



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108593751 B

(45) 授权公告日 2021.03.26

(21) 申请号 201810323693.6

(22) 申请日 2018.04.03

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108593751 A

(43) 申请公布日 2018.09.28

(73) 专利权人 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 27/48 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

审查员 吴爱坪

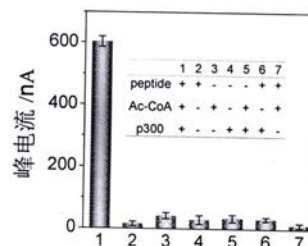
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学
法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用,特点是包括以下步骤:(1) peptide/Au的制备:分别取乙酰转移酶p300与多肽、乙酰辅酶A在PBS (0.1M, pH 7.0) 中充分混合,于恒温水浴锅中孵育。取催化反应液滴涂于金电极表面,4℃冰箱中孵育;(2) MB&AuNPs@GO-Ab的制备:将HAuCl₄, CTAB与水混合,向反应混合物中加入抗坏血酸,然后加入NaOH,得到CTAB覆盖的AuNPs,离心、纯化后分散在等量水中,再向溶液中加入GO超声分散,静置备用,随后加入乙酰基抗体孵育,最后加入MB震荡混合均匀;(3) 电化学法拉第笼免疫传感器的制备:取MB&AuNPs@GO-Ab滴涂于peptide/Au表面,室温下孵育,随后将制得的传感器置于PBS (0.1M, pH 7.0) 中进行电化学SWV测试。



1. 一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法,其特征是:该电化学法拉第笼免疫传感器通过以下方法构建的:

首先,制备多肽/金电极peptide/Au:分别取乙酰转移酶p300与多肽、乙酰辅酶A在磷酸缓冲溶液PBS中充分混合,于恒温水浴锅中孵育,获得催化反应液,取催化反应液滴涂于金电极表面,4℃冰箱中孵育;其次,制备亚甲基蓝固化的纳米金/石墨烯/乙酰基抗体复合材料MB&AuNPs@GO-Ab:将氯金酸HAuCl₄,十六烷基三甲基溴化铵CTAB与水混合,向反应混合物中加入抗坏血酸,然后加入NaOH,得到十六烷基三甲基溴化铵CTAB覆盖的纳米金AuNPs,离心、纯化后分散在等量水中,即得纳米金AuNPs溶液;再向溶液中加入氧化石墨烯GO超声分散,静置备用,即得纳米金AuNPs/氧化石墨烯复合材料AuNPs@GO溶液,随后加入乙酰基抗体孵育,最后加入亚甲基蓝MB震荡混合均匀,即得亚甲基蓝固化的纳米金/石墨烯/乙酰基抗体复合材料MB&AuNPs@GO-Ab溶液;最后制备电化学法拉第笼免疫传感器:取亚甲基蓝固化的纳米金/石墨烯/乙酰基抗体复合材料溶液MB&AuNPs@GO-Ab滴涂于多肽/金电极peptide/Au表面,室温下孵育,随后将制得的传感器置于磷酸缓冲溶液PBS中进行方波伏安法SWV测试;

其中磷酸缓冲溶液PBS浓度为0.1M,pH=7.0。

2. 如权利要求1所述的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法,其特征是,制备多肽/金电极peptide/Au的具体方法是:分别取乙酰转移酶p300与底物多肽,乙酰辅酶A在磷酸缓冲溶液PBS中充分混合,总体积10μL;将反应液置于25~35℃恒温水浴锅中孵育15~45min;取乙酰转移酶p300催化反应液3~7μL,滴涂于金电极表面,4℃冰箱中孵育4~10h;

其中,乙酰转移酶p300的浓度为50~150nM,用量1~3μL;

底物多肽的浓度为0.5~1.5mM,用量0.2~1.6μL;

乙酰辅酶A的浓度0.5~1.5mM,用量0.5~1.5μL;

磷酸缓冲溶液PBS浓度为0.1M,pH=7.0。

3. 如权利要求1所述的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法,其特征是,合成纳米金AuNPs溶液的具体方法是:将氯金酸HAuCl₄,十六烷基三甲基溴化铵CTAB与6.05~10.55mL水混合,向反应混合物中加入抗坏血酸,然后加入氢氧化钠;将溶液轻轻旋转10s,静置1~3h,得到十六烷基三甲基溴化铵CTAB包覆的纳米金AuNPs,7000rpm离心8~12min,纯化后分散在等量水中,即得纳米金AuNPs溶液;

其中,氯金酸HAuCl₄浓度为0.01~0.1M,用量0.025~0.25mL;

十六烷基三甲基溴化铵CTAB浓度为0.1~0.5M,用量0.2~1mL;

抗坏血酸浓度为0.05~0.5M,用量0.02~0.2mL;

氢氧化钠浓度为0.05~0.5M,用量0.02~0.2mL。

4. 如权利要求3所述的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法,其特征是,制备纳米金/氧化石墨烯复合材料AuNPs@GO溶液的具体方法是:取0.5~5mg氧化石墨烯GO加入到0.5~5mL纳米金AuNPs溶液中,超声分散2~6h,随后静置0.5~3.5h备用,即得纳米金AuNPs/氧化石墨烯复合材料AuNPs@GO溶液。

5. 如权利要求4所述的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法,其特征是,制备亚甲基蓝固化的纳米金/石墨烯/乙酰基抗体复合材料MB&AuNPs@GO-Ab溶液的具体方法是:取AuNPs@GO溶液5~15μL,加入乙酰基抗体Ab,30~40℃下孵育2~6h,再加入亚甲基蓝MB混合

震荡0.5~1.5h,即得亚甲基蓝固化的纳米金/石墨烯/乙酰基抗体复合材料MB&AuNPs@GO-Ab溶液;

其中,乙酰基抗体Ab浓度为 $0.5 \times 10^{-3} \sim 1.5 \times 10^{-3}$ mg/L,用量2.5~7.5 μ L;

亚甲基蓝MB浓度为0.05~0.2mM,用量2.5~7.5 μ L。

6.如权利要求5所述的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法,其特征是,制备电化学法拉第笼免疫传感器的具体方法是:取亚甲基蓝固化的纳米金/石墨烯/乙酰基抗体复合材料溶液MB&AuNPs@GO-Ab2.5~7.5 μ L滴涂于多肽/金电极peptide/Au表面,室温下孵育15~45min,将所制备的传感器置于磷酸缓冲溶液PBS中进行电化学响应实验;

其中,磷酸缓冲溶液PBS浓度为0.1M,pH=7.0。

7.如权利要求1~6任意一项所述的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法制备的电化学法拉第笼免疫传感器的应用,其特征是,利用该电化学法拉第笼免疫传感器实现乙酰转移酶p300活性检测及其小分子抑制剂的筛选,通过方波伏安法SWV,设置电位范围为-0.4~-0.05V,检测传感器在磷酸缓冲溶液PBS中的电化学催化亚甲基蓝MB的SWV响应,获得一系列不同浓度的乙酰转移酶p300或不同浓度的小分子抑制剂对应的电流大小,探究电流响应与乙酰转移酶p300浓度或小分子抑制剂之间的关系;

其中,磷酸缓冲溶液PBS浓度为0.1M,pH=7.0。

一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及电化学免疫传感器,尤其是涉及检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及其在生物环境中的检测应用,属于功能材料和生物传感技术领域。

背景技术

[0002] 癌症,也被称为恶性肿瘤,是当今人类社会的三大疾病之一,对人类健康的影响日趋显著。尽管关于恶性肿瘤的研究已经取得令人鼓舞的进展,但是关于恶性肿瘤的预防和治疗却不甚完善,还需要多学科交叉结合发展,进行深层次的研究。因此,发展新型的分析传感方法及平台,快速、高灵敏、多通道地动态监测癌症相关标志物及其发生发展过程,为癌症的预防、诊断、治疗以及预后执行提供方向。翻译后修饰 (PTM) 是细胞对蛋白质实行复杂调控和信息传递的基础,它不仅影响蛋白质的高级结构和生物活性,还调节其亚细胞定位、代谢周期以及与其它大分子物质的相互作用,癌症的发生发展与PTM密切相关。目前PTM相关酶分析方法主要集中于蛋白激酶,而对蛋白质乙酰化相关酶研究较少。2010年, Science杂志聚焦报道了乙酰化对代谢通路及代谢酶活性的调节,科学家们逐渐深入研究蛋白质乙酰化相关酶。组蛋白乙酰化反应多发生在核心组蛋白氨基酸碱性氨基酸集中区的特定赖氨酸残基上,其基本原理是将乙酰辅酶A (Ac-CoA) 的乙酰基转移到赖氨酸的 NH_3^+ 上。组蛋白乙酰化水平是由组蛋白乙酰化转移酶 (HAT) 和去乙酰化酶 (HDAC) 协调决定的。乙酰化转移酶通过在组蛋白的氨基端赖氨酸残基上引入中性的乙酰基,使组蛋白与DNA间的空间位阻增大、静电引力减小,导致两者间亲和作用减弱, DNA易于解凝聚,染色质表现出具有活性的转录结构,有利于DNA模板与转录因子亲和,激活基因转录;相反,去乙酰化酶催化的去乙酰化作用,使带负电的DNA与带正电的组蛋白紧密结合,染色质表现出卷曲致密的阻抑结构,抑制基因转录,组蛋白的乙酰化行使染色质转录调控的开关功能。异常的组蛋白乙酰化/去乙酰化修饰影响到恶性肿瘤细胞生长、分化、凋亡、增殖相关基因的调控,从而往往导致恶性肿瘤的发生、增殖。因此,研究乙酰化相关酶活性对于理解癌症成因和进展具有重要的意义。此外,临床试验研究发现,乙酰化相关酶抑制剂对多种恶性肿瘤细胞有明显的抑制增殖和促进凋亡的作用,可以选择性地高效杀伤肿瘤细胞,在癌症治疗中具有诱人的前景。同时,组蛋白乙酰化修饰与疾病状态及化疗效应紧密相关,可以通过赖氨酸的乙酰化程度跟踪和判断癌症相关生理进程,如高复发风险、预后治疗和独立预测因子等。总之,乙酰化作用及修饰对肿瘤的筛查、诊断、治疗和预防方面有着重要的指导意义,基于乙酰化相关酶活性进行抗肿瘤药物的设计与筛选,为抗癌药物的开发和疾病治疗手段的发展提供了新方向。

[0003] 目前已经存在许多检测乙酰转移酶的方法。最传统的方法是利用放射显影技术或者同位素标记技术。但是由于这种传统的方法包含放射性元素,往往成本较高且对环境污染较大。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HAT进行检测,

在这些方法中,以通过抗体识别和酶联免疫的方法对HAT进行检测的工作最为典型。这些方法都有一定的灵敏度和准确度,但也各有一定的不足之处:有的仪器昂贵、操作复杂、技术要求高,有的步骤繁多、易出现假阳性和假阴性,有的使用放射性试剂,有的特异性不强、灵敏度不高,有的响应时间长、无法重复测量。因此,开发灵敏、准确、快速、简便的组蛋白乙酰转移酶活性检测方法是迫切需求。免疫传感器是利用抗体与抗原之间的特异性识别与结合而研制成的一类生物传感器,电化学免疫传感器是电化学和免疫传感器相结合的产物,其中无标记型电化学免疫传感器以具备快速、稳定、选择性强、重现性好、易于操作、步骤简单等优点被广泛运用,具有良好的应用前景。

[0004] 本发明基于具有比表面积大、边缘位点多、生物相容性好等优点的石墨烯(GO)和纳米金(AuNPs),构建了一种特异性好、灵敏度高、结果准确可靠、成本低、快速、制备过程极其简单的能够检测乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器,以HATp300为例,其基本原理如下:乙酰转移酶(HAT)通过将乙酰辅酶A(Ac-CoA)上的乙酰基转移至底物非组蛋白底物多肽的特定赖氨酸残基上,得到乙酰化多肽,通过半胱氨酸可以牢固修饰于金电极表面;随后,合成纳米金/石墨烯/乙酰基抗体复合材料(标注为AuNPs@GO-Ab),再利用静电作用将亚甲基蓝(MB)固化到该复合材料表面,通过乙酰基多肽上的乙酰基与乙酰基抗体之间的特异性结合作用构建乙酰转移酶活性检测的电化学法拉第笼免疫传感器,随着HAT p300浓度的增大,反应生成乙酰化多肽的量逐渐增大,结合的抗体数目越多,在电极表面形成大量的法拉第笼结构,极大地增强了电化学响应信号,得到可高灵敏检测HAT p300活性的电化学法拉第笼免疫传感器。目前未见基于纳米金/石墨烯/乙酰基抗体复合材料用来检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的报道。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种特异性好、灵敏度高、检测速度快、结果准确可靠、成本低的检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用,通过对亚甲基蓝(MB)的电化学催化,从而实现组蛋白乙酰转移酶活性的检测及其小分子抑制剂的筛选。

[0006] 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活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用,具体步骤如下:

[0007] (1) 多肽/金电极(peptide/Au)的制备

[0008] 分别取乙酰转移酶p300(50~150nM,1~3 μ L)与底物多肽(0.5~1.5mM,0.2~1.6 μ L),乙酰辅酶A(0.5~1.5mM,0.5~1.5 μ L)在磷酸缓冲溶液(PBS)中(0.1M,pH7.0)充分混合,总体积10 μ L。将反应液置于25~35 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中孵育15~45min。取p300催化反应液3~7 μ L,滴涂于金电极表面,4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育4~10h。

[0009] (2) 亚甲基蓝固化的纳米金/石墨烯/乙酰基抗体复合材料(MB&AuNPs@GO-Ab)的制备

[0010] a. 纳米金(AuNPs)的合成

[0011] 将氯金酸(HAuCl_4) (0.01~0.1M,0.025~0.25mL),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) (0.1~0.5M,0.2~1mL)与水(6.05~10.55mL)混合,向反应混合物中加入抗坏血酸(0.05~0.5M,0.02~0.2mL),然后加入氢氧化钠(0.05~0.5M,0.02~0.2mL)。将溶液轻轻旋转10s,

静置1~3h,得到CTAB包覆的AuNPs,7000rpm离心8~12min,纯化后分散在等量水中。

[0012] b. 纳米金/氧化石墨烯复合材料 (AuNPs@GO) 的制备

[0013] 取0.5~5mg GO加入到0.5~5mL上述AuNPs溶液中,超声分散2~6h,随后静置0.5~3.5h备用。

[0014] c. MB&AuNPs@GO-Ab的制备

[0015] 取上述AuNPs@GO溶液5~15μL,加入乙酰基抗体 (Ab) ($0.5 \times 10^{-3} \sim 1.5 \times 10^{-3}$ mg/L, 2.5~7.5μL), 30~40℃下孵育2~6h,再加入MB (0.05~0.2mM, 2.5~7.5μL) 混合震荡0.5~1.5h。

[0016] (3) 电化学法拉第笼免疫传感器的制备

[0017] 取MB&AuNPs@GO-Ab 2.5~7.5μL滴涂于peptide/Au表面,室温下孵育15~45min,将所制备的传感器置于PBS (0.1M, pH7.0) 中进行电化学响应实验。

[0018] 利用上述制备的电化学法拉第笼免疫传感器实现p300活性检测及其小分子抑制剂的筛选,通过方波伏安法 (SWV), 设置电位范围为-0.4~-0.05V, 检测传感器在PBS (0.1M, pH7.0) 中电化学催化MB的SWV响应,获得一系列不同浓度p300对应的电流大小,探究电流响应与p300浓度之间的关系。

[0019] 发明原理: 本发明是一种电化学法拉第笼免疫传感器, 乙酰转移酶可以将乙酰辅酶A (Ac-CoA) 上的乙酰基转移至底物多肽的特定赖氨酸残基上, 生成乙酰化多肽, 通过金硫键反应牢固修饰于金电极表面。再通过乙酰基及乙酰基抗体的特异性结合作用将MB&AuNPs@GO-Ab复合材料固化到电极表面, 形成若干法拉第笼, 成功构建能够检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器, 这是一种简单快速、高灵敏、高选择性的p300活性检测及其小分子抑制剂筛选的分析方法。

[0020] 与现有技术相比, 本发明的优点在于: 本发明构建了一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器, 并成功应用于其小分子抑制剂的筛选。首先, 在乙酰辅酶A和多肽混合溶液中加入p300, 使得乙酰基团转移至多肽结构上, 再将乙酰化多肽修饰于电极表面; 其次, 合成生物相容性好、导电性好的纳米金, 与石墨烯结合, 随后依次加入抗体和亚甲基蓝, 得MB&AuNPs@GO-Ab复合材料; 最后, 将制得的MB&AuNPs@GO-Ab滴涂于乙酰化多肽修饰的金电极表面, 制得所需电化学法拉第笼免疫传感器。利用方波伏安法 (SWV) 检测传感器对不同浓度p300及其小分子抑制剂的电化学响应。显然, 在酶浓度一定范围内, 目标物p300浓度越大, 电流响应越明显, 而在小分子抑制剂浓度一定范围内, 抑制剂浓度不断增加, 电流响应越弱。实验结果表明, 电流大小与目标物p300浓度在一定范围内呈线性关系, 实现对目标物的检测, 而抑制剂的存在对酶活性存在一定的抑制作用。其优点在于:

[0021] (1) 高灵敏度。实验得出传感器的电流响应对p300浓度的线性相关方程为 $I = 144.81 \text{gC}_{\text{p300}} + 307.1$, $R^2 = 0.9995$, 检测限为3pM, 由此说明传感器对p300可实现高灵敏度检测。

[0022] (2) 高特异性, 常见其他相关酶对本检测体系均无干扰。原因在于: 本发明是基于乙酰基抗体与乙酰基 (通过乙酰化反应产生, 需要p300参与) 之间的特异性识别与结合而构建的电化学法拉第笼免疫传感器, 干扰物质不是抗体的直接或间接目标物, 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。

[0023] (3) 结果准确。通过该电化学法拉第笼免疫传感器对MB电催化活性的检测, 从而可

以实现对p300及其小分子抑制剂的检测,通过实验现象和检测结果,可以得出传感器的电流响应与p300浓度及其小分子抑制剂的相关关系。

[0024] (4) 制备与检测方法试剂用量少、检测速度快、成本低。本发明只需消耗少量材料和试剂就可制备组蛋白乙酰转移酶电化学法拉第笼免疫传感器,通过对MB电催化活性的检测,从而实现对p300及其小分子抑制剂的检测。

附图说明

[0025] 图1为本发明传感器的可行性实验图;

[0026] 图2为本发明传感器对有无p300的电化学响应;

[0027] 图3为本发明传感器对不同浓度p300的电流响应对p300浓度的校准曲线图;

[0028] 图4为不同浓度C646对p300活性的抑制作用;

[0029] 图5为不同浓度漆树酸对p300活性的抑制作用;

[0030] 图6本发明传感器对p300的选择性实验图。

具体实施方式

[0031] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0032] 一、具体实施例

[0033] 具体实施例1

[0034] 一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用,具体步骤如下:

[0035] (1) 多肽/金电极 (peptide/Au) 的制备

[0036] 分别取乙酰转移酶p300 (100nM, 2 μ L) 与底物多肽 (1mM, 0.4 μ L), 乙酰辅酶A (1mM, 1 μ L) 在磷酸缓冲溶液 (PBS) 中 (0.1M, pH7.0) 充分混合, 总体积10 μ L。将反应液置于30℃恒温水浴锅中孵育30min。取p300催化反应液5 μ L, 滴涂于金电极表面, 4℃冰箱中孵育4h。

[0037] (2) 亚甲基蓝固化的纳米金/石墨烯/乙酰基抗体复合材料 (MB&AuNPs@GO-Ab) 的制备

[0038] a. 纳米金 (AuNPs) 的合成

[0039] 将氯金酸 (HAuCl₄) (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)。将溶液轻轻旋转10s, 静置2h, 得到CTAB包覆的AuNPs, 7000rpm离心10min, 纯化后分散在等量水中。

[0040] b. 纳米金/氧化石墨烯复合材料 (AuNPs@GO) 的制备

[0041] 取1mg GO加入到1mL上述AuNPs溶液中, 超声分散4h, 随后静置2h备用。

[0042] c. MB&AuNPs@GO-Ab的制备

[0043] 取上述AuNPs@GO溶液10 μ L, 加入乙酰基抗体 (Ab) (10⁻³mg/L, 5 μ L), 37℃下孵育4h, 再加入MB (0.1mM, 5 μ L) 混合震荡1h。

[0044] (3) 电化学法拉第笼免疫传感器的制备

[0045] 取MB&AuNPs@GO-Ab 5 μ L滴涂于peptide/Au表面, 室温下孵育30min, 将所制备的传感器置于PBS (0.1M, pH7.0) 中进行电化学响应实验。

[0046] 具体实施例2

[0047] 一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用,具体步骤如下:

[0048] (1) 多肽/金电极 (peptide/Au) 的制备

[0049] 分别取乙酰转移酶p300 (120nM, 1.7 μ L) 与底物多肽 (1.2mM, 0.3 μ L), 乙酰辅酶A (1.2mM, 0.8 μ L) 在磷酸缓冲溶液 (PBS) 中 (0.1M, pH7.0) 充分混合, 总体积10 μ L。将反应液置于32 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中孵育25min。取p300催化反应液4 μ L, 滴涂于金电极表面, 4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育5h。

[0050] (2) 亚甲基蓝固化的纳米金/石墨烯/乙酰基抗体复合材料 (MB&AuNPs@GO-Ab) 的制备

[0051] a. 纳米金 (AuNPs) 的合成

[0052] 将氯金酸 (HAuCl₄) (0.1M, 0.025mL), 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) (0.5M, 0.2mL) 与水 (7.85mL) 混合, 向反应混合物中加入抗坏血酸 (0.5M, 0.02mL), 然后加入氢氧化钠 (0.5M, 0.02mL)。将溶液轻轻旋转10s, 静置1.9h, 得到CTAB包覆的AuNPs, 7000rpm离心12min, 纯化后分散在等量水中。

[0053] b. 纳米金/氧化石墨烯复合材料 (AuNPs@GO) 的制备

[0054] 取2mg GO加入到2mL上述AuNPs溶液中, 超声分散5h, 随后静置2.5h备用。

[0055] c. MB&AuNPs@GO-Ab的制备

[0056] 取上述AuNPs@GO溶液5 μ L, 加入乙酰基抗体 (Ab) (0.5×10^{-3} mg/L, 5 μ L), 34 $^{\circ}$ C下孵育5h, 再加入MB (0.08mM, 4 μ L) 混合震荡0.8h。

[0057] (3) 电化学法拉第笼免疫传感器的制备

[0058] 取MB&AuNPs@GO-Ab 4.5 μ L滴涂于peptide/Au表面, 室温下孵育25min, 将所制备的传感器置于PBS (0.1M, pH7.0) 中进行电化学响应实验。

[0059] 具体实施例3

[0060] 一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用,具体步骤如下:

[0061] (1) 多肽/金电极 (peptide/Au) 的制备

[0062] 分别取乙酰转移酶p300 (80nM, 2.5 μ L) 与底物多肽 (0.8mM, 0.5 μ L), 乙酰辅酶A (0.8mM, 1.25 μ L) 在磷酸缓冲溶液 (PBS) 中 (0.1M, pH7.0) 充分混合, 总体积10 μ L。将反应液置于33 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中孵育34min。取p300催化反应液4.8 μ L, 滴涂于金电极表面, 4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育7h。

[0063] (2) 亚甲基蓝固化的纳米金/石墨烯/乙酰基抗体复合材料 (MB&AuNPs@GO-Ab) 的制备

[0064] a. 纳米金 (AuNPs) 的合成

[0065] 将氯金酸 (HAuCl₄) (0.095M, 0.03mL), 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) (0.4M, 0.25mL) 与水 (7.95mL) 混合, 向反应混合物中加入抗坏血酸 (0.25M, 0.04mL), 然后加入氢氧化钠 (0.25M, 0.04mL)。将溶液轻轻旋转10s, 静置2.6h, 得到CTAB包覆的AuNPs, 7000rpm离心11min, 纯化后分散在等量水中。

[0066] b. 纳米金/氧化石墨烯复合材料 (AuNPs@GO) 的制备

[0067] 取2.5mg GO加入到2.5mL上述AuNPs溶液中,超声分散3h,随后静置3h备用。

[0068] c.MB&AuNPs@GO-Ab的制备

[0069] 取上述AuNPs@GO溶液12 μ L,加入乙酰基抗体(Ab) (0.8×10^{-3} mg/L, 6 μ L), 36 $^{\circ}$ C下孵育3h,再加入MB (0.15mM, 4.6 μ L) 混合震荡1.3h。

[0070] (3) 电化学法拉第笼免疫传感器的制备

[0071] 取MB&AuNPs@GO-Ab 6 μ L滴涂于peptide/Au表面,室温下孵育35min,将所制备的传感器置于PBS (0.1M, pH7.0) 中进行电化学响应实验。

[0072] 二、应用实施例

[0073] 一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用

[0074] 应用实施例1

[0075] 可行性实验

[0076] 一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用,在乙酰转移酶p300乙酰化反应过程中,步骤同具体实施例1。同时研究了在缺少乙酰转移酶p300、多肽(peptide)和乙酰辅酶A(Ac-CoA) 其中一种物质或其中两种物质时对乙酰化反应的影响。保持合成条件不变,在六种变量检测体系中,得到的合成溶液体积均为10 μ L,比较七种溶液修饰的电极在PBS (0.1M, pH7.0) 中的电化学响应。如图1,实验现象表明仅p300、peptide和Ac-CoA三者同时存在时,所得反应体系修饰电极在PBS (0.1M, pH7.0) 中有明显的响应信号,另外六种修饰电极的响应信号均可以忽略。证明在乙酰化反应中p300、peptide和Ac-CoA三者缺一不可,由此证明该实验在理论上和技术上是可行的。

[0077] 应用实施例2

[0078] 一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用,传感器的制备步骤同具体实施例1,记录传感器在有或无p300时的电化学响应。结果如图2所示,无p300时,传感器在PBS (0.1M, pH7.0) 中基本无电化学响应,而在p300存在时,存在明显的电化学响应,证明该传感器可用于p300活性检测。

[0079] 应用实施例3

[0080] 一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用,传感器的制备步骤同具体实施例1,记录传感器在PBS (0.1M, pH7.0) 中的电化学响应,根据实验结果,获得一系列不同浓度的p300对应的电化学响应曲线,建立电化学响应电流大小与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0~500nM。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 $I = 144.8 \lg C_{p300} + 307.1$, $R^2 = 0.9995$,线性范围为0.01~150nM,检测限为3pM,说明传感器对p300活性可实现高灵敏度检测。

[0081] 应用实施例4

[0082] 一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用,对p300抑制剂的检测步骤同具体实施例1。根据实验结果得知(如图4),随着抑制剂C646浓度的增大,相对应的电流响应越弱,说明C646对p300活性的抑制作用越强。另外,根据实验现象得知,即使C646浓度较小时,相对应的电流值变化也很明显;但是随着C646浓度增大,相对应的电流值变化不太明显,说明小浓度的C646就可以抑制p300的活性,抑制作用效

果好,C646抑制剂的半抑制浓度为11.5 μ M。

[0083] 应用实施例5

[0084] 一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用,对p300抑制剂的检测步骤同具体实施例1。根据实验结果得知(如图5),随着抑制剂漆树酸浓度的增大,相对应的电流响应越弱,说明漆树酸对p300活性的抑制作用越强。另外,根据实验现象得知,即使漆树酸浓度较小时,相对应的电流值变化也很明显;但是随着漆树酸浓度增大,相对应的电流值变化不太明显,说明小浓度的漆树酸就可以抑制p300的活性,抑制作用效果好,漆树酸抑制剂的半抑制浓度为39.2 μ M。

[0085] 应用实施例6

[0086] 一种检测组蛋白乙酰转移酶活性的电化学法拉第笼免疫传感器的构建方法及应用,选择性实验中p300及其它酶的浓度均为100nM,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)。传感器的制备步骤同具体实施例1,在制备传感器时,使用不同种类的酶替换p300,其他条件不变,记录传感器在PBS(0.1M,pH7.0)中测量所得的电化学响应,结果如图6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,说明传感器对于p300检测具有优秀的选择性。

[0087] 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。

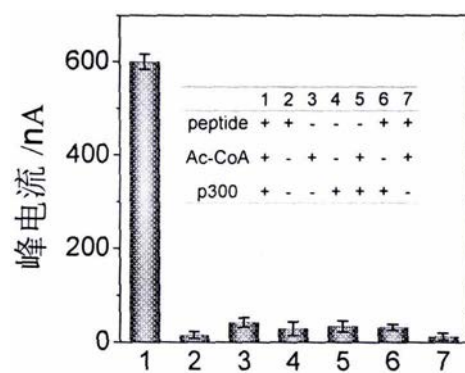


图1

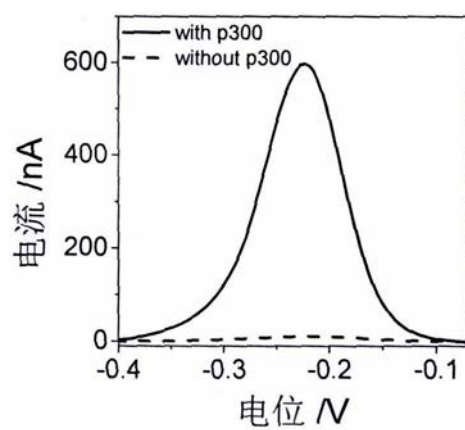


图2

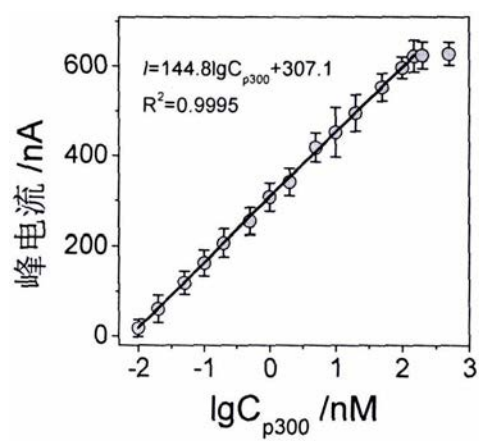


图3

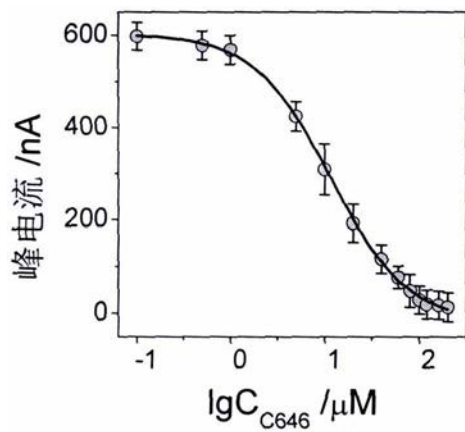


图4

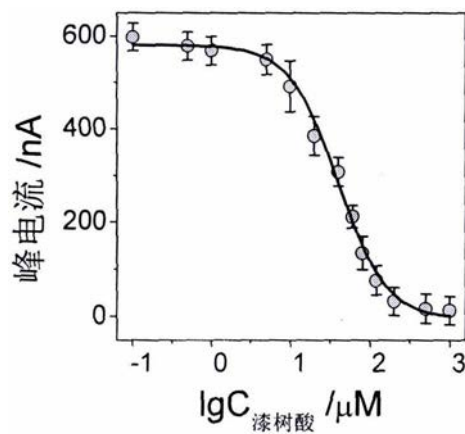


图5

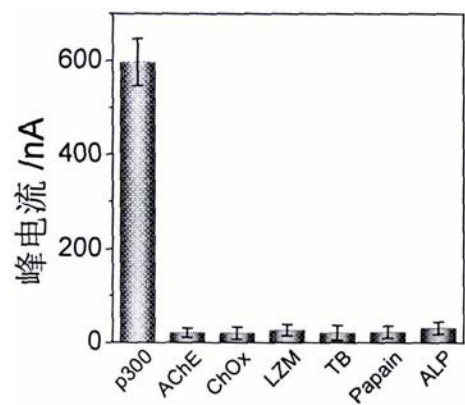


图6