



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110501407 A

(43)申请公布日 2019.11.26

(21)申请号 201910952259.9

(22)申请日 2019.10.09

(71)申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市市中区南辛庄
西路336号

(72)发明人 魏琴 贾越 杨磊 赵磊 任祥
张诺 马洪敏

(74)专利代理机构 济南誉丰专利代理事务所
(普通合伙企业) 37240

代理人 赵凤

(51)Int.Cl.

G01N 27/327(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

一种基于马来酰亚胺功能的琼脂糖凝胶基
蛋白微阵列免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明涉及一种基于马来酰亚胺功能的琼脂糖凝胶基蛋白微阵列免疫传感器的制备方法及应用,属于电化学传感与免疫分析领域;本发明采用有机合成法,用3-马来酰亚胺基苯甲酸琥珀酰亚胺酯(MBS)活化琼脂糖凝胶(AG),利用重组蛋白A的C端半胱氨酸巯基与MBS中的不饱和羰基间的特异性识别形成稳定硫醚键而构建一种蛋白基微阵列;该法能够有效维持蛋白A二级、三级结构稳定,同时将能够识别抗体Fc域的N端充分暴露,提升固定抗体的活性;再结合电致化学发光免疫传感策略,能够实现疾病标志物的超灵敏检测;该传感器构建简单,成本消耗低,灵敏度高,检测范围宽,临床应用潜力大。

1. 一种基于马来酰亚胺功能的琼脂糖凝胶基蛋白微阵列免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将玻碳电极分别在乙醇和去离子水中超声清洗30 s,依次用1.0 μm , 0.3 μm 和0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉对其抛光使之类似镜面般光滑,用氮气吹干;

(2) 在玻碳电极上滴涂3 ~ 6 μL MBS-AG,常温下晾干;

(3) 将上述电极浸入浓度为50 ~ 100 ng/mL的重组蛋白A溶液中30 ~ 60 min,构建蛋白微阵列,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面;

(4) 在电极表面滴涂6 μL 、浓度为2 ~ 5 mg/mL的 Ab_1 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面;

(5) 滴加3 μL 、质量分数为0.1%的牛血清白蛋白溶液,以封闭电极表面的非特异性活性位点,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面;

(6) 滴加6 μL 标准抗原溶液或未知浓度抗原溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化2 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面;

(7) 滴加6 μL Ni NCs-Ab_2 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面,传感器构建完毕。

2. 如权利要求1所述的一种基于马来酰亚胺功能的琼脂糖凝胶基蛋白微阵列免疫传感器的制备方法,所述MBS-AG,按以下步骤制备:

取出一定体积保存于20%乙醇溶液中的琼脂糖凝胶于布氏漏斗中,用超纯水洗净后抽滤20 min;称取10 ~ 30 g琼脂糖凝胶,置于250 mL锥形瓶中,再分别加入2 ~ 5 mL环氧氯丙烷、30 ~ 50 mL 2.5M NaOH(含0.02% NaBH_4),将锥形瓶放入恒温摇床35 $^{\circ}\text{C}$ (150 rpm)震荡反应4 h;反应结束后用大量的蒸馏水洗净冲干转移至150 mL锥形瓶,分别加入1 ~ 10 mL乙二醇和10 ~ 100 mL 0.1 M pH为9硼酸缓冲液于50 $^{\circ}\text{C}$ 反应3 h;

反应结束后用大量蒸馏水洗净抽干转移至250 mL锥形瓶,加入10 ~ 100 mL 20 mM pH为7.2的磷酸缓冲液;

称取0.01 ~ 0.05 g MBS于25 mL烧杯中,用移液管量取1 ~ 10 mL二甲基亚砜至烧杯中,MBS溶解之后将溶液倒入锥形瓶,残留的溶液使用15 mL 20 mM pH为7.2的磷酸缓冲液分三次润洗后倒入锥形瓶中,再将锥形瓶放入恒温摇床35 $^{\circ}\text{C}$ (150 rpm)震荡反应4 h。

3. 如权利要求1所述的一种基于马来酰亚胺功能的琼脂糖凝胶基蛋白微阵列免疫传感器的制备方法,所述信号标签 Ni NCs-Ab_2 ,按以下步骤制备:

室温下,将5 mL、浓度为5 ~ 10 mmol/L 的硝酸镍溶液与5 mL、浓度为50 ~ 100 mg/mL的牛血清蛋白溶液充分混合,有力搅拌2 ~ 5 min后,加入0.5 ~ 1 mL、浓度为1 mol/L的氢氧化钠溶液调节pH=12,然后将该混合液置于68 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中8 h,直至溶液颜色变为深黄色,此时,镍离子根离子已被BSA成功还原,随后,将上述溶液倒入孔径为3500 kDa透析袋,透析48 h,得到中性的 Ni NCs ;

取2 mL制备好的 Ni NCs ,加入1 ~ 5 μL 、浓度为1 ~ 10 mg/mL的EDC/NHS混合液,震荡5 min,加入100 ~ 300 μL 、浓度为10 mg/mL的 Ab_2 溶液,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡孵化12 h,离心后分散到1 mL pH 7.4的PBS缓冲溶液中得到 Ni NCs-Ab_2 溶液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存备用。

4. 如权利要求1所述的一种基于马来酰亚胺功能的琼脂糖凝胶基蛋白微阵列免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述抗原与抗体为阿尔兹海默症标志物 β -淀粉样蛋白及其对

应的抗体。

5. 如权利要求4所述的检测 β -淀粉样蛋白的浓度,其特征在于,步骤如下:

(1) 超微弱发光检测仪参数设置:光电倍增管高压设置为600 ~ 800 V,放大级数III;

(2) 电化学工作站参数设置:循环伏安法扫描电位范围0.5 ~ 1.2 V,扫描速率为0.1 V/s;

(3) 测试:以Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,以传感器为工作电极,在7 ~ 10 mL含200 ~ 300 mM三乙胺的PBS溶液中进行ECL测试,根据孵化不同浓度 β -淀粉样蛋白时产生的ECL信号强度绘制工作曲线。

一种基于马来酰亚胺功能的琼脂糖凝胶基蛋白微阵列免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于电化学传感与免疫分析领域。

背景技术

[0002] 电化学免疫传感器的灵敏度取决于传感器表面固化基底材料的特性,抗体的种类,免疫分子的数量以及其剩余活性,尽管利用纳米材料作为传感基质已经取得了良好的效果,但很多材料如镉基化合物不可避免的生物毒性以及错综复杂的电子传递路径,都大大影响了传感器的重复性;

金黄色葡萄球菌蛋白A是一种均匀分布在金黄色葡萄球菌细胞表面的表面蛋白,它与不同的球蛋白有着高度的亲和性,尤其是N端的五个高度同源IgG结合域能够特异性识别人血清中的抗体Fc片段,同时C端较宽范围的非结合域能够为蛋白A分子的改造与修饰提供较多位点,可以在C端利用基因技术引入化学活性基团,从而构造一个能够定位捕获抗体的蛋白微阵列,从而最小化蛋白质与抗体固定基质间的位阻;

琼脂糖凝胶是一种多孔材料,这使得其作为基质能够固定更多的蛋白A,且琼脂糖凝胶不带电基团所以不会导致非特异性吸附,这使得它成为一种优良的载体而被广泛使用;马来酰亚胺基化合物其 α - β 不饱和羰基与巯基之间特异性反应形成硫醚键在此被借鉴利用,如果能够用马来酰亚胺基化合物活化琼脂糖凝胶,并通过基因技术在蛋白A的C端修饰带有游离巯基的半胱氨酸,那么上述的蛋白微阵列便可顺利搭成。

发明内容

[0003] 本文发明技术任务之一是马来酰亚胺基琼脂糖凝胶的制备,用3-马来酰亚胺基苯甲酸琥珀酰亚胺酯(MBS)作为源材料,将琼脂糖凝胶用环氧氯丙烷、乙二胺处理后,与MBS实现开环反应制备活化产物;

本发明技术任务之二是将所构建的蛋白微阵列应用于免于传感器的构建与疾病标志物的检测中,所构建的电致发光免疫传感器在对 β -淀粉样蛋白的检测中灵敏度高,特异性强,检出限低,并且与传统方法相比,在重复性上有着巨大的突破,这得益于传感基质的稳定电子运输和对抗体的均匀捕获。

[0004] 实施例1. 一种基于马来酰亚胺功能的琼脂糖凝胶基蛋白微阵列免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将玻碳电极分别在乙醇和去离子水中超声清洗30 s,依次用1.0 μm , 0.3 μm 和0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉对其抛光使之类似镜面般光滑,用氮气吹干;

(2) 在玻碳电极上滴涂3 μL MBS-AG,常温下晾干;

(3) 将上述电极浸入浓度为50 ng/mL的重组蛋白A溶液中30 min,构建蛋白微阵列,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面;

(4) 在电极表面滴涂6 μL 、浓度为2 mg/mL的 Ab_1 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗

电极表面；

(5) 滴加3 μL 、质量分数为0.1%的牛血清白蛋白溶液，以封闭电极表面的非特异性活性位点，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面；

(6) 滴加6 μL 标准抗原溶液或未知浓度抗原溶液，37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化2 h，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面；

(7) 滴加6 μL Ni NCs-Ab₂溶液，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面，传感器构建完毕。

[0005] 实施例2. 一种基于马来酰亚胺功能的琼脂糖凝胶基蛋白微阵列免疫传感器的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 将玻碳电极分别在乙醇和去离子水中超声清洗30 s，依次用1.0 μm ，0.3 μm 和0.05 μm 的Al₂O₃抛光粉对其抛光使之类似镜面般光滑，用氮气吹干；

(2) 在玻碳电极上滴涂4.5 μL MBS-AG，常温下晾干；

(3) 将上述电极浸入浓度为75 ng/mL的重组蛋白A溶液中45 min，构建蛋白微阵列，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面；

(4) 在电极表面滴涂6 μL 、浓度为3.5 mg/mL的Ab₁溶液，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面；

(5) 滴加3 μL 、质量分数为0.1%的牛血清白蛋白溶液，以封闭电极表面的非特异性活性位点，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面；

(6) 滴加6 μL 标准抗原溶液或未知浓度抗原溶液，37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化2 h，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面；

(7) 滴加6 μL Ni NCs-Ab₂溶液，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面，传感器构建完毕。

[0006] 实施例3. 一种基于马来酰亚胺功能的琼脂糖凝胶基蛋白微阵列免疫传感器的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 将玻碳电极分别在乙醇和去离子水中超声清洗30 s，依次用1.0 μm ，0.3 μm 和0.05 μm 的Al₂O₃抛光粉对其抛光使之类似镜面般光滑，用氮气吹干；

(2) 在玻碳电极上滴涂6 μL MBS-AG，常温下晾干；

(3) 将上述电极浸入浓度为100 ng/mL的重组蛋白A溶液中60 min，构建蛋白微阵列，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面；

(4) 在电极表面滴涂6 μL 、浓度为5 mg/mL的Ab₁溶液，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面；

(5) 滴加3 μL 、质量分数为0.1%的牛血清白蛋白溶液，以封闭电极表面的非特异性活性位点，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面；

(6) 滴加6 μL 标准抗原溶液或未知浓度抗原溶液，37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化2 h，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面；

(7) 滴加6 μL Ni NCs-Ab₂溶液，4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗电极表面，传感器构建完毕。

[0007] 实施例4. MBS-AG，按以下步骤制备：

取出一定体积保存于20%乙醇溶液中的琼脂糖凝胶于布氏漏斗中，用超纯水洗净后抽

滤20 min;称取10 g琼脂糖凝胶,置于250 mL锥形瓶中,再分别加入2 mL环氧氯丙烷、30 mL 2.5M NaOH(含0.02% NaBH₄),将锥形瓶放入恒温摇床35 °C (150 rpm)震荡反应4 h;反应结束后用大量的蒸馏水洗净冲干转移至150 mL锥形瓶,分别加入1 mL乙二胺和10 mL 0.1 M pH为9硼酸缓冲液于50 °C反应3 h;

反应结束后用大量蒸馏水洗净抽干转移至250 mL锥形瓶,加入10 mL 20 mM pH为7.2的磷酸缓冲液。称取0.01 g MBS于25 mL烧杯中,用移液管量取1 mL二甲基亚砷至烧杯中,MBS溶解之后将溶液倒入锥形瓶,残留的溶液使用15 mL 20 mM pH为7.2的磷酸缓冲液分三次润洗后倒入锥形瓶中,再将锥形瓶放入恒温摇床35 °C (150 rpm)震荡反应4 h。

[0008] 实施例5. MBS-AG,按以下步骤制备:

取出一定体积保存于20%乙醇溶液中的琼脂糖凝胶于布氏漏斗中,用超纯水洗净后抽滤20 min;称取20 g琼脂糖凝胶,置于250 mL锥形瓶中,再分别加入3.5 mL环氧氯丙烷、40 mL 2.5M NaOH(含0.02% NaBH₄),将锥形瓶放入恒温摇床35 °C (150 rpm)震荡反应4 h;反应结束后用大量的蒸馏水洗净冲干转移至150 mL锥形瓶,分别加入5 mL乙二胺和45 mL 0.1 M pH为9硼酸缓冲液于50 °C反应3 h;

反应结束后用大量蒸馏水洗净抽干转移至250 mL锥形瓶,加入45 mL 20 mM pH为7.2的磷酸缓冲液。称取0.03 g MBS于25 mL烧杯中,用移液管量取5 mL二甲基亚砷至烧杯中,MBS溶解之后将溶液倒入锥形瓶,残留的溶液使用15 mL 20 mM pH为7.2的磷酸缓冲液分三次润洗后倒入锥形瓶中,再将锥形瓶放入恒温摇床35 °C (150 rpm)震荡反应4 h。

[0009] 实施例6. MBS-AG,按以下步骤制备:

取出一定体积保存于20%乙醇溶液中的琼脂糖凝胶于布氏漏斗中,用超纯水洗净后抽滤20 min;称取30 g琼脂糖凝胶,置于250 mL锥形瓶中,再分别加入5 mL环氧氯丙烷、50 mL 2.5M NaOH(含0.02% NaBH₄),将锥形瓶放入恒温摇床35 °C (150 rpm)震荡反应4 h;反应结束后用大量的蒸馏水洗净冲干转移至150 mL锥形瓶,分别加入10 mL乙二胺和100 mL 0.1 M pH为9硼酸缓冲液于50 °C反应3 h;

反应结束后用大量蒸馏水洗净抽干转移至250 mL锥形瓶,加入100 mL 20 mM pH为7.2的磷酸缓冲液。称取0.05 g MBS于25 mL烧杯中,用移液管量取10 mL二甲基亚砷至烧杯中,MBS溶解之后将溶液倒入锥形瓶,残留的溶液使用15 mL 20 mM pH为7.2的磷酸缓冲液分三次润洗后倒入锥形瓶中,再将锥形瓶放入恒温摇床35 °C (150 rpm)震荡反应4 h。

[0010] 实施例7. 信号标签Ni NCs- Ab₂,按以下步骤制备:

室温下,将5 mL、浓度为5 mmol/L 的硝酸镍溶液与5 mL、浓度为50 mg/mL 的牛血清蛋白溶液充分混合,有力搅拌2 min后,加入0.5 mL、浓度为1 mol/L的氢氧化钠溶液调节pH=12,然后将该混合液置于68 °C 水浴中8 h,直至溶液颜色变为深黄色,此时,镍离子根离子已被BSA成功还原,随后,将上述溶液倒入孔径为3500 kDa透析袋,透析48 h,得到中性的Ni NCs;

取2 mL制备好的Ni NCs,加入1 μL、浓度为 1 mg/mL的EDC/NHS混合液,震荡5 min,加入100 μL、浓度为10 mg/mL的Ab₂溶液,在4 °C下振荡孵化12 h,离心后分散到1 mL pH 7.4的PBS缓冲溶液中得到Ni NCs-Ab₂溶液,置于4 °C下储存备用。

[0011] 实施例8. 信号标签Ni NCs- Ab₂,按以下步骤制备:

室温下,将5 mL、浓度为8 mmol/L 的硝酸镍溶液与5 mL、浓度为80 mg/mL 的牛血清蛋

白溶液充分混合,有力搅拌3 min后,加入0.8 mL、浓度为1 mol/L的氢氧化钠溶液调节pH=12,然后将该混合液置于68 °C 水浴中8 h,直至溶液颜色变为深黄色,此时,镍离子根离子已被BSA成功还原,随后,将上述溶液倒入孔径为3500 kDa透析袋,透析48 h,得到中性的Ni NCs;

取2 mL制备好的Ni NCs,加入4 μ L、浓度为 8 mg/mL的EDC/NHS混合液,震荡5 min,加入200 μ L、浓度为10 mg/mL的Ab₂溶液,在4 °C下振荡孵化12 h,离心后分散到1 mL pH 7.4的PBS缓冲溶液中得到Ni NCs-Ab₂溶液,置于4 °C下储存备用。

[0012] 实施例9. 信号标签Ni NCs- Ab₂,按以下步骤制备:

室温下,将5 mL、浓度为10 mmol/L 的硝酸镍溶液与5 mL、浓度为100 mg/mL 的牛血清蛋白溶液充分混合,有力搅拌5 min后,加入1 mL、浓度为1 mol/L的氢氧化钠溶液调节pH=12,然后将该混合液置于68 °C 水浴中8 h,直至溶液颜色变为深黄色,此时,镍离子根离子已被BSA成功还原,随后,将上述溶液倒入孔径为3500 kDa透析袋,透析48 h,得到中性的Ni NCs;

取2 mL制备好的Ni NCs,加入5 μ L、浓度为10 mg/mL的EDC/NHS混合液,震荡5 min,加入300 μ L、浓度为10 mg/mL的Ab₂溶液,在4 °C下振荡孵化12 h,离心后分散到1 mL pH 7.4的PBS缓冲溶液中得到Ni NCs-Ab₂溶液,置于4 °C下储存备用。

[0013] 实施例10. 检测 β -淀粉样蛋白的浓度:

(1) 超微弱发光检测仪参数设置:光电倍增管高压设置为600 V,放大级数III;

(2) 电化学工作站参数设置:循环伏安法扫描电位范围0.5 V,扫描速率为0.1 V/s;

(3) 测试:以Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,以传感器为工作电极,在7 mL含200 mM三乙胺的PBS溶液中进行ECL测试,根据孵化不同浓度 β -淀粉样蛋白时产生的ECL信号强度绘制工作曲线。

[0014] 实施例11. 检测 β -淀粉样蛋白的浓度:

(1) 超微弱发光检测仪参数设置:光电倍增管高压设置为700 V,放大级数III;

(2) 电化学工作站参数设置:循环伏安法扫描电位范围0.8 V,扫描速率为0.1 V/s;

(3) 测试:以Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,以传感器为工作电极,在8 mL含250 mM三乙胺的PBS溶液中进行ECL测试,根据孵化不同浓度 β -淀粉样蛋白时产生的ECL信号强度绘制工作曲线。

[0015] 实施例12. 检测 β -淀粉样蛋白的浓度:

(1) 超微弱发光检测仪参数设置:光电倍增管高压设置为800 V,放大级数III;

(2) 电化学工作站参数设置:循环伏安法扫描电位范围1.2 V,扫描速率为0.1 V/s;

(3) 测试:以Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,以传感器为工作电极,在10 mL含300 mM三乙胺的PBS溶液中进行ECL测试,根据孵化不同浓度 β -淀粉样蛋白时产生的ECL信号强度绘制工作曲线。

专利名称(译)	一种基于马来酰亚胺功能的琼脂糖凝胶基蛋白微阵列免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN110501407A	公开(公告)日	2019-11-26
申请号	CN201910952259.9	申请日	2019-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	济南大学		
申请(专利权)人(译)	济南大学		
当前申请(专利权)人(译)	济南大学		
[标]发明人	魏琴 贾越 杨磊 赵磊 任祥 张诺 马洪敏		
发明人	魏琴 贾越 杨磊 赵磊 任祥 张诺 马洪敏		
IPC分类号	G01N27/327 G01N21/76 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/76 G01N27/3275 G01N33/53 G01N33/6893		
代理人(译)	赵凤		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于马来酰亚胺功能的琼脂糖凝胶基蛋白微阵列免疫传感器的制备方法及应用，属于电化学传感与免疫分析领域；本发明采用有机合成法，用3-马来酰亚胺基苯甲酸琥珀酰亚胺酯（MBS）活化琼脂糖凝胶（AG），利用重组蛋白A的C端半胱氨酸巯基与MBS中的不饱和羰基间的特异性识别形成稳定硫醚键而构建一种蛋白基微阵列；该法能够有效维持蛋白A二级、三级结构稳定，同时将能够识别抗体Fc域的N端充分暴露，提升固定抗体的活性；再结合电致化学发光免疫传感策略，能够实现疾病标志物的超灵敏检测；该传感器构建简单，成本消耗低，灵敏度高，检测范围宽，临床应用潜力大。