



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108562738 A

(43)申请公布日 2018.09.21

(21)申请号 201810323247.5

(22)申请日 2018.04.03

(71)申请人 宁波大学

地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路
818号宁波大学

(72)发明人 胡宇芳 张青青 徐利华 王娇
饶家佳 郭智勇 王邃

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图2页

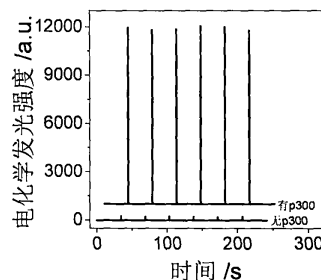
(54)发明名称

一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光
法拉第笼免疫传感器

Ab₂/p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为电极c,
即为电化学发光法拉第笼免疫传感器。

(57)摘要

本发明公开了一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器,特点是包括以下步骤:(1)制备捕获单元:合成磁性氧化石墨烯,依次用EDC/NHS溶液、HCl处理,随后与捕获抗体Ab₁结合,常温孵育,最后加入BSA封闭GO表面的非特异性结合位点获得捕获单元Ab₁-nanoFe₃O₄@GO;(2)制备信号单元:识别抗体Ab₂连接DNA四面体中,合成四面体-Ab₂;再合成纳米金(AuNPs),使之与氧化石墨烯形成复合物GO@AuNPs,随后与四面体-Ab₂结合,再加入Ru发光体,制得信号单元;(3)制备法拉第笼免疫传感器:取Ab₁-nanoFe₃O₄@GO溶液滴涂于MGCE表面,得Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为电极a;取p300溶液滴涂于Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,得p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为电极b;最后,取Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂溶液滴涂于p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,得Ru-GO@AuNPs-四面体-



1. 一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器,其特征在于该电化学发光免疫传感器通过以下方法构建的:

首先,制备捕获单元:合成磁性氧化石墨烯 $\text{nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$,依次用EDC/NHS溶液、HCl处理,随后与捕获抗体 Ab_1 结合,混合均匀,常温孵育,最后加入BSA封闭GO表面的非特异性结合位点获得捕获单元 $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 。其次,制备信号单元:识别抗体 Ab_2 连接DNA四面体中,合成四面体- Ab_2 ;再合成纳米金(AuNPs),使之与氧化石墨烯形成复合物 $\text{GO}@\text{AuNPs}$,随后与四面体- Ab_2 结合,再加入Ru发光体,制得信号单元。最后,制备法拉第笼免疫传感器:取 $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 滴涂于MGCE表面,得 $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}/\text{MGCE}$,记为电极a;取p300溶液滴涂于 $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}/\text{MGCE}$,得 $\text{p300}/\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}/\text{MGCE}$,记为电极b;再取 $\text{Ru-GO}@\text{AuNPs}$ -四面体- Ab_2 溶液滴涂于 $\text{p300}/\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}/\text{MGCE}$,得 $\text{Ru-GO}@\text{AuNPs}$ -四面体- $\text{Ab}_2/\text{p300}/\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}/\text{MGCE}$,记为电极c,即为电化学发光法拉第笼免疫传感器。

2. 如权利要求1所述的电化学发光法拉第笼免疫传感器,其特征是,制备氧化石墨烯 $\text{nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 的具体方法是:取20~60mg氧化石墨烯(GO)于20~60mL二次水中,超声15~45min后,加入25~75mL上述铁离子混合溶液,快速搅拌,将上述混合溶液温度升至75~95℃,在快速搅拌回流状态下,逐滴加入20~30%氨水(NH_4OH)至溶液pH为10,并反应30~60min,溶液颜色由棕色变为黑色,冷却至室温后,利用所得混合物的磁性,二次水反复清洗,直至上清液pH为中性,得到 $\text{nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 溶液,用PBS(0.1M, pH7.4)定容至10~30mL,得浓度2mg/mL $\text{nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 的分散液。

3. 如权利要求1、2所述的电化学发光法拉第笼免疫传感器,其特征是,合成捕获单元($\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$)的具体方法是:取25~75μL合成的 $\text{nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 于200μL离心管中,加入25~75μL新制备的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)溶液(100μM/10μM),混合均匀后,滴加0.1M HCl至上述溶液pH为5.0;常温孵育0.5~1.5h,使GO表面形成稳定的活性酯层;基于磁性,用水快速洗涤直至上清液为中性;然后加入25~75μL $0.5 \times 10^{-3} \sim 1.5 \times 10^{-3}$ mg/mL组蛋白乙酰转移酶第一抗体(Ab_1)溶液,混合均匀,常温孵育2~6h;最后加入25~75μL 2wt%牛血清蛋白(BSA),孵育0.5~1.5h,目的是封闭GO表面的非特异性结合位点;利用磁性,水洗三次,即可获得捕获单元 $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 。

4. 如权利要求1所述的电化学发光法拉第笼免疫传感器,其特征是,合成纳米金(AuNPs)的具体方法是:将氯金酸(HAuCl_4) (0.005~0.015M, 0.125~0.375mL),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) (0.05~0.15M, 0.5~1.5mL) 与水(7.05~10.05mL)混合,向反应混合物中加入抗坏血酸(0.05~0.15M, 0.5~1.5mL),然后加入氢氧化钠(0.05~0.15M, 0.5~1.5mL)。将溶液震荡1~3min,静置1~3h。然后得到CTAB包覆的AuNPs,7000rpm离心10min,纯化后分散在10mL超纯水中。

5. 如权利要求1、4所述的电化学发光法拉第笼免疫传感器,其特征是,合成纳米金/氧化石墨烯复合材料($\text{GO}@\text{AuNPs}$)的具体方法是:取2~6mg GO加入到0.5~1.5mL上述AuNPs溶液中,超声分散0.5~1.5h,得 $\text{GO}@\text{AuNPs}$,随后静置15~45min备用。

6. 如权利要求1所述的电化学发光法拉第笼免疫传感器,其特征是,合成DNA四面体-第二抗体(DNA四面体- Ab_2)的具体方法是:取修饰- NH_2 的DNA-A链(0.25~0.75μL, 10~30μM),加入组蛋白乙酰转移酶第二抗体溶液(Ab_2) (0.5~1.5μL, $0.5 \times 10^{-2} \sim 1.5 \times 10^{-2}$ mg/mL),同

时加入pH为6.0的EDC/NHS偶联试剂(0.5~1.5μL,100μM/10μM),室温下震荡1h,再超滤3次,得到纯度较高的DNA-A链-Ab₂复合物。另将DNA-B链(0.25~0.75μL,10~30μM)、DNA-C链(0.25~0.75μL,10~30μM)、DNA-D链(0.25~0.75μL,10~30μM)、Tris缓冲液(2.5~7.5μL,溶液组成:20mM Tris,50mM MgCl₂,pH8.0)和三(2-羧乙基)膦(TCEP)(0.5~1.5μL,15~45mM)加入到上述DNA-A链-Ab₂复合物溶液中,控制总体积为10μL,在90~100℃下,反应2.5~7.5min,然后4℃迅速降温1min。

7.如权利要求1、4~6所述的电化学发光法拉第笼免疫传感器,其特征是,合成信号单元(Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂)具体方法是:取2.5~7.5μL GO@AuNPs,加入5~15μL四面体-Ab₂溶液,震荡1~3min混合均匀,静置过夜,再加入2~6μL浓度为0.5~1.5mg/mL的Ru(phen)₃Cl₂·H₂O溶液混合均匀15~45min,4℃冰箱储存备用。

8.如权利要求1~7所述的电化学发光法拉第笼免疫传感器,其特征是,制备法拉第笼免疫传感器的具体方法是:取Ab₁-nanoFe₃O₄@GO混合液2.5~7.5μL,滴涂于磁性玻碳电极(MGCE)表面,静置0.5~1.5min,得Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为电极a;再取p300溶液2.5~7.5μL滴涂于Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE表面,37℃下孵育15~45min,得p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为b;最后,取Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂2.5~7.5μL滴涂于p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,37℃静置15~45min得Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂/p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为c,即为所需的电化学发光免疫传感器。

9.如权利要求1~8所述的电化学发光法拉第笼免疫传感器,其特征是,所述的电化学反应的条件如下:电位阶跃计时电流法,脉冲宽度:0.25s;脉冲间隔:30s;初始电压:-1.5V;脉冲电压:-1.5V。

10.如权利要求1~9所述的电化学发光法拉第笼免疫传感器,其特征是,本发明是基于组蛋白乙酰转移酶p300抗体与p300之间的特异性识别与结合而构建的电化学发光免疫传感器,因此待测液中的干扰物质并不能与抗体结合,对本检测体系无干扰。

一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器

技术领域

[0001] 本发明涉及检测组蛋白乙酰转移酶的方法,尤其是涉及一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器的构建方法,属于功能材料和生物传感技术领域。

背景技术

[0002] 组蛋白乙酰转移酶(HAT)是一种通过对核心组蛋白尾部赖氨酸残基进行可逆的乙酰化修饰进而调控转录的起始,由此介导基因激活和抑制的生物酶。组蛋白乙酰转移酶及其复合物参与了生物体内许多与基因转录调控相关的重要生理过程,如:DNA复制、修复,染色体组装以及细胞周期调控等。此外组蛋白乙酰化功能紊乱或乙酰转移酶的异常作用与肿瘤的形成特别是白血病的形成有关,代谢综合征和神经失调等也与乙酰化功能紊乱有紧密关系。在生物学及生理学上,HAT已经广泛用作药物标记。临床试验研究发现,乙酰化相关酶的量对恶性肿瘤细胞的发生发展有明显的抑制增殖或促进凋亡的作用,在癌症的发生发展及预后治疗中具有诱人的前景。总之,组蛋白乙酰化转移酶对恶性肿瘤的筛查、诊断、治疗和预防方面有着重要的指导意义。

[0003] 电化学发光(ECL),是通过电极对含有化学发光物质的体系施加一定的电压或通过一定的电流,电极氧化还原产物之间或电极氧化还原产物与体系其它共存物质之间发生化学反应并生成某种不稳定的中间态物质,该物质分解而产生的化学发光现象,既集成了发光与电化学分析技术的优点,又具有二者结合产生的可控性、选择性、重现性好、灵敏度高、检测限低及动力学响应范围宽等新优势。电化学发光免疫传感器是一种将电化学发光技术与免疫学分析方法相结合而发展起来的具有高灵敏度、高选择性、低背景等特点的生物传感器。近代临床医学对疾病标志物免疫分子快速、灵敏的检测要求,极大的推动了信号放大型的电化学发光免疫传感器的研究。且随着生物技术和纳米材料技术的迅速发展,利用化学、材料及生物等多种技术特异性地转化并放大与免疫反应有关的检测信号,成为电化学发光免疫传感器的重要研究方向,利用电化学发光的高灵敏、高特异及操作简单等优势,构建免疫传感器成为当前研究的热点课题之一。

[0004] 早期检测乙酰化相关酶的方法主要是依赖于放射自显影技术或者放射性同位素标记技术,但这两种方法需要标记放射性元素,存在耗时费力、成本较高且对环境污染较大等缺点。近年来,研究者们试图寻找一些不需要标记放射性同位素的方法对乙酰化相关酶进行检测,以抗体识别和酶联免疫检测方法最为典型。目前,乙酰化相关酶活性研究只是“冰山一角”,且大部分工作存在一些不足之处,如仪器昂贵、操作复杂、技术要求高、步骤繁多、易出现假阳性和假阴性、特异性不强、灵敏度不高、响应时间长、无法重复测量等。因此,开发灵敏、准确、快速、简便的组蛋白乙酰转移酶检测方法是迫切需求。

[0005] 本发明构建了一种新型的“法拉第笼式”电化学发光免疫传感器,检测组蛋白乙酰转移酶(以HAT p300为例)。该传感器构建过程中,使用捕获单元和信号单元。捕获单元的制备:由捕获抗体(Ab_1)结合至磁性氧化石墨烯($nanoFe_3O_4@GO$)表面得到 $Ab_1-nanoFe_3O_4@GO$,

Ab₁作为HAT p300第一抗体,捕获HAT p300。信号单元的制备:(1)通过氨基-羧基反应将HAT p300第二抗体(Ab₂)接入DNA四面体,记为四面体-Ab₂; (2)合成氧化石墨烯(GO)和纳米金(AuNPs)的复合材料(GO@AuNPs),通过金硫键作用将四面体-Ab₂接到该复合材料表面,再嵌入带正电荷的发光体水合二氯三(1,10-邻二氮杂菲)钌(II) (Ru(phen)₃Cl₂·H₂O,记为Ru),得到信号单元Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂。在“法拉第笼式”传感器的构建过程中,大幅度提高了电化学发光体的标记数量,且使所有标记的电化学发光体都是有效的,都可参与电化学反应,产生电化学发光,极大地增强了检测灵敏度。目前国内外未见基于DNA纳米技术构建电化学发光法拉第笼免疫传感器,并用于检测组蛋白乙酰转移酶p300的相关报道。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种灵敏度高、特异性强、组装过程简单以及检测速度快的一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器的构建方法。

[0007] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器,包括以下步骤:

[0008] (1) 捕获单元的制备

[0009] a. 铁离子混合溶液配制

[0010] 将0.4~1.2g FeCl₃·6H₂O及0.15~0.45g FeCl₂·4H₂O溶于25~75mL二次水中,混合均匀。现配现用。

[0011] b. 磁性氧化石墨烯(nanoFe₃O₄@GO)的合成

[0012] 取20~60mg氧化石墨烯(GO)于20~60mL二次水中,超声15~45min后,加入25~75mL上述铁离子混合溶液,快速搅拌,将上述混合溶液温度升至75~95℃,在快速搅拌回流状态下,逐滴加入20~30%氨水(NH₄OH)至溶液pH为10,并反应30~60min,溶液颜色由棕色变为黑色,冷却至室温后,利用所得混合物的磁性,二次水反复清洗,直至上清液pH为中性,得到nanoFe₃O₄@GO溶液,用磷酸缓冲溶液(PBS,0.1M,pH7.4)定容至10~30mL,得浓度2mg/mL nanoFe₃O₄@GO的分散液。

[0013] c. 捕获单元(Ab₁-nanoFe₃O₄@GO)的合成

[0014] 取25~75μL合成的nanoFe₃O₄@GO于200μL离心管中,加入25~75μL新制备的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)溶液(100μM/10μM),混合均匀后,滴加0.1M HCl至上述溶液pH为5.0;常温孵育0.5~1.5h,使GO表面形成稳定的活性酯层;基于磁性,用水快速洗涤直至上清液为中性;然后加入25~75μL 0.5×10⁻³~1.5×10⁻³mg/mL组蛋白乙酰转移酶第一抗体(Ab₁)溶液,混合均匀,常温孵育2~6h;最后加入25~75μL 2wt%牛血清蛋白(BSA),孵育0.5~1.5h,目的是封闭GO表面的非特异性结合位点;利用磁性,水洗三次,即可获得捕获单元Ab₁-nanoFe₃O₄@GO。

[0015] (2) 信号单元的制备

[0016] a. 纳米金(AuNPs)的合成

[0017] 将氯金酸(HAuCl₄) (0.005~0.015M,0.125~0.375mL),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) (0.05~0.15M,0.5~1.5mL)与水(7.05~10.05mL)混合,向反应混合物中加入抗坏血酸(0.05~0.15M,0.5~1.5mL),然后加入氢氧化钠(0.05~0.15M,0.5~1.5mL)。将溶液震荡1~3min,静置1~3h。然后得到CTAB包覆的AuNPs,7000rpm离心10min,纯化后分散在

10mL超纯水中。

[0018] b. 纳米金/氧化石墨烯复合材料(GO@AuNPs)的合成

[0019] 取2~6mg GO加入到0.5~1.5mL上述AuNPs溶液中,超声分散0.5~1.5h,得GO@AuNPs,随后静置15~45min备用。

[0020] c. DNA四面体-第二抗体(DNA四面体-Ab₂)的合成

[0021] 取修饰-NH₂的DNA-A链(0.25~0.75μL, 10~30μM),加入组蛋白乙酰转移酶第二抗体溶液(Ab₂)(0.5~1.5μL, $0.5 \times 10^{-2} \sim 1.5 \times 10^{-2}$ mg/mL),同时加入pH为6.0的EDC/NHS偶联试剂(0.5~1.5μL, 100μM/10μM),室温下震荡1h,再超滤3次,得到纯度较高的DNA-A链-Ab₂复合物。

[0022] 另将DNA-B链(0.25~0.75μL, 10~30μM)、DNA-C链(0.25~0.75μL, 10~30μM)、DNA-D链(0.25~0.75μL, 10~30μM)、Tris缓冲液(2.5~7.5μL, 溶液组成:20mM Tris, 50mM MgCl₂, pH8.0)和三(2-羧乙基)膦(TCEP)(0.5~1.5μL, 15~45mM)加入到上述DNA-A链-Ab₂复合物溶液中,控制总体积为10μL,在90~100℃下,反应2.5~7.5min,然后4℃迅速降温1min。

[0023] d. 信号单元的(Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂)合成

[0024] 取2.5~7.5μL GO@AuNPs,加入5~15μL四面体-Ab₂溶液,震荡1~3min混合均匀,静置过夜,再加入2~6μL浓度为0.5~1.5 mg/mL的Ru(phen)₃Cl₂·H₂O溶液混合均匀15~45min,4℃冰箱储存备用。

[0025] (3) 电化学发光法拉第笼免疫传感器的制备

[0026] 取Ab₁-nanoFe₃O₄@GO混合液2.5~7.5μL,滴涂于磁性玻碳电极(MGCE)表面,静置0.5~1.5min,得Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为电极a;再取p300溶液2.5~7.5μL滴涂于Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE表面,37℃下孵育15~45min,得p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为b;最后,取Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂溶液2.5~7.5μL滴涂于p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,37℃静置15~45min得Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂/p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为c,即为所需的电化学发光免疫传感器。

[0027] 所述的电化学反应的条件如下:电位阶跃计时电流法,脉冲宽度:0.25s;脉冲间隔:30s;初始电压:-1.5V;脉冲电压:-1.5V。

[0028] 发明原理:本发明利用抗原-抗体特异性识别作用连接捕获单元和信号单元,构建电化学发光法拉第笼免疫传感器,极大地提高组蛋白乙酰转移酶检测灵敏度。

[0029] 捕获单元:由捕获抗体(Ab₁为乙酰转移酶p300第一抗体)结合至磁性氧化石墨烯(nanoFe₃O₄@GO)表面得到Ab₁-nanoFe₃O₄@GO,Ab₁作为捕获抗体,捕获乙酰转移酶p300,并由磁力稳定吸附于磁性玻碳电极表面。

[0030] 信号单元:将乙酰转移酶p300第二抗体(Ab₂)连接到DNA四面体,记为四面体-Ab₂;
(2) 氧化石墨烯(GO)和纳米金(AuNPs)的复合物GO@AuNPs与四面体结合,再与发光体Ru结合,得到信号单元Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂。DNA四面体与抗体Ab₂通过氨基-羧基化学键合,再通过金硫键作用与GO@AuNPs结合,带正电的Ru发光体不仅可以嵌入DNA四面体结构中,并且可以结合带负电的GO@AuNPs复合材料,在“法拉第笼式”中,大幅度提高电化学发光体的标记数量,使所有标记的电化学发光体都是有效的,都可参与电化学反应,产生电化学发光,大大增强了组蛋白乙酰转移酶的检测灵敏度。

[0031] 与现有技术相比,本发明的优点在于:

[0032] (1) 高灵敏度,本发明的检测灵敏度远远高于现有方法,原因在于:首先,传统电化学发光免疫分析方法,是将电化学发光物质标记在肿瘤标志物抗体或者纳米材料上,可以标记的数量很有限,本发明使用的氧化石墨烯和纳米金的复合物与DNA四面体,标记了大量的Ru发光体,通过法拉第笼加速电子转移,构成了一种特殊的法拉第笼式电化学发光免疫传感器,使得发光信号大大增强,极大地提高了检测灵敏度。

[0033] (2) 高特异性,常见其他酶对本检测体系均无干扰。原因在于:本发明是基于组蛋白乙酰转移酶p300抗体与p300之间的特异性识别与结合而构建的电化学发光免疫传感器,干扰物质不是抗体的目标物,因此待测液中的干扰物质并不能与抗体结合,故对本检测体系无干扰。

[0034] (3) 结果准确,回收率均在90%~110%之间。

[0035] (4) 制备与检测方法简单、快速。

[0036] 综上所述,本发明制备一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器,兼具免疫分析的高选择性与电化学发光分析结合的高灵敏度,又通过法拉第笼式结构极大地增加了检测灵敏度,具有高灵敏度、高特异性、简单、快速、易于操作等优点,可以实现极低浓度组蛋白乙酰转移酶的检测,具有良好的应用前景。

附图说明

[0037] 图1为本发明传感器的可行性实验图;

[0038] 图2为本发明传感器对p300的电化学发光响应图;

[0039] 图3为本发明传感器的电化学发光响应强度对不同浓度p300的校准曲线图;

[0040] 图4为本发明传感器对p300的选择性实验图;

[0041] 图5为本发明传感器对p300的干扰性实验图。

具体实施方式

[0042] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0043] 一、具体实施例

[0044] 具体实施例1

[0045] 一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器,具体步骤如下:

[0046] (1) 捕获单元的制备

[0047] a. 铁离子混合溶液配制

[0048] 将0.8g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及0.3g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于50mL二次水中,混合均匀。现配现用。

[0049] b. 磁性氧化石墨烯($\text{nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$)的合成

[0050] 取40 mg氧化石墨烯(GO)于40mL二次水中,超声30min后,加入50mL上述铁离子混合溶液,快速搅拌,将上述混合溶液温度升至85℃,在快速搅拌回流状态下,逐滴加入25%氨水(NH_4OH)至溶液pH为10,并反应45min,溶液颜色由棕色变为黑色,冷却至室温后,利用所得混合物的磁性,二次水反复清洗,直至上清液pH为中性,得到 $\text{nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 溶液,用磷酸缓冲溶液(PBS, 0.1M, pH7.4)定容至20mL,得浓度2mg/mL $\text{nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 的分散液。

[0051] c. 捕获单元 ($\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4\text{@GO}$) 的合成

[0052] 取50 μL 合成的 $\text{nanoFe}_3\text{O}_4\text{@GO}$ 于200 μL 离心管中,加入50 μL 新制备的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)溶液(100 μM /10 μM),混合均匀后,滴加0.1M HCl至上述溶液pH为5.0;常温孵育1h,使GO表面形成稳定的活性酯层;基于磁性,用水快速洗涤直至上清液为中性;然后加入50 μL 10^{-3}mg/mL 组蛋白乙酰转移酶第一抗体(Ab_1)溶液,混合均匀,常温孵育4h;最后加入50 μL 2 wt%牛血清蛋白(BSA),孵育1h,目的是封闭GO表面的非特异性结合位点;利用磁性,水洗三次,即可获得捕获单元 $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4\text{@GO}$ 。

[0053] (2) 信号单元的制备

[0054] a. 纳米金(AuNPs)的合成

[0055] 将氯金酸(HAuCl_4) (0.01M, 0.25mL), 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) (0.1M, 1mL) 与水(8.55mL)混合,向反应混合物中加入抗坏血酸(0.1M, 0.1mL),然后加入氢氧化钠(0.1M, 0.1mL)。将溶液震荡2min,静置2h。然后得到CTAB包覆的AuNPs,7000rpm离心10min,纯化后分散在10mL超纯水中。

[0056] b. 纳米金/氧化石墨烯复合材料(GO@AuNPs)的合成

[0057] 取4mg GO加入到1mL上述AuNPs溶液中,超声分散1h,得 GO@AuNPs ,随后静置30min备用。

[0058] c. DNA四面体-第二抗体(DNA四面体- Ab_2)的合成

[0059] 取修饰- NH_2 的DNA-A链(0.5 μL , 20 μM),加入组蛋白乙酰转移酶第二抗体溶液(Ab_2) (1 μL , 10^{-2}mg/mL),同时加入pH为6.0的EDC/NHS偶联试剂(1 μL , 100 μM /10 μM),室温下震荡1h,再超滤3次,得到纯度较高的DNA-A链- Ab_2 复合物。

[0060] 另将DNA-B链(0.5 μL , 20 μM)、DNA-C链(0.5 μL , 20 μM)、DNA-D链(0.5 μL , 20 μM)、Tris缓冲液(5 μL , 溶液组成:20mM Tris, 50mM MgCl_2 , pH8.0)和三(2-羧乙基)膦(TCEP) (1 μL , 30mM)加入到上述DNA-A链- Ab_2 复合物溶液中,控制总体积为10 μL ,在95 $^\circ\text{C}$ 下,反应5min,然后4 $^\circ\text{C}$ 迅速降温1min。

[0061] d. 信号单元的(Ru-GO@AuNPs -四面体- Ab_2)合成

[0062] 取5 μL GO@AuNPs ,加入10 μL 四面体- Ab_2 溶液,震荡2min混合均匀,静置过夜,再加入4 μL 浓度为1mg/mL的 $\text{Ru(phen)}_3\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液混合均匀30min,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱储存备用。

[0063] (3) 法拉第笼免疫传感器的制备

[0064] 取 $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4\text{@GO}$ 混合液5 μL ,滴涂于磁性玻碳电极(MGCE)表面,静置1min,得 $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4\text{@GO/MGCE}$,记为电极a;再取p300溶液5 μL 滴涂于 $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4\text{@GO/MGCE}$ 表面,37 $^\circ\text{C}$ 下孵育30min,得p300/ $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4\text{@GO/MGCE}$,记为b;最后,取 Ru-GO@AuNPs -四面体- Ab_2 溶液5 μL 滴涂于p300/ $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4\text{@GO/MGCE}$,37 $^\circ\text{C}$ 静置30min得 Ru-GO@AuNPs -四面体- Ab_2 /p300/ $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4\text{@GO/MGCE}$,记为c,即为所需的电化学发光免疫传感器。

[0065] 所述的电化学反应的条件如下:电位阶跃计时电流法,脉冲宽度:0.25s;脉冲间隔:30s;初始电压:-1.5V;脉冲电压:-1.5V。

[0066] 具体实施例2

[0067] 一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器,具体步骤如下:

[0068] (1) 捕获单元的制备

[0069] a. 铁离子混合溶液配制

[0070] 将0.4g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及0.15g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于25mL二次水中,混合均匀。现配现用。

[0071] b. 磁性氧化石墨烯($\text{nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$)的合成

[0072] 取30mg氧化石墨烯(GO)于30mL二次水中,超声40min后,加入38mL上述铁离子混合溶液,快速搅拌,将上述混合溶液温度升至85℃,在快速搅拌回流状态下,逐滴加入28%氨水(NH_4OH)至溶液pH为10,并反应40min,溶液颜色由棕色变为黑色,冷却至室温后,利用所得混合物的磁性,二次水反复清洗,直至上清液pH为中性,得到 $\text{nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 溶液,用磷酸缓冲溶液(PBS, 0.1M, pH7.4)定容至15mL,得浓度2mg/mL $\text{nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 的分散液。

[0073] c. 捕获单元($\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$)的合成

[0074] 取40μL合成的 $\text{nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 于200μL离心管中,加入40μL新制备的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)溶液(100μM/10μM),混合均匀后,滴加0.1M HCl至上述溶液pH为5.0;常温孵育0.8h,使GO表面形成稳定的活性酯层;基于磁性,用水快速洗涤直至上清液为中性;然后加入40μL $1.25 \times 10^{-3}\text{mg/mL}$ 组蛋白乙酰转移酶第一抗体(Ab_1)溶液,混合均匀,常温孵育5h;最后加入40μL 2 wt%牛血清蛋白(BSA),孵育0.8h,目的是封闭GO表面的非特异性结合位点;利用磁性,水洗三次,即可获得捕获单元 $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 。

[0075] (2) 信号单元的制备

[0076] a. 纳米金(AuNPs)的合成

[0077] 将氯金酸(HAuCl_4) (0.075M, 0.33mL), 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) (0.75M, 0.14mL) 与水(9.05mL)混合,向反应混合物中加入抗坏血酸(0.075M, 0.33mL),然后加入氢氧化钠(0.075M, 0.33mL)。将溶液震荡3min,静置3h。然后得到CTAB包覆的AuNPs, 7000rpm离心10min,纯化后分散在10mL超纯水中。

[0078] b. 纳米金/氧化石墨烯复合材料($\text{GO}@\text{AuNPs}$)的合成

[0079] 取2mg GO加入到0.5mL上述AuNPs溶液中,超声分散1.1h,得 $\text{GO}@\text{AuNPs}$,随后静置20min备用。

[0080] c. DNA四面体-第二抗体(DNA四面体- Ab_2)的合成

[0081] 取修饰- NH_2 的DNA-A链(0.25μL, 30μM),加入组蛋白乙酰转移酶第二抗体溶液(Ab_2) (0.75μL, $1.4 \times 10^{-2}\text{mg/mL}$),同时加入pH为6.0的EDC/NHS偶联试剂(0.75μL, 100μM/10μM),室温下震荡1h,再超滤3次,得到纯度较高的DNA-A链- Ab_2 复合物。

[0082] 另将DNA-B链(0.25μL, 30μM)、DNA-C链(0.25μL, 30μM)、DNA-D链(0.25μL, 30μM)、Tris缓冲液(7μL, 溶液组成: 20mM Tris, 50mM MgCl_2 , pH8.0)和三(2-羧乙基)膦(TCEP) (0.5μL, 45mM)加入到上述DNA-A链- Ab_2 复合物溶液中,控制总体积为10μL,在90℃下,反应4min,然后4℃迅速降温1min。

[0083] d. 信号单元的($\text{Ru-GO}@\text{AuNPs}$ -四面体- Ab_2)合成

[0084] 取2.5μL $\text{GO}@\text{AuNPs}$,加入5μL四面体- Ab_2 溶液,震荡3min混合均匀,静置过夜,再加入2μL浓度为1.5mg/mL的 $\text{Ru(phen)}_3\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液混合均匀20min,4℃冰箱储存备用。

[0085] (3) 法拉第笼免疫传感器的制备

[0086] 取 $\text{Ab}_1\text{-nanoFe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 混合液5.5μL,滴涂于磁性玻碳电极(MGCE)表面,静置1.5min,

得Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为电极a;再取p300溶液5.5μL滴涂于Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE表面,37℃下孵育40min,得p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为b;最后,取Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂溶液5.5μL滴涂于p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,37℃静置40min得Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂/p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为c,即为所需的电化学发光免疫传感器。

[0087] 所述的电化学反应的条件如下:电位阶跃计时电流法,脉冲宽度:0.25s;脉冲间隔:30s;初始电压:-1.5V;脉冲电压:-1.5V。

[0088] 具体实施例3

[0089] 一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器,具体步骤如下:

[0090] (1) 捕获单元的制备

[0091] a. 铁离子混合溶液配制

[0092] 将1.2g FeCl₃·6H₂O及0.45g FeCl₂·4H₂O溶于75mL二次水中,混合均匀。现配现用。

[0093] b. 磁性氧化石墨烯(nanoFe₃O₄@GO)的合成

[0094] 取20mg氧化石墨烯(GO)于20mL二次水中,超声35min后,加入25mL上述铁离子混合溶液,快速搅拌,将上述混合溶液温度升至85℃,在快速搅拌回流状态下,逐滴加入20%氨水(NH₄OH)至溶液pH为10,并反应50min,溶液颜色由棕色变为黑色,冷却至室温后,利用所得混合物的磁性,二次水反复清洗,直至上清液pH为中性,得到nanoFe₃O₄@GO溶液,用磷酸缓冲溶液(PBS,0.1M,pH7.4)定容至10mL,得浓度2mg/mL nanoFe₃O₄@GO的分散液。

[0095] c. 捕获单元(Ab₁-nanoFe₃O₄@GO)的合成

[0096] 取25μL合成的nanoFe₃O₄@GO于200μL离心管中,加入25μL新制备的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)溶液(100μM/10μM),混合均匀后,滴加0.1M HCl至上述溶液pH为5.0;常温孵育1.2h,使GO表面形成稳定的活性酯层;基于磁性,用水快速洗涤直至上清液为中性;然后加入60μL 1.2×10⁻³mg/mL组蛋白乙酰转移酶第一抗体(Ab₁)溶液,混合均匀,常温孵育3h;最后加入25μL2 wt%牛血清蛋白(BSA),孵育1.2h,目的是封闭GO表面的非特异性结合位点;利用磁性,水洗三次,即可获得捕获单元Ab₁-nanoFe₃O₄@GO。

[0097] (2) 信号单元的制备

[0098] a. 纳米金(AuNPs)的合成

[0099] 将氯金酸(HAuCl₄) (0.012M,0.21mL),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) (0.12M,0.8mL)与水(8.85mL)混合,向反应混合物中加入抗坏血酸(0.12M,0.8mL),然后加入氢氧化钠(0.12M,0.8mL)。将溶液震荡1.8min,静置2.2h。然后得到CTAB包覆的AuNPs,7000rpm离心10min,纯化后分散在10mL超纯水中。

[0100] b. 纳米金/氧化石墨烯复合材料(GO@AuNPs)的合成

[0101] 取6mg GO加入到1.5mL上述AuNPs溶液中,超声分散1.2h,得GO@AuNPs,随后静置32min备用。

[0102] c. DNA四面体-第二抗体(DNA四面体-Ab₂)的合成

[0103] 取修饰-NH₂的DNA-A链(0.75μL,10μM),加入组蛋白乙酰转移酶第二抗体溶液(Ab₂)(1.5μL,0.7×10⁻²mg/mL),同时加入pH为6.0的EDC/NHS偶联试剂(1.2μL,100μM/10μM),室温下震荡1h,再超滤3次,得到纯度较高的DNA-A链-Ab₂复合物。

[0104] 另将DNA-B链(0.75 μ L,10 μ M)、DNA-C链(0.75 μ L,10 μ M)、DNA-D链(0.75 μ L,10 μ M)、Tris缓冲液(3.8 μ L,溶液组成:20mM Tris,50mM MgCl₂,pH8.0)和三(2-羧乙基)膦(TCEP)(0.5 μ L,45mM)加入到上述DNA-A链-Ab₂复合物溶液中,控制总体积为10 μ L,在96℃下,反应7.4min,然后4℃迅速降温1min。

[0105] d. 信号单元的(Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂)合成

[0106] 取4 μ L GO@AuNPs,加入8 μ L四面体-Ab₂溶液,震荡2.4min混合均匀,静置过夜,再加入6 μ L浓度为0.5mg/mL的Ru(phen)₃Cl₂·H₂O溶液混合均匀25min,4℃冰箱储存备用。

[0107] (3) 法拉第笼免疫传感器的制备

[0108] 取Ab₁-nanoFe₃O₄@GO混合液6 μ L,滴涂于磁性玻碳电极(MGCE)表面,静置1.1min,得Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为电极a;再取p300溶液6 μ L滴涂于Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE表面,37℃下孵育35min,得p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为b;最后,取Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂溶液6 μ L滴涂于p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,37℃静置35min得Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab₂,p300/Ab₁-nanoFe₃O₄@GO/MGCE,记为c,即为所需的电化学发光免疫传感器。

[0109] 所述的电化学反应的条件如下:电位阶跃计时电流法,脉冲宽度:0.25s;脉冲间隔:30s;初始电压:-1.5V;脉冲电压:-1.5V。

[0110] 二、应用实施例

[0111] 一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器

[0112] 应用实施例1

[0113] 可行性实验

[0114] 一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器,制备3种修饰电极,电极a、b、c的制备步骤同具体实施例1,记录此3种电极在含有19 μ L正三丙胺的5mL PBS(0.1M,pH7.4)中测量所得的电化学发光图。结果如图1所示,电极a和b在含有19 μ L正三丙胺的5mL PBS(0.1M,pH7.4)中基本无电化学发光响应,而电极c在含有19 μ L正三丙胺的5mL PBS(0.1M,pH7.4)中的电化学发光响应信号较明显,证明该组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器制备成功及其检测策略是可行的。

[0115] 应用实施例2

[0116] 一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器,电极c的制备步骤同具体实施例1,记录电极c在有或无p300时,在含有19 μ L正三丙胺的5mL PBS(0.1M,pH7.4)中测量所得的电化学发光响应。结果如图2所示,无p300时,电极对含有19 μ L正三丙胺的5mL PBS(0.1M,pH7.4)基本无电化学发光响应,而在p300存在下,显示较强的电化学发光信号,证明该传感器可用于p300检测。

[0117] 应用实施例3

[0118] 一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器,电极c的制备步骤同具体实施例1,记录利用不同浓度p300制备电极c时,记录电极c在含有19 μ L正三丙胺的5mL PBS(0.1M,pH7.4)中测量所得的电化学发光响应,根据实验结果,获得一系列不同浓度的p300对应的电化学发光强度大小,建立电化学发光强度与p300浓度之间的定量关系,根据两者之间的定量关系,确定待测样品中p300的浓度。p300检测终浓度范围为0~100nM。实验结果如图3所示,说明随着p300浓度增大,传感器的电化学响应越明显,线性相关方程为 $y = 129.9x - 54.5$, $R^2 = 0.9989$,线性范围为0.05~90nM,检测限为8.7pM,说明传感器对p300

可实现高灵敏度检测。

[0119] 应用实施例4

[0120] 一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器,选择性实验中p300及其它酶的浓度均为90nM,所用到的其它酶的缩写如下:乙酰胆碱酯酶(AChE)、胆碱氧化酶(ChOx)、溶菌酶(LZM)、凝血酶(TB)、木瓜蛋白酶(Papain)、碱性磷酸酶(ALP)。电极c的制备步骤同具体实施例1,在制备电极c时,使用不同种类的酶替换p300,其他条件不变,记录电极c在含有19 μ L正三丙胺的5mL PBS (0.1M, pH7.4) 中测量所得的电化学发光响应,结果如图4所示,与p300对比,传感器对其它酶的电化学响应非常小,基本接近空白信号,说明传感器对p300具有优秀的选择性。

[0121] 应用实施例5

[0122] 一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器,干扰性实验中p300及其它酶的浓度均为90nM,所用到的其它酶的缩写如下:乙酰胆碱酯酶(AChE)、胆碱氧化酶(ChOx)、溶菌酶(LZM)、凝血酶(TB)、木瓜蛋白酶(Papain)、碱性磷酸酶(ALP)。电极c的制备步骤同具体实施例1,在制备电极c时,使用不同种类的酶与p300同时存在,其他条件不变,记录电极c在含有19 μ L正三丙胺的5mL PBS (0.1M, pH7.4) 中测量所得的电化学发光响应,结果如图5所示,其它酶存在时,对传感器的性能基本无影响,说明传感器对p300检测具有优秀的抗干扰性。

[0123] 当然,上述说明并非对本发明的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在本发明的实质范围内做出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明保护范围。

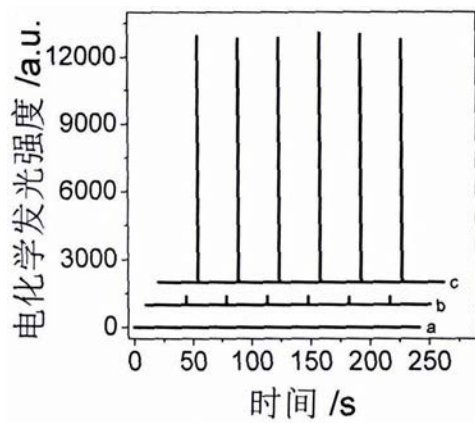


图1

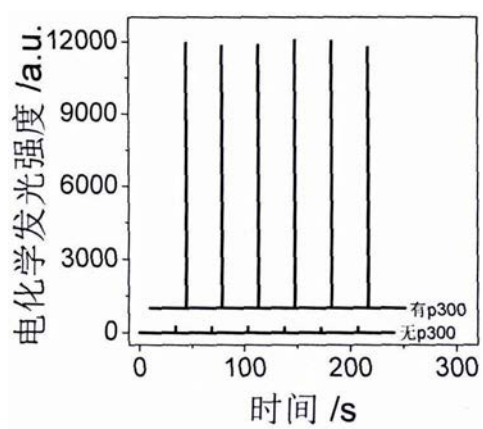


图2

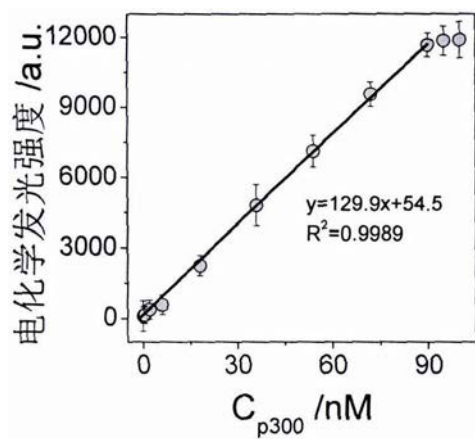


图3

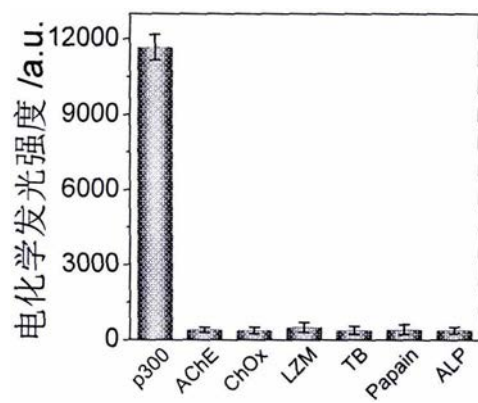


图4

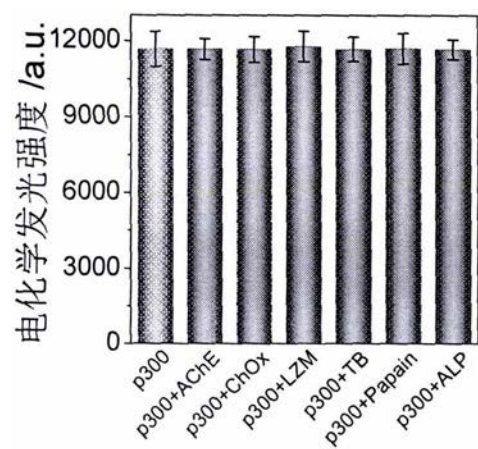


图5

专利名称(译)	一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器		
公开(公告)号	CN108562738A	公开(公告)日	2018-09-21
申请号	CN201810323247.5	申请日	2018-04-03
[标]申请(专利权)人(译)	宁波大学		
申请(专利权)人(译)	宁波大学		
当前申请(专利权)人(译)	宁波大学		
[标]发明人	胡宇芳 张青青 徐利华 王娇 饶家佳 郭智勇 王邃		
发明人	胡宇芳 张青青 徐利华 王娇 饶家佳 郭智勇 王邃		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测组蛋白乙酰转移酶的电化学发光法拉第笼免疫传感器，特点是包括以下步骤：(1)制备捕获单元：合成磁性氧化石墨烯，依次用EDC/NHS溶液、HCl处理，随后与捕获抗体Ab1结合，常温孵育，最后加入BSA封闭GO表面的非特异性结合位点获得捕获单元Ab1-nanoFe₃O₄@GO；(2)制备信号单元：识别抗体Ab2连接DNA四面体中，合成四面体-Ab2；再合成纳米金(AuNPs)，使之与氧化石墨烯形成复合物GO@AuNPs，随后与四面体-Ab2结合，再加入Ru发光体，制得信号单元；(3)制备法拉第笼免疫传感器：取Ab1-nanoFe₃O₄@GO溶液滴涂于MGCE表面，得Ab1-nanoFe₃O₄@GO/MGCE，记为电极a；取p300溶液滴涂于Ab1-nanoFe₃O₄@GO/MGCE，得p300/Ab1-nanoFe₃O₄@GO/MGCE，记为电极b；最后，取Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab2溶液滴涂于p300/Ab1-nanoFe₃O₄@GO/MGCE，得Ru-GO@AuNPs-四面体-Ab2/p300/Ab1-nanoFe₃O₄@GO/MGCE，记为电极c，即为电化学发光法拉第笼免疫传感器。

