤维蛋白原多抗), 与 $29.3 \mu\text{l}$ (β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子-N-biotin-avidin-biotin-DNA1) 室温反应 60 分钟, 形成 (纤维蛋白原多抗-N-biotin-avidin-lipid-biotin-分子马达- β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子-N-biotin-avidin-biotin-DNA1); 然后加入 $13 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{M}$ 的 DNA2, 室温反应 2h, 完成分子马达刹车片的安装。

[0116] DNA2 的碱基序列为:

[0117] $5' -\text{TAAgCATTAgCAAATTTCTAgACTACATCgTCATAgTAgATCTTTAAACgATTACgAAT}-3'$

[0118] DNA2 序列的设计原理为序列的两侧为对称序列, 且 $5'$ 和 $3'$ 端的序列分别与 DNA1 互补, 其长度按照设计要求, 可以进行相应调整。

[0119] 本发明的分子马达应用于方法包括以下步骤:

[0120] (1) 旋转马达的重组: 对 F_0F_1 -ATP 酶进行结构改造, 得到去 δ 的 F_0F_1 -ATP 酶;

[0121] (2) 血栓抗体与分子马达进行连接;

[0122] (3) 完成旋转马达的刹车片安装。

[0123] 实施例 1 纳米机器人的组装

[0124] 在刹车装置制动有效性的观测指标方面, 采用 pH 敏感的荧光物质 F1300 标记脂囊泡 (chromatophore, 带有分子马达), 当刹车装置起作用时, 分子马达不能旋转, 膜内外无质子流动, 那么膜内外无 pH 变化, 荧光强度不出现变化; 当光照储能达到一定程度时, 分子马达开始旋转, 挣脱了 DNA 双链的束缚, 刹车装置被解除, 质子由膜内泵到膜外, 引起膜上标记的 F1300 荧光的变化, 从而验证短链 DNA 互补双链作为刹车装置的有效性。以下组装的详细过程, 除非另外指出或明显不符, 与以上在具体实施方式中所述相同。

[0125] 1. F1300 标记载体 (chromatophore)

[0126] $60 \mu\text{l}$, $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 载体 (chromatophore) (带有分子马达的脂囊泡), 加入

0.1mM 540 μ 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 1 μ l, 1mg/ml 的 F1300(荧光探针, 购自美国 Molecular Probes 公司, 产品名: fluorescein reference standard, 产品编号 F1300), 冰水中超声 5 分钟, 15,000rpm, 30 分钟, 洗两遍, 去掉游离的 F1300, 重悬于 60 μ l, 0.1mM 的 Tricine(pH = 6.5), 备用。

[0127] 2. 纳米机器人安装 DNA 双链刹车片

[0128] (1) 60 μ l, 0.5 μ g/ μ l 的 F1300 标记的 chromatophore(带有分子马达的脂囊泡) 与 0.5 μ l, 5.5mM 的 lipid-biotin 在 4 $^{\circ}$ C 连接 25 分钟; 然后加入 95 μ l, 29 μ M 的 avidin, 室温连接 5 分钟, 形成(分子马达-lipid-biotin-avidin), 备用;

[0129] (2) 50 μ l, 17 μ M 的纤维蛋白原多抗, 与 4.25 μ l, 1mM N-biotin 室温连接 60 分钟, 形成(N-biotin-纤维蛋白原多抗), 备用;

[0130] (3) 50 μ l, 350 μ g/ml 的纳米蛋白粒子(粒径为 23nm), 与 85 μ l, 100 μ M 的 N-biotin 室温连接 60 分钟, 形成(N-biotin-纳米蛋白粒子), 备用;

[0131] (4) 50 μ l, 17 μ M 的分子马达 β 亚基多抗, 与 4.25 μ l, 1mM N-biotin 室温连接 60 分钟, 形成(N-biotin- β 亚基多抗), 然后加入 147 μ l, 29 μ M 的 avidin, 室温连接 5 分钟, 形成(β 亚基多抗-N-biotin-avidin), 备用;

[0132] (5) 取 20 μ l 的(分子马达-lipid-biotin-avidin), 与 4.4 μ l(N-biotin-纤维蛋白原多抗) 室温连接 5 分钟, 形成(分子马达-lipid-biotin-avidin-N-biotin-纤维蛋白原多抗);

[0133] (6) 取 48 μ l(β 亚基多抗-N-biotin-avidin), 与 10 μ l(N-biotin-纳米蛋白粒子) 室温连接 5 分钟, 形成(β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子);

[0134] (7) 取 17 μ l, 29 μ M 的 avidin, 与 100 μ l, 10 μ M 的 biotin-DNA1, 室温连接 5 分钟, 形成(avidin-biotin-DNA1); 然后加入 5 μ l(β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子), 室温反应 5 分钟, 形成(β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子-N-biotin-avidin-biotin-DNA1);

[0135] DNA1 的碱基序列为 (21bp):

[0136] 5' \rightarrow 3' :biotin-ATTCGTAATCGTTTAAAGATC

[0137] (8) 取 24.4 μ l(分子马达-lipid-biotin-avidin-N-biotin-纤维蛋白原多抗), 与 29.3 μ l(β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子-N-biotin-avidin-biotin-DNA1) 室温反应 60 分钟, 形成(纤维蛋白原多抗-N-biotin-avidin-lipid-biotin-分子马达- β 亚基多抗-N-biotin-avidin-N-biotin-纳米蛋白粒子-N-biotin-avidin-biotin-DNA1); 然后加入 13 μ l, 10 μ M 的 DNA2, 室温反应 2h, 完成分子马达刹车片的安装。

[0138] DNA2 的碱基序列为:

[0139] 5' -TAAGCATTAGCAAATTTCTAGACTACATCGTCATAGTAGATCTTTAAACGATTACGAAT-3'

[0140] 3. 刹车片打开后, 荧光变化的观察

[0141] 荧光变化的观察在荧光显微镜下进行(Olympus IX71, 日本), 荧光图像信号的记录由低温数字高速照相机完成(iXon CCD, ANDOR Technology, 英国)。

[0142] 结果可见, 对照组荧光强度无变化; 光照 30 分钟组, 荧光强度依然无变化, 显示在此光照条件下, 刹车片处于制动状态, 无分子马达的旋转及其伴随的质子的膜内外转运; 光

照 60 分钟组, 荧光强度明显上升, 显示经过较长时间的光照储能, 能量已经足以克服刹车片的束缚, 纳米机器人携带的分子马达开始旋转, 质子由 chromatophore 膜内泵到膜外, 膜内 pH 升高, 经过超声标记及离心洗涤, F1300 标记在膜内, 膜内 pH 升高将引起对 pH 敏感的 F1300 的荧光强度变化, 荧光强度变化方向为升高。结果见附图 6。

[0143] 实施例 2 纳米生物机器人在 DNA 双链刹车装置的结合与解开状态下的溶栓效果。

[0144] 纤维蛋白原在凝血酶的作用下转变成纤维蛋白, 纤维蛋白是血栓的主要成分, 血栓的形成过程是纤维蛋白首先形成网状结构, 结合血细胞, 构成血栓。

[0145] 1. 纤维蛋白原的 FITC 荧光标记和纤维蛋白的形成

[0146] 纤维蛋白原 (10mg/ml, 0.03mM, 购自 Sigma 公司, 商品目录号 :F8630, 美国) 溶于 PBS 缓冲溶液中 (137mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na_2HPO_4 , 1mM KH_2PO_4 , pH 8.5), 加入 FITC (Fluorescein isothiocyanate, 终浓度为 50mg/ml, 购自 Molecular Probes 公司, 美国), 振荡混匀, 置摇床上慢速混匀反应 1 小时。转入透析袋中, 以 PBS 为透析液, 将未标记上的 FITC 透析干净。取 FITC 标记的纤维蛋白原 500 μl (10mg/ml), 加入凝血酶 250U (0.5unit/ μl , 购自 Sigma 公司, 美国), 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 分钟, 得到纤维蛋白沉淀。

[0147] 2. 取纤维蛋白 1mg, 与 3.3 μl 上述实施例制备的连接有血栓抗体的, 带有 DNA 刹车装置的分子马达室温反应 60 分钟, 置入毛细玻璃管中, 加入 10 μl , 4500U/ml 的蚓激酶 (北京百奥药业有限责任公司, 溶栓药), 封闭毛细管末端。对照组冰上光照 30 分钟, 实验组冰上光照 60 分钟后 (对照组仅光照 30 分钟, 30 分钟和 60 分钟是根据光能转换效率及 DNA 双链的结合力确定的) 在加温设备 40 $^\circ\text{C}$ 环境中启动纳米机器人旋转, 荧光显微镜下间隔 10 分钟进行拍照观测。结果见附图 6, 可见实验组光照时间长, 质子势能储备多, 在 40 $^\circ\text{C}$ 时打开了 DNA 双链的刹车装置, 启动了分子马达旋转, 加快了溶栓作用, 图中可见荧光标记的纤维蛋白溶解。而对照组光照时间短, 储备的质子势能不足以打开 DNA 双链刹车装置对纳米机器人的制动, 因此溶栓效果明显不如实验组。结果见附图 7-8 (附图 7 为荧光下观测结果, 附图 8 为可见光下观测结果, 附图中由箭头标出血栓)。图中可直接观察到血栓溶解的情况。

[0148] 实施例 3 兔血栓溶解实验

[0149] 兔耳缘静脉取血, 24 小时 4 $^\circ\text{C}$ 自然凝血, 取 6mg 栓体 (该栓体为血液自然凝血而成, 其主要成分为纤维蛋白, 除纤维蛋白之外, 还包括了血细胞), 与 20 μl 上述实施例制备的连接有血栓抗体的分子马达室温反应 60 分钟, 塞入毛细玻璃管中, 加入 10 μl , 4500U/ml 的蚓激酶, 封闭毛细管末端, 对照组不光照, 实验组冰上光照 60 分钟后, 37 $^\circ\text{C}$ 反应 6 小时后观察试验结果, 其中光照组以绿色封泥封闭, 对照组以白色封泥封闭, 可见两组初始状态一致, 反应后光照组栓体溶解速度明显快于对照组, 柱体长度约为对照组的 50%。结果见附图 9。

[0150] 实施例 4 荧光标记兔血栓溶解实验

[0151] 毛细玻璃管中的血栓在 10 μl , 4500U/ml 的蚓激酶作用下, 血细胞首先从血栓中游离出来 (图 10A), 血细胞在血栓中占据的空间腾出来之后, 纳米机器人通过连接的血栓抗体, 进入到血栓内部 (图 10B), 加快溶栓药物的溶栓作用。结果见附图 10。

[0152] 上述实施例制备的纳米机器人用量子点进行荧光标记 [参见 Anal. Biochem. 2007, 364(2) :122-127], 在荧光显微镜下可见纳米机器人通过连接的血栓抗体,

逐步进入到血栓内部。结果见附图 11。图中荧光点为纳米机器人。实施例 4 与实施例 3 的区别在于实施例 4 中对纳米机器人进行了荧光标记。

[0153] 实施例 5 动物体内纳米机器人与血栓的靶向结合实验（单荧光标记）

[0154] 小鼠眼球取血 0.5ml，注入 1.5ml 的聚乙烯管中，置于冰箱中，4℃ 保存 24h，形成血栓，无菌生理盐水洗涤后备用。临用前用剪刀处理成小血栓，加入 1ml 生理盐水，然后冰上超声 5 分钟，进一步破碎形成血栓混悬液。取 2 月龄 BALB/c 小鼠 1 只，尾静脉注射血栓混悬液 250 μ l，构建小鼠急性肺动脉栓塞模型（见图 12）。图 12A 可见（血栓由箭头指示），肺组织中多处血栓栓塞；图 12B 可见单个肺动脉管腔中的血栓。

[0155] 通过尾静脉注射 F1300 标记的上述实施例制备的纳米生物机器人溶液 100 μ l，1 小时后断颈处死小鼠，冰冻切片观察肺动脉栓塞情况，可见荧光标记的纳米生物机器人与血栓的靶向结合。结果见图 13。图 13A 是可见光下的肺血管栓塞图像，图 13B 是荧光下的肺栓塞图像（血栓由箭头指示），血栓没有标记荧光，荧光物质 F1300 标记在纳米生物机器人上，血栓部位呈现荧光图像，而周围血管及肺组织中未见荧光物质，说明纳米生物机器人高度特异的靶向结合到血栓上。

[0156] 实施例 6 动物体内纳米机器人与血栓的靶向结合实验（双荧光标记）

[0157] 取 1.5ml 的聚乙烯管 1 支，加入 0.1ml FITC 标记的纤维蛋白原 (10mg/ml) [制备参见 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, 377(1):191-194]，小鼠眼球取血 0.5ml，注入聚乙烯管中，充分混匀，避光 4℃ 保存 24h，形成 FITC 标记的血栓，无菌生理盐水洗涤后备用。临用前用剪刀处理成小血栓，加入 1ml 无菌生理盐水，然后冰上超声 5 分钟，进一步破碎形成血栓混悬液。取 2 月龄 BALB/c 小鼠 1 只，尾静脉注射血栓混悬液 250 μ l，构建小鼠急性肺动脉栓塞模型。

[0158] 通过尾静脉注射 580nm 的量子点 [参见 *J. Phys. Chem. B.* 2007, 111(41):12024-12031.] 标记的上述实施例制备的纳米生物机器人溶液 100 μ l，1 小时后断颈处死小鼠，冰冻切片观察肺动脉栓塞情况，可见荧光标记的纳米生物机器人与血栓的靶向结合。结果见图 14-图 17。图 14 中的血栓形态为附壁血栓，管腔未全部堵塞，是一个血管横切的图像。图 15 中的血栓形态是一个血管纵切的图像。图 16 是一个血管横切的图像。图 14A-图 16A 是可见光下的肺血管栓塞图像，图 14B-图 16B 是 520nm 荧光下的图像，图 14C-图 16C 是 580nm 荧光下的图像。图 17 是图 16 对应血管经过共聚焦双荧光成像扫描后构建的双荧光叠加图像。血栓标记的荧光物质为 FITC，呈现为绿光，分子马达标记的荧光物质为 580nm 的量子点，呈现为红色。血栓部位在不同波长 (520nm 和 580nm) 的荧光下，分别呈现绿色和红色荧光图像，而周围血管及肺组织中未见荧光物质，说明纳米生物机器人高度特异的靶向结合到血栓上。图 17 中清晰可见纤维状的纤维蛋白发出的绿色荧光附在血管壁上，指示出血栓的位置，而分子马达携带的量子点红色荧光与纤维状的血栓绿色荧光交织在一起，充分说明了纳米生物机器人与血栓的高度特异性结合，体现了靶向性。

[0159] 实施例 7 动物体内血栓溶解实验

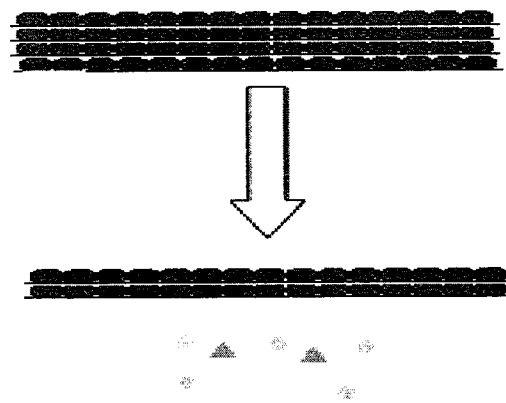
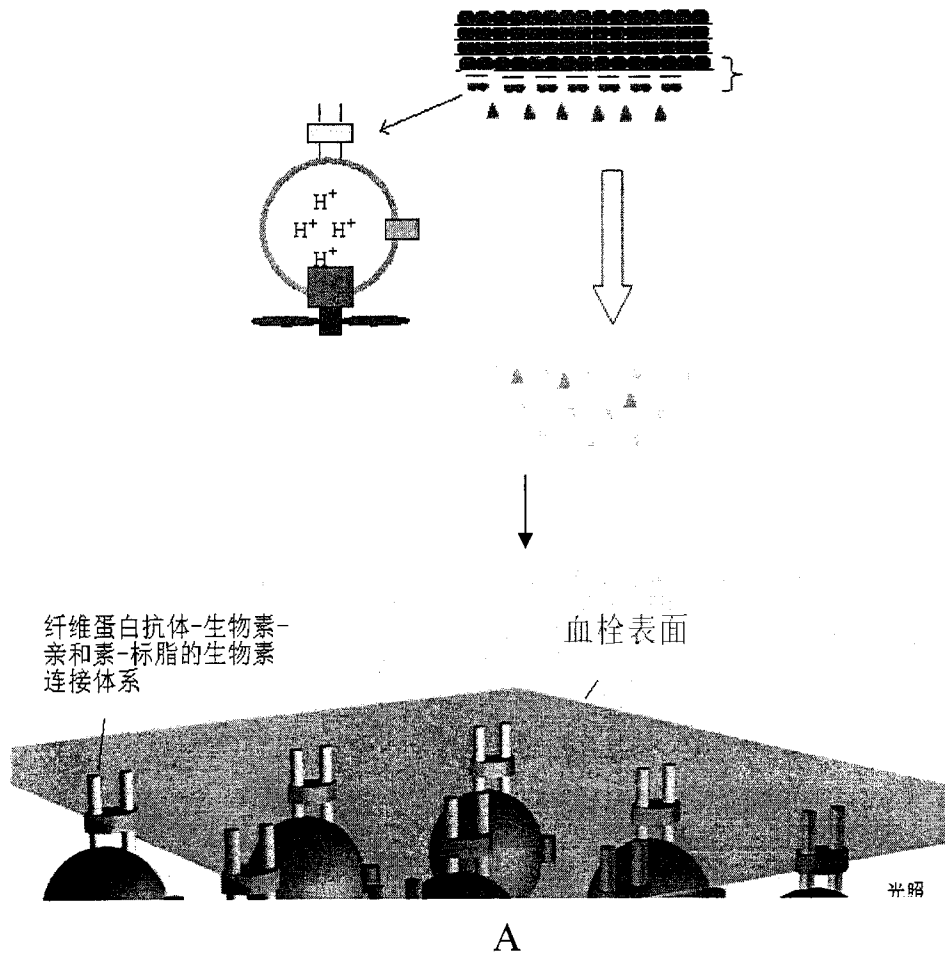
[0160] 取 1.5ml 的聚乙烯管 1 支，加入 0.1ml FITC 标记的纤维蛋白原 (10mg/ml)，小鼠眼球取血 0.5ml，注入聚乙烯管中，充分混匀，避光 4℃ 保存 24h，形成 FITC 标记的血栓，无菌生理盐水洗涤后备用。临用前用剪刀处理成小血栓，加入 1ml 无菌生理盐水，然后冰上超声 5 分钟，进一步破碎形成血栓混悬液。取 2 月龄 BALB/c 小鼠 9 只，每只尾静脉注射血栓混悬

液 250 μ l, 构建小鼠急性肺动脉栓塞模型。

[0161] 取以上实施例制备的纳米生物机器人分成 3 组, 每组 3 个样本, 每个样本取 100 μ l, 共 900 μ l。第 1 组冰上光照 60 分钟, 第 2 组冰上光照 45 分钟, 第 3 组不光照。通过尾静脉注射, 将纳米生物机器人分别注入上述 9 只形成了急性肺动脉栓塞的小鼠体内, 每只注射 100 μ l。随后, 每只小鼠注入尿激酶 (Sigma) 5U。

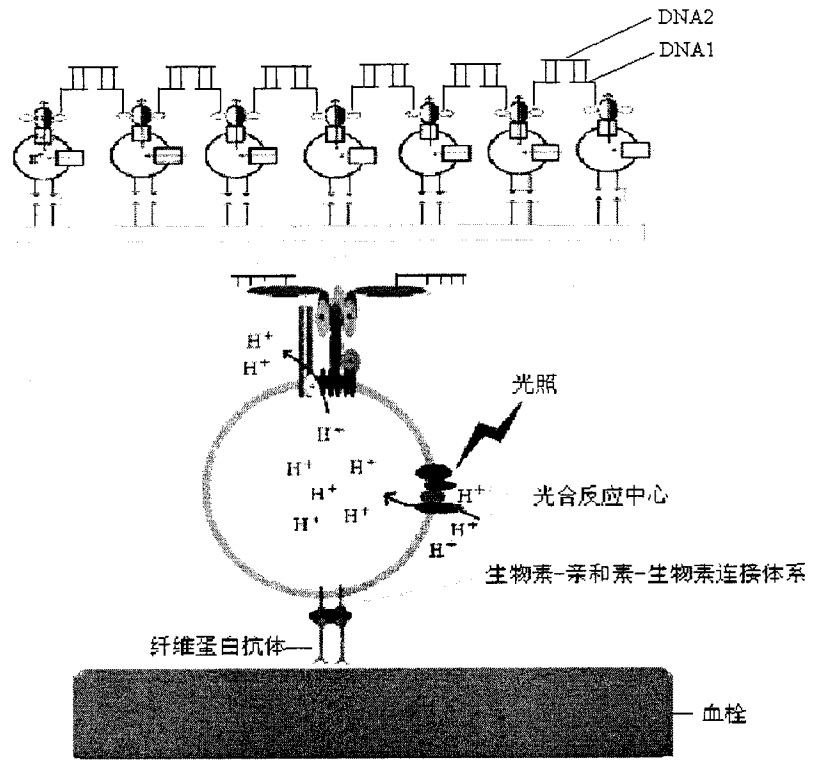
[0162] 设置 6 个时间点, 分别为注射后 0 分钟, 30 分钟, 60 分钟, 90 分钟, 120 分钟, 150 分钟, 在每个时间点取血 10 μ l, 取血方式为眼眶取血。血取出后置于已预先放入 100 μ l, 0.04% 的 Na_2EDTA 的 ep 管中, 避光保存。4 $^{\circ}\text{C}$, 4000g 离心 30 分钟除去血细胞, 采用微荧光测定仪 [参见 J. Phys. Chem. B. 2007, 111 (41) :12024-12031.] 对小鼠各个时间点的血浆荧光值进行测定, 结果见图 18。

[0163] 由图 18 可见, 分子马达辅助药物溶栓组中小鼠血液中的荧光强度值高峰前移, 与单纯药物溶栓组比较, 荧光强度高峰前移 30 分钟, 说明分子马达促进了溶栓药物的作用, 加速了血栓溶解, 而血栓的快速溶解具有重要的临床治疗意义。(注: 数据进行了归一化处理, 样本例数 $N = 3$)。

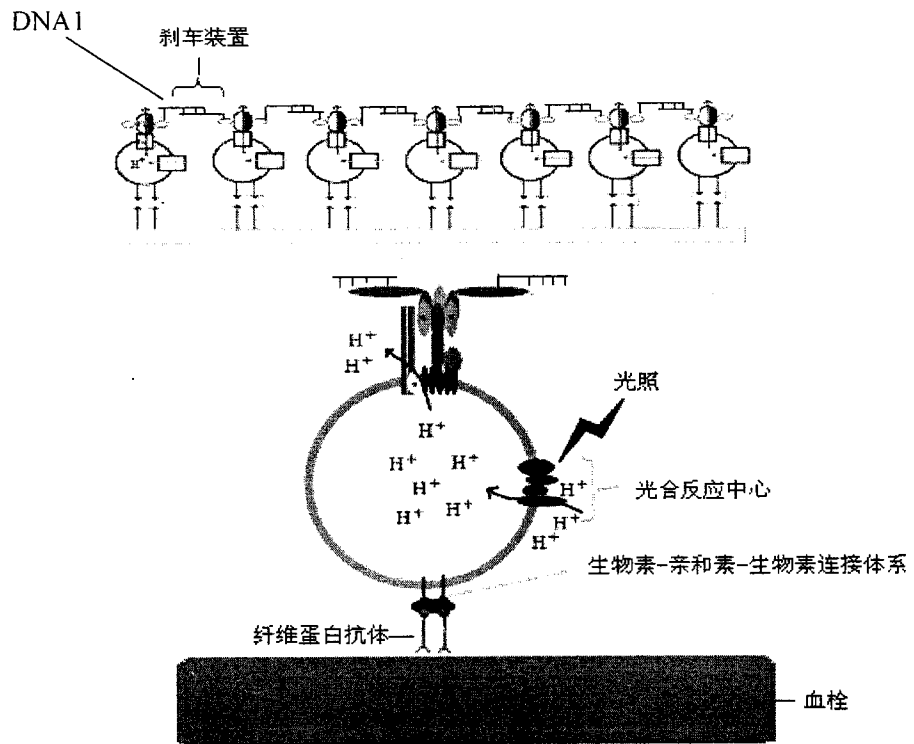


B

图 3

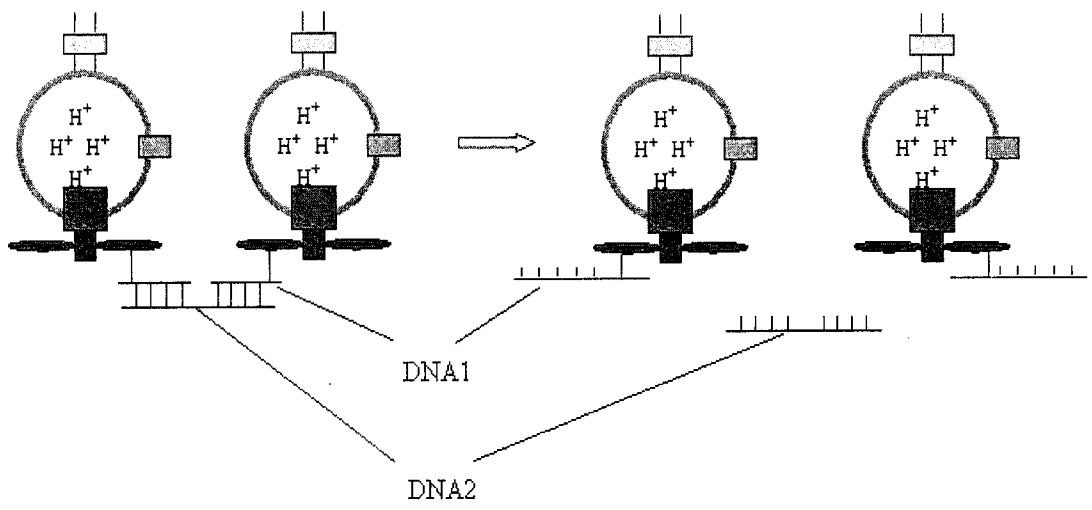


A

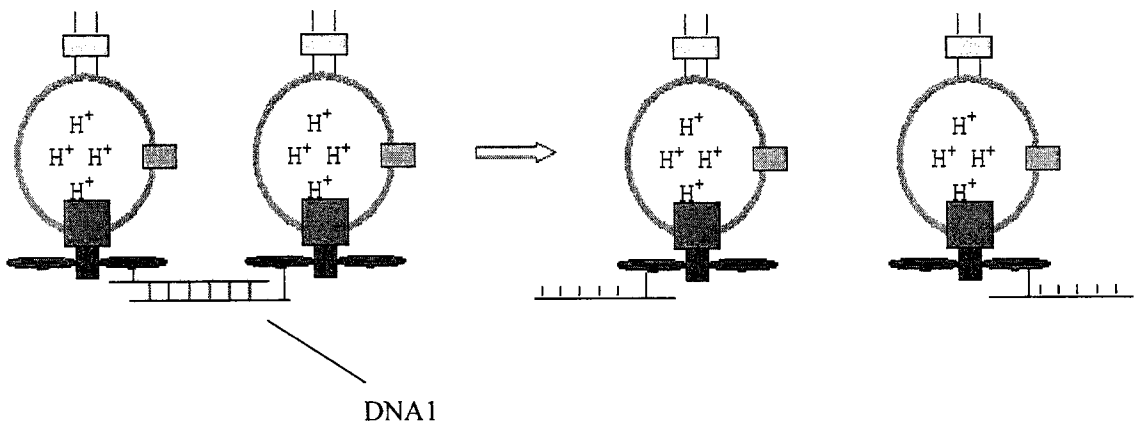


B

图 4



A



B

图 5

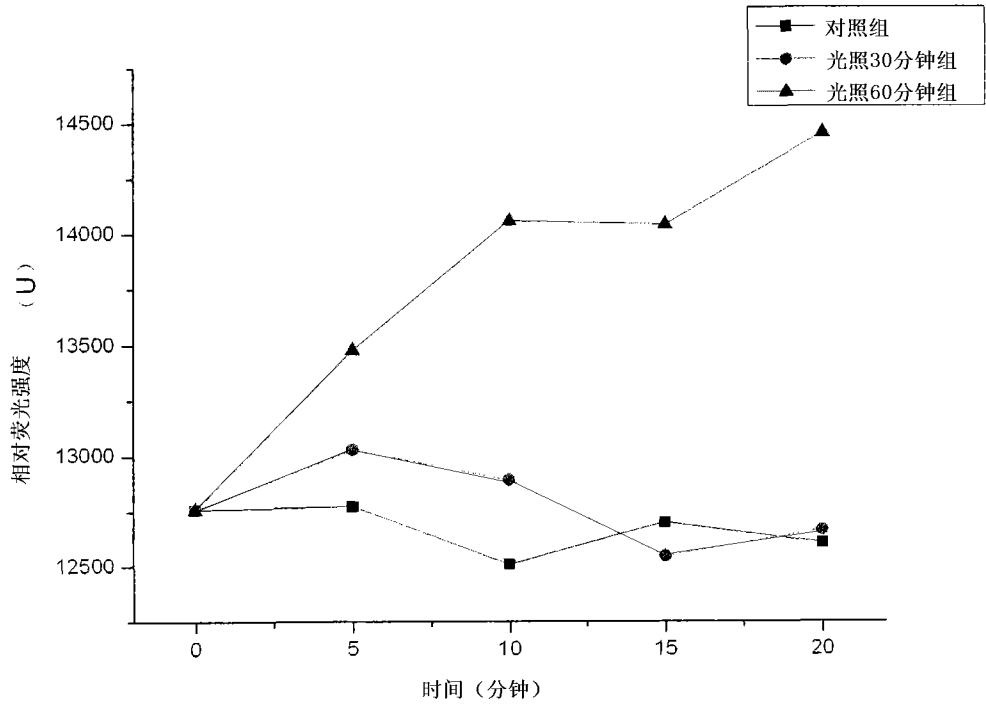


图 6

热启动后
0 分钟

实验组

对照组

10 分钟

20 分钟

30 分钟

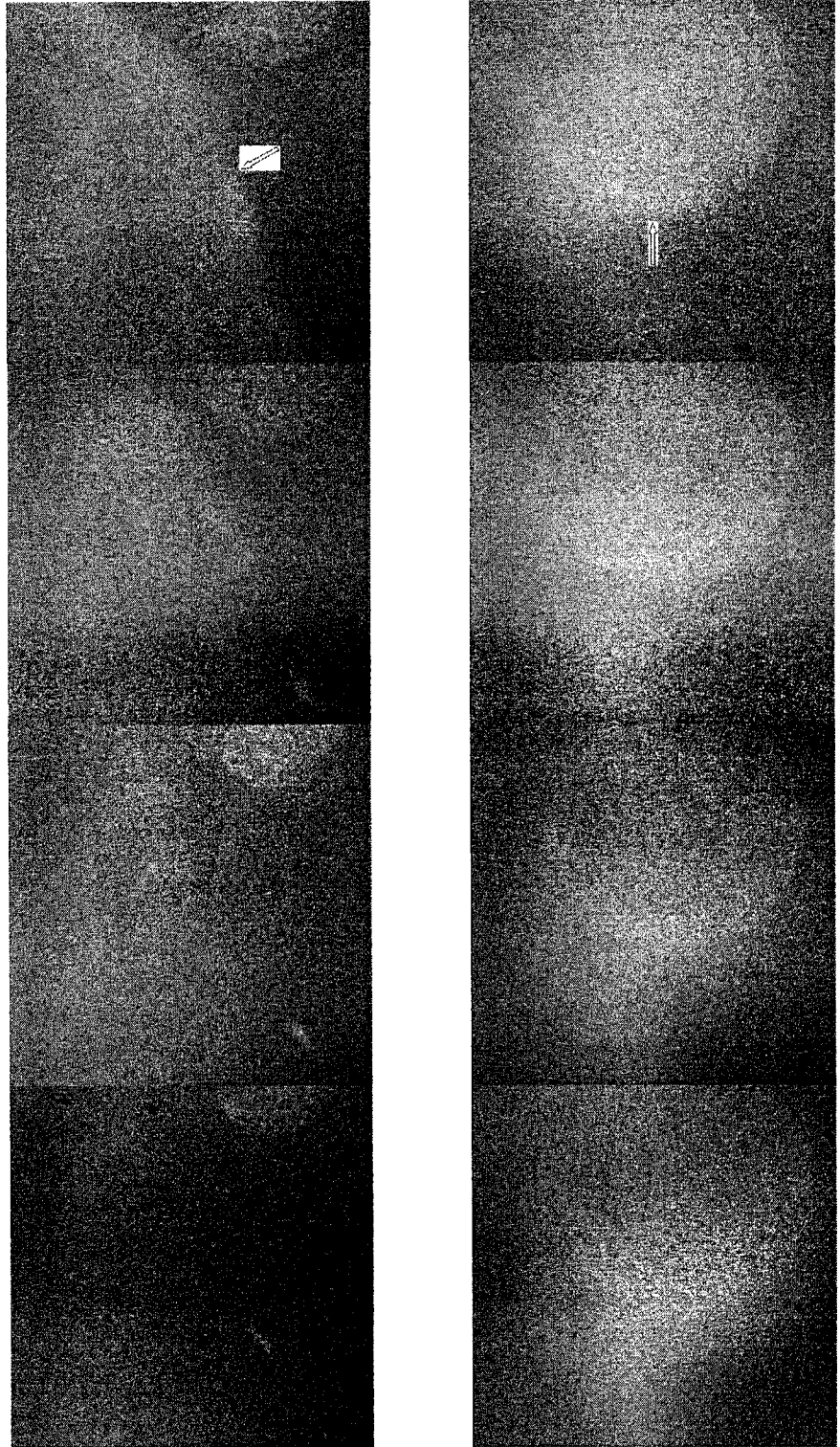


图 7

热启动后
0 分钟

实验组

对照组

30 分钟

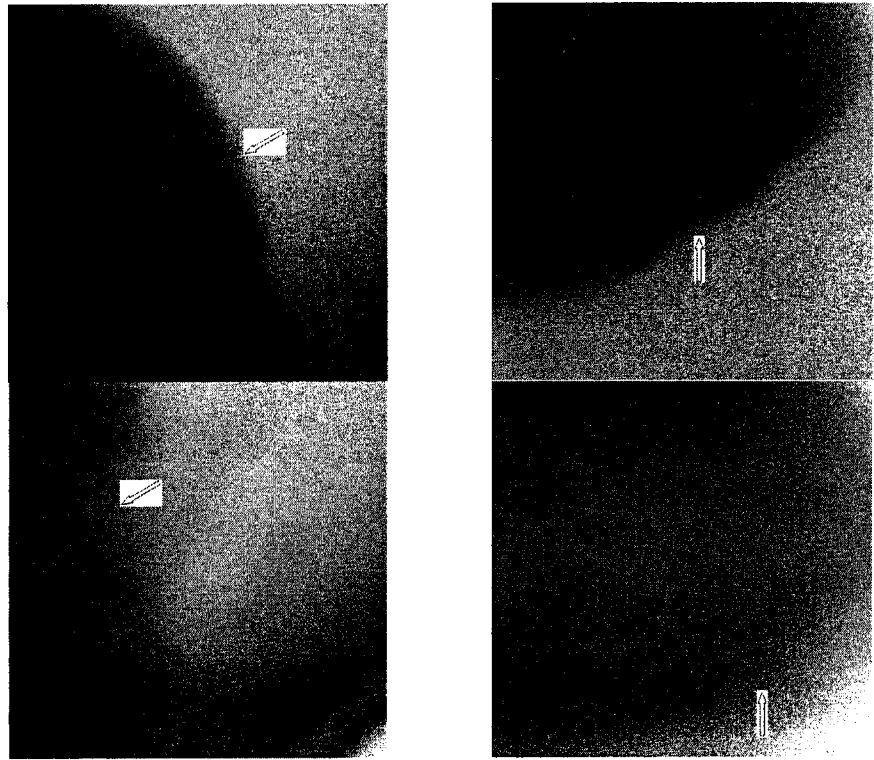
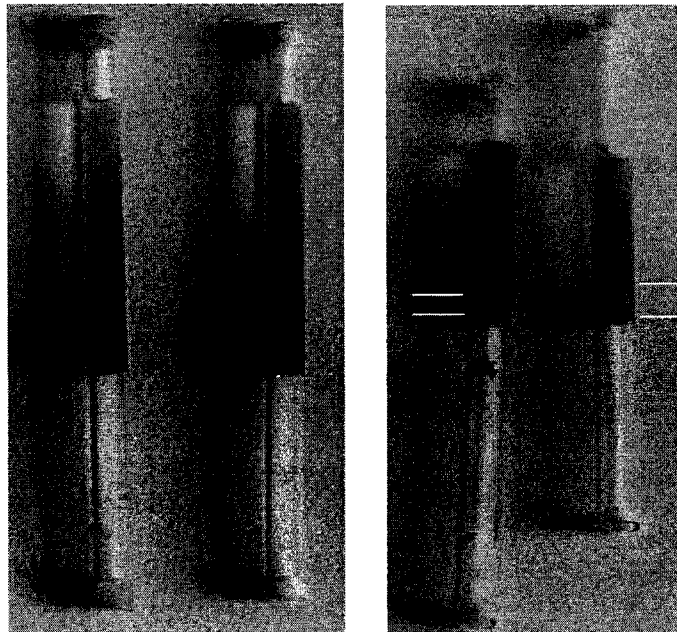


图 8



A

B

图 9

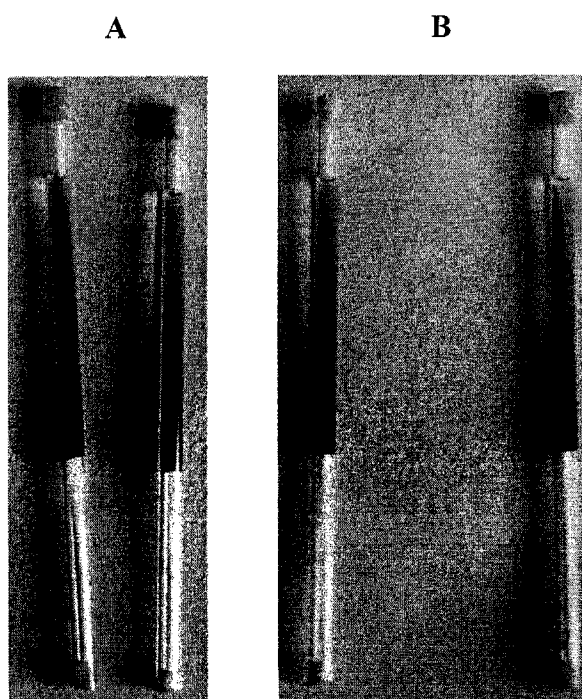


图 10

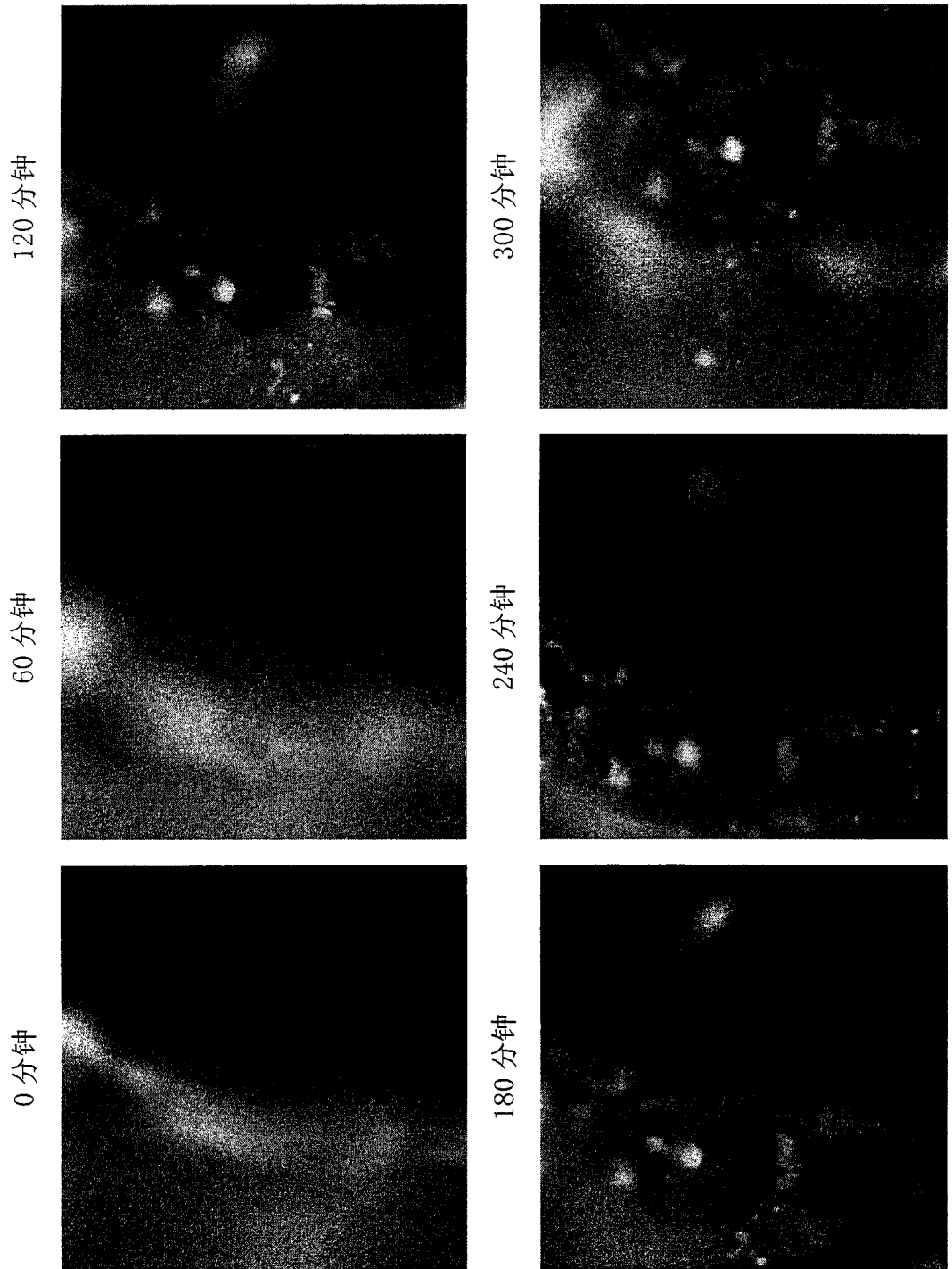


图 11

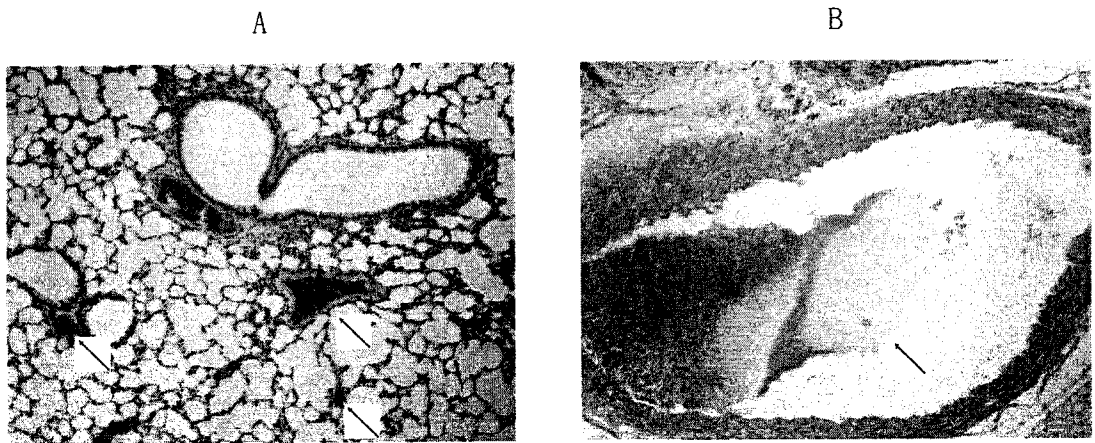


图 12

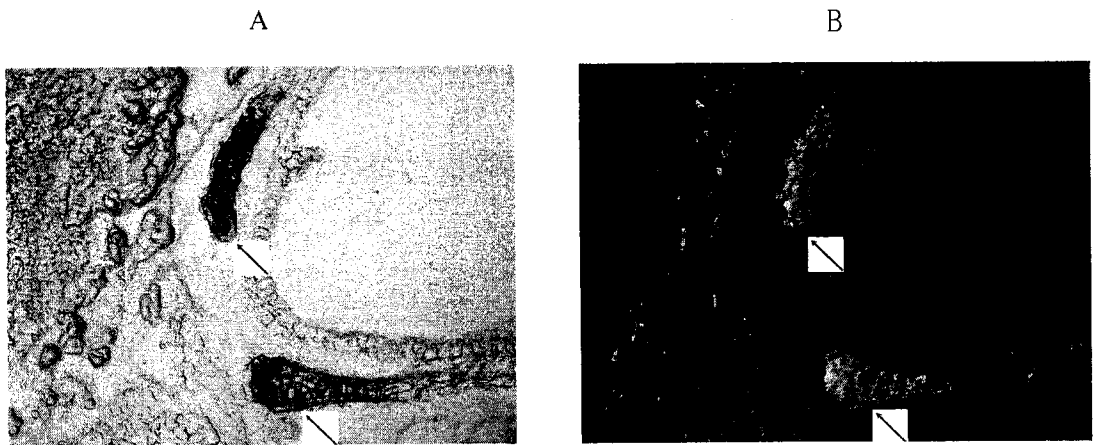


图 13

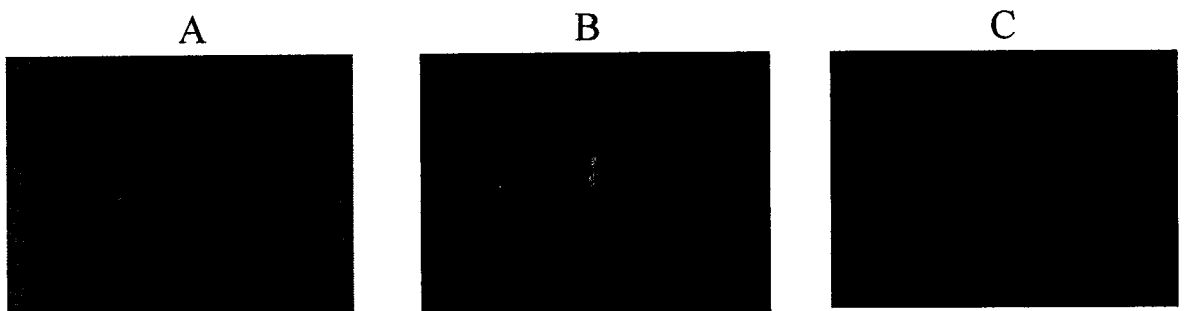


图 14

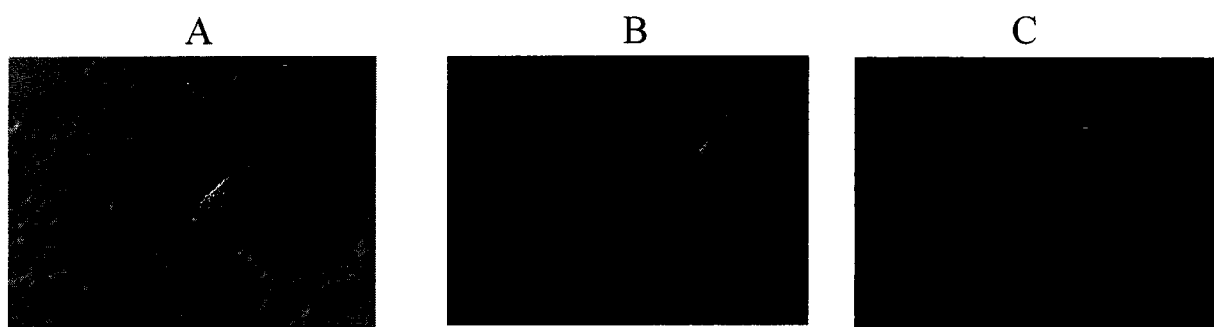


图 15

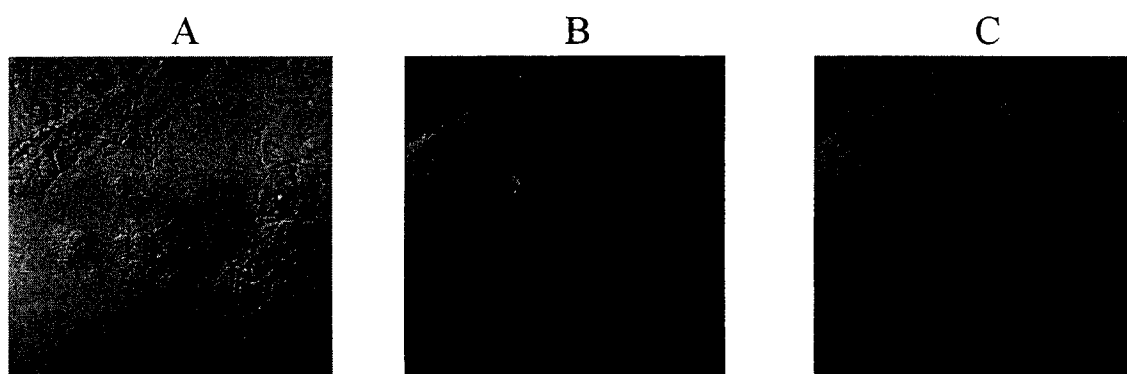


图 16



图 17

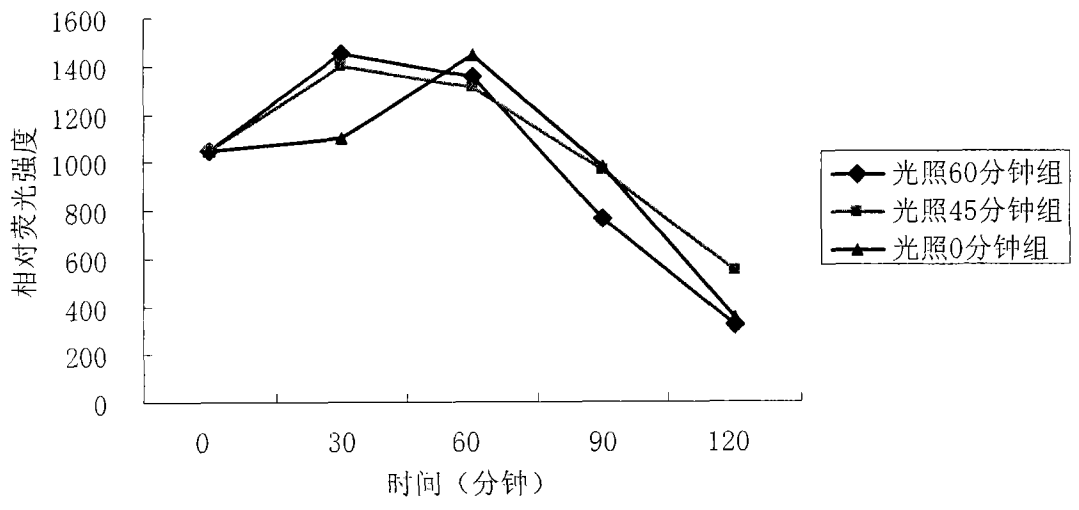


图 18