



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112649417 B

(45) 授权公告日 2021. 10. 29

(21) 申请号 202011383493.3

G01N 27/30 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.01

G01N 27/327 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01N 33/543 (2006.01)

申请公布号 CN 112649417 A

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.04.13

(56) 对比文件

(73) 专利权人 西北大学

CN 111458516 A, 2020.07.28

地址 710000 陕西省西安市碑林区太白北路229号

审查员 杨培

(72) 发明人 马芬 孙利娜 段宇宏 乔新蕊

(74) 专利代理机构 西安利泽明知识产权代理有限公司 61222

代理人 邢海杰

(51) Int. Cl.

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 27/26 (2006.01)

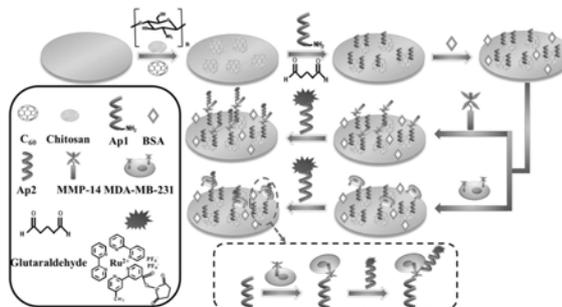
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

一种检测MMP-14的电化学发光生物传感器及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于一种检测肿瘤标记物MMP-14的电化学发光生物传感器及其制备方法,本发明得到的检测MMP-14的电化学发光生物传感器,当传感器与MMP-14相互作用后,MMP-14因与Ap1发生同源二聚而结合到电极表面后可以通过与Ap2异源二聚化将信号探针Ap2-Ru结合到电极表面,随着MMP-14浓度增大,结合到电极表面的Ap2-Ru浓度增大,电化学发光信号增强,基于此实现对MMP-14高选择性和高灵敏度检测;具有灵敏度高、选择性高、稳定性高、成本低廉等优点。



1. 一种检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - 步骤1,制备基底材料 C_{60} -Chit;
 - 步骤1.1,将 C_{60} 分散于超纯水中,超声后得到 C_{60} 水溶液;
 - 步骤1.2,将壳聚糖溶解于醋酸溶液中,搅拌后得到胶状壳聚糖溶液;
 - 步骤1.3,将 C_{60} 水溶液与壳聚糖溶液混合搅拌后得到基底材料 C_{60} -Chit;
 - 步骤2,配置MMP-14特异性识别探针;
 - 步骤2.1,将多肽抑制剂溶解于Tris-HCl缓冲液中,得到MMP-14特异性识别的探针溶液,其中,多肽抑制剂Ap1的氨基酸序列为:GYPKSALR-Ahx-(EG)₃-Cys;
 - 步骤3,电化学发光生物传感器的组装;
 - 步骤3.1,将 C_{60} -Chit滴加到玻碳电极表面待其自然晾干,得到 C_{60} -Chit/GCE电极;
 - 步骤3.2,将GA滴加到 C_{60} -Chit/GCE电极表面进行交联,然后用Tris-HCl缓冲溶液冲洗,得到GA/ C_{60} -Chit/GCE电极,其中GA为戊二醛;
 - 步骤3.3,将MMP-14特异性识别的探针溶液滴加到GA/ C_{60} -Chit/GCE电极表面进行交联,然后用Tris-HCl缓冲溶液冲洗,得到Ap1/GA/ C_{60} -Chit/GCE电极;
 - 步骤3.4,将BSA滴加到Ap1/GA/ C_{60} -Chit/GCE电极表面进行封闭,封闭后用Tris-HCl缓冲溶液冲洗电极表面;
 - 步骤3.5,制备信号探针,第二多肽抑制剂Ap2端头的氨基与双(联吡啶)-4'-甲基-4羰基吡啶钌-N-琥珀酰亚胺酯双六氟磷酸酯(Ru)进行酰胺化反应合成信号探针Ap2-Ru;当MMP-14通过与Ap1同源二聚化结合到电极表面时,通过与Ap2异源二聚化将信号探针Ap2-Ru结合到电极表面。
2. 根据权利要求1所述的检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,其特征在于,步骤1.1中, C_{60} 的质量浓度为0.2-2mg/mL,超声时间为20-30min。
3. 根据权利要求1所述的检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,其特征在于,步骤1.2中,壳聚糖的质量浓度为0.5%,醋酸溶液的体积浓度为0.1%。
4. 根据权利要求1所述的检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,其特征在于,步骤1.3中, C_{60} 水溶液与壳聚糖溶液混合时体积比为1:1,搅拌时间为40-60min。
5. 根据权利要求1所述的检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,其特征在于,步骤3.1中, C_{60} -Chit的质量浓度为0.1-1mg/mL。
6. 根据权利要求1所述的检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,其特征在于,步骤3.2中,GA溶液的质量浓度为5%,交联时间为3-4h。
7. 根据权利要求1所述的检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,其特征在于,步骤3.3中,Ap1的浓度为3-50 μ M,交联时间为12-15h。
8. 根据权利要求1所述的检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,其特征在于,步骤3.4中,BSA质量浓度为0.5%-1%,封闭时间为30-60min。
9. 一种检测MMP-14的电化学发生传感器,其特征在于,由权利要求1-8任一项所述的制备方法制得。

一种检测MMP-14的电化学发光生物传感器及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医疗器械领域,涉及一种检测MMP-14的电化学发光生物传感器及其制备方法。

背景技术

[0002] 截至目前,癌症仍然是世界范围内最严重的致死原因。尽管人们竭尽全力开发新的检测和治疗方法,但仍有90%的患者死于癌细胞扩散引起的全身性疾病。据报道,基质金属蛋白酶(MMPs)参与了多种癌细胞转移、侵袭过程,且有研究表明某一种MMP的高表达与特定癌症的发病率呈正相关,说明MMPs可能可以作为多种疾病的检测标志物及治疗靶点。因此,研发灵敏且精确的MMPs传感技术对于癌症的临床诊断及治疗具有重要意义。

[0003] 目前报道了很多基于MMPs催化结构域(CAT)中筛选的MMPs特异性多肽的水解断裂建立的荧光或电化学发光生物传感技术用于对MMP-9,MMP-2,MMP-3和MMP-7进行定量检测。但是,肽裂解片段与荧光分子或电活性分子结合段往往会产生非特异性吸附,从而产生假阳性信号。而且,这些传感器受检测原理限制往往是Signal OFF型,很可能由于固定不牢固导致信号分子脱落产生假信号,这些因素均会对传感器的检测灵敏度造成影响。所以,上述生物传感技术因缺乏特异性,在临床上难以应用于检测活性位点导向的MMPs。

发明内容

[0004] 为解决上述问题,本发明提供一种检测MMP-14的电化学发光生物传感器及其制备方法,能对MMP-14进行即时检测,特异性强。

[0005] 本发明是通过以下技术方案来实现:

[0006] 一种检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0007] 步骤1,制备基底材料 C_{60} -Chit

[0008] 步骤1.1,将 C_{60} 分散于超纯水中,超声后得到 C_{60} 水溶液;

[0009] 步骤1.2,将壳聚糖溶解于醋酸溶液中,搅拌后得到胶状壳聚糖溶液;

[0010] 步骤1.3,将 C_{60} 水溶液与壳聚糖溶液混合搅拌后得到基底材料 C_{60} -Chit;

[0011] 步骤2,配置MMP-14特异性识别探针

[0012] 步骤2.1,将多肽抑制剂溶解于Tris-HCl缓冲液中,得到MMP-14特异性识别的探针溶液,其中,多肽抑制剂的氨基酸序列为:GYPKSALR-Ahx-(EG)₃-Cys(Ap1);

[0013] 步骤3,电化学发光生物传感器的组装

[0014] 步骤3.1,将 C_{60} -Chit滴加到玻碳电极表面待其自然晾干,得到 C_{60} -Chit/GCE电极;

[0015] 步骤3.2,将GA滴加到 C_{60} -Chit/GCE电极表面进行交联,然后用Tris-HCl缓冲溶液冲洗,得到GA/ C_{60} -Chit/GCE电极;

[0016] 步骤3.3,将Ap1滴加到GA/ C_{60} -Chit/GCE电极表面进行交联,然后用Tris-HCl缓冲溶液冲洗,得到Ap1/GA/ C_{60} -Chit/GCE电极;

[0017] 步骤3.4,将BSA滴加到Ap1/GA/ C_{60} -Chit/GCE电极表面进行封闭,封闭后用Tris-

HCl缓冲溶液冲洗电极表面,即得到检测MMP-14的电化学发光生物传感器。

[0018] 优选的,步骤1.1中, C_{60} 的浓度为0.2-2mg/mL,超声时间为20-30min。

[0019] 优选的,步骤1.2中,壳聚糖溶液的质量浓度为0.5%,醋酸溶液的体积浓度为0.1%。

[0020] 优选的,步骤1.3中, C_{60} 水溶液与壳聚糖溶液混合时体积比为1:1,搅拌时间为40-60min。

[0021] 优选的,步骤3.1中的玻碳电极在滴加 C_{60} -Chit之前,进行以下处理:将玻碳电极抛光,清洗。

[0022] 进一步的,玻碳电极抛光具体是在抛光布上用三氧化二铝抛光。

[0023] 进一步的,清洗是分别在乙醇和去离子水中超声清洗2-5min。

[0024] 优选的,步骤3.1中, C_{60} -Chit质量浓度为0.1-1mg/mL。

[0025] 优选的,步骤3.2中,GA溶液质量浓度为5%,交联时间为3-4h。

[0026] 优选的,步骤3.3中,Ap1浓度为3-15 μ M,交联时间为12-15h。

[0027] 优选的,步骤3.4中,牛血清蛋白溶液质量浓度为0.5%-1%,封闭时间为30-60min。

[0028] 采用上述制备方法制备得到的检测MMP-14的电化学发光生物传感器。

[0029] 与现有技术相比,本发明具有以下有益的技术效果:

[0030] 所有MMPs的PEX结构域均呈高度保守的圆盘形状,其中的肽链相互折叠成具有伪四重对称性的 β -螺旋桨状。不同MMP的PEX结构域中,第四外链(S4)的每个叶片明显不同,这说明了每个叶片介导的外链与其它特异性蛋白相关。MMP-14的PEX结构域(PEX-14)中叶片I和叶片IV最外部的肽链凸起,这是其它MMPs所不具备的特征。MMP-14可以通过叶片IV发生同源二聚化,也可以通过叶片I与CD44发生异源二聚化,进一步的研究发现,合成的多肽抑制剂Ap1和Ap2可以分别干扰MMP-14的同源二聚化和与CD44的异源二聚化。这说明多肽抑制剂Ap1和Ap2分别可以和PEX-14结构域中的叶片IV和叶片I发生二聚。本发明利用PEX结构域筛选出来的两条多肽抑制剂(Ap1和Ap2)作为分子识别物质,实现对MMP-14的定量检测。戊二醛(GA)可通过与壳聚糖的氨基交联固定到玻碳电极表面,然后与Ap1端头的氨基再次交联将Ap1键合到玻碳电极表面,用牛血清蛋白(BSA)封闭后,可以减少电极表面的非特异性吸附。Ap2端头的氨基可以与双(联吡啶)-4'-甲基-4-羰基吡啶钌-N-琥珀酰亚胺酯双六氟磷酸酯(Ru)进行酰胺化反应合成信号探针Ap2-Ru。当MMP-14通过与Ap1同源二聚化结合到电极表面时可以通过与Ap2异源二聚化将信号探针Ap2-Ru结合到电极表面,随着MMP-14浓度增大,结合到电极表面的Ap2-Ru浓度增大,电化学发光信号增强,基于此实现对MMP-14高选择性和高灵敏度检测。电化学传感器检测MMP-14的原理图如图1所示。本发明的优点在于:(1)灵敏度高,本发明利用的电化学发光技术作为信号输出方式,该技术本身具有极高的灵敏度,本发明中的电化学发光生物传感器可定量检测8.1pg/L MMP-14;(2)选择性高,利用MMP-14与多肽抑制剂(Ap1)发生同源二聚化,再与多肽抑制剂(Ap2)发生异源二聚化使电化学发光生物传感器界面上的电化学发光值增大的原理来检测MMP-14,常见的干扰蛋白:MMP-2、MMP-7、Thrombin、BSA对检测均无干扰;(3)Ru(bpy)₃²⁺体系具有良好的稳定性、较高的ECL量子产率和生物相容性,将Ru(bpy)₃²⁺固定在电极表面,不仅可以减少昂贵试剂的使用量,而且还增强了ECL信号强度和简化了实验过程;(4)成本低廉,所需试剂量少。

[0031] 本发明得到的检测MMP-14的电化学发光生物传感器,当传感器与MMP-14相互作用后,MMP-14因与Ap1发生同源二聚而结合到电极表面后可以通过与Ap2异源二聚化将信号探针Ap2-Ru结合到电极表面,随着MMP-14浓度增大,结合到电极表面的Ap2-Ru浓度增大,电化学发光信号增强,基于此实现对MMP-14高选择性和高灵敏度检测。由于本发明传感器同时利用了MMP-14与Ap1及Ap2的特异性反应,检测结果更准确。

附图说明

[0032] 图1为本发明检测MMP-14的电化学发光生物传感器用于检测MMP-14的原理图。

[0033] 图2为不同浓度MMP-14对应的电化学发光图谱。

[0034] 图3为电化学发光值与MMP-14浓度的线性关系图。

[0035] 图4为电化学发光生物传感器检测MMP-14的选择性结果图。

[0036] 图5为电化学发光生物传感器检测MMP-14的稳定性结果图。

具体实施方式

[0037] 下面将结合附图和实施方式对本发明作进一步说明。

[0038] 一种检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,具体制备步骤如下:

[0039] (1) 富勒烯-壳聚糖(C_{60} -Chit)的制备

[0040] 先配置0.2-2mg/mL的 C_{60} 溶液,超声20-30min,保证 C_{60} 均匀分散到溶液中,再配置质量浓度为0.5%的壳聚糖溶液。将两种溶液等体积混合后搅拌40-60min,确保 C_{60} 均匀分散在壳聚糖溶液中,即得到 C_{60} -Chit。

[0041] (2) MMP-14蛋白特异性识别探针的制备

[0042] 将多肽抑制剂Ap1溶解于Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,Ap1浓度为3-50 μ M。

[0043] (3) 电化学发光传感器的组装

[0044] a. 将直径为3mm的玻璃碳电极依次用1.0 μ M、0.3 μ M、0.05 μ M的三氧化二铝粉末抛光处理,然后再依次用乙醇和去离子水超声清洗干净后滴加质量浓度为0.1-1mg/mL的 C_{60} -Chit 6 μ L,待其自然晾干后得到 C_{60} -Chit/GCE。

[0045] b. 将质量浓度为5%的GA滴加6 μ L到上述制备成功的 C_{60} -Chit/GCE表面,交联3-4h,然后用Tris-HCl (pH 8.0) 冲洗除去吸附的物质,得到GA/ C_{60} -Chit/GCE。

[0046] c. 将3-50 μ M的Ap1滴加6 μ L到GA/ C_{60} -Chit/GCE电极表面交联12-15h,然后用Tris-HCl (pH 8.0) 冲洗除去吸附的物质,得到Ap1/GA/ C_{60} -Chit/GCE电极;

[0047] d. 将质量浓度为0.5-1%的BSA滴加6 μ L到Ap1/GA/ C_{60} -Chit/GCE电极表面进行封闭,封闭后用Tris-HCl缓冲溶液冲洗去吸附的物质,即得到可检测肿瘤标志物(MMP-14)的电化学发光生物传感器。

[0048] 上述检测MMP-14的电化学发光生物传感器的使用方法,具体包括以下步骤:

[0049] (1) 以上述制备得到的检测MMP-14的电化学发光生物传感器为工作电极,Ag/AgCl电极(饱和KCl)为参比电极,铂丝电极为对电极,构建三电极系统;

[0050] (2) 将多肽抑制剂Ap2与钌配合物Ru混合,避光搅拌合成信号探针Ap2-Ru,Ap2浓度为20 μ M,Ap2与Ru的摩尔比为1:3.3。

[0051] (3) 在工作电极表面滴加已知MMP-14浓度的Tris-HCl缓冲溶液 (pH=8.0),40-

50min后,用缓冲溶液冲洗除去吸附的物质,将工作电极浸入Ap2-Ru溶液中,40-50min后,用缓冲溶液冲洗除去吸附的物质,在电化学发光测试液中,测试得到该MMP-14浓度对应的电化学发光强度,重复该步骤得到多组不同MMP-14浓度对应的电化学发光强度数据;MMP-14蛋白浓度范围为0.05ng/L-7ng/L,且按照MMP-14浓度由小到大的顺序进行测试。采用的电化学方法:循环伏安法;扫描范围:0.2V-1.35V;扫描速率:0.1V/s;

[0052] (4) 根据步骤(3)得到的多组不同MMP-14蛋白浓度对应的电化学发光强度数据,模拟得到MMP-14浓度与电化学发光强度之间的拟合曲线;

[0053] (5) 在工作电极表面滴加已知MMP-14浓度的Tris-HCl缓冲溶液(pH=8.0),40-50min后,用缓冲溶液冲洗除去吸附的物质,将工作电极浸入Ap2-Ru溶液中,40-50min后,用缓冲溶液冲洗除去吸附的物质,在电化学发光测试液中,测试发光强度;根据电化学发光强度及拟合曲线计算得到待测样品中MMP-14的浓度。

[0054] 所述的电化学发光测试液为含20mM三丙胺(TPA)的Tris-HCl缓冲溶液(pH=8.0)。

[0055] 本发明采用所述电化学发光生物传感器可以检测肿瘤标志物,测试时步骤简单,电化学发光生物传感器组装好以后,与待测肿瘤标志物MMP-14溶液结合40-50min后,再与Ap2-Ru溶液结合40-50min后就可以进行检测,有利于实现在普通人群中即时筛查癌症患者。

[0056] 制备实施例如下。

[0057] 具体实施例1

[0058] 一种检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,具体制备步骤如下:

[0059] (1) 富勒烯-壳聚糖(C₆₀-Chit)的制备

[0060] 先配置0.2mg/mL的C₆₀溶液,超声20min,保证C₆₀均匀分散到溶液中,再配置质量浓度为0.5%的壳聚糖溶液。将两种溶液等体积混合后搅拌40min,确保C₆₀均匀分散在壳聚糖溶液中,即得到C₆₀-Chit。

[0061] (2) MMP-14特异性识别信号探针的制备

[0062] 将多肽抑制剂Ap1溶解于Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液中,Ap1浓度为3μM。

[0063] (3) 电化学发光传感器的组装

[0064] a. 将直径为3mm的玻璃碳电极依次用1.0μM、0.3μM、0.05μM的三氧化二铝粉末抛光处理,然后再依次用乙醇和去离子水超声清洗干净后滴加质量浓度为0.1mg/mL的C₆₀-Chit 6μL,待其自然晾干后得到C₆₀-Chit/GCE。

[0065] b. 将质量浓度为5%的GA滴加6μL到上述制备成功的C₆₀-Chit/GCE表面,交联3h,然后用Tris-HCl(pH 8.0)冲洗除去吸附的物质,得到GA/C₆₀-Chit/GCE。

[0066] c. 将3μM的Ap1滴加6μL到GA/C₆₀-Chit/GCE电极表面交联12h,然后用Tris-HCl(pH 8.0)冲洗除去吸附的物质,得到Ap1/GA/C₆₀-Chit/GCE电极;

[0067] d. 将质量浓度为0.5%的BSA滴加6μL到Ap1/GA/C₆₀-Chit/GCE电极表面进行封闭,封闭后用Tris-HCl缓冲溶液冲洗去吸附的物质,即得到可检测肿瘤标志物(MMP-14)的电化学发光生物传感器。

[0068] 具体实施例2

[0069] 一种检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,具体制备步骤如下:

[0070] (1) 富勒烯-壳聚糖(C₆₀-Chit)的制备

[0071] 先配置1mg/mL的C₆₀溶液,超声25min,保证C₆₀均匀分散到溶液中,再配置质量浓度为0.5%的壳聚糖溶液。将两种溶液等体积混合后搅拌45min,确保C₆₀均匀分散在壳聚糖溶液中,即得到C₆₀-Chit。

[0072] (2) MMP-14特异性识别信号探针的制备

[0073] 将多肽抑制剂Ap1溶解于Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,Ap1浓度为9μM。

[0074] (3) 电化学发光传感器的组装

[0075] a.将直径为3mm的玻碳电极依次用1.0μM、0.3μM、0.05μM的三氧化二铝粉末抛光处理,然后再依次用乙醇和去离子水超声清洗干净后滴加质量浓度为0.5mg/mL的C₆₀-Chit 6μL,待其自然晾干后得到C₆₀-Chit/GCE。

[0076] b.将质量浓度为5%的GA滴加6μL到上述制备成功的C₆₀-Chit/GCE表面,交联3.2h,然后用Tris-HCl (pH 8.0) 冲洗除去吸附的物质,得到GA/C₆₀-Chit/GCE。

[0077] c.将9μM的Ap1滴加6μL到GA/C₆₀-Chit/GCE电极表面交联13h,然后用Tris-HCl (pH 8.0) 冲洗除去吸附的物质,得到Ap1/GA/C₆₀-Chit/GCE电极;

[0078] d.将质量浓度为0.75%的BSA滴加6μL到Ap1/GA/C₆₀-Chit/GCE电极表面进行封闭,封闭后用Tris-HCl缓冲溶液冲洗去吸附的物质,即得到可检测肿瘤标志物(MMP-14)的电化学发光生物传感器。

[0079] 具体实施例3

[0080] 一种检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,具体制备步骤如下:

[0081] (1) 富勒烯-壳聚糖(C₆₀-Chit)的制备

[0082] 先配置1.5mg/mL的C₆₀溶液,超声30min,保证C₆₀均匀分散到溶液中,再配置质量浓度为0.5%的壳聚糖溶液。将两种溶液等体积混合后搅拌50min,确保C₆₀均匀分散在壳聚糖溶液中,即得到C₆₀-Chit。

[0083] (2) MMP-14特异性识别信号探针的制备

[0084] 将多肽抑制剂Ap1溶解于Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,Ap1浓度为25μM。

[0085] (3) 电化学发光传感器的组装

[0086] a.将直径为3mm的玻碳电极依次用1.0μM、0.3μM、0.05μM的三氧化二铝粉末抛光处理,然后再依次用乙醇和去离子水超声清洗干净后滴加质量浓度为0.75mg/mL的C₆₀-Chit 6μL,待其自然晾干后得到C₆₀-Chit/GCE。

[0087] b.将质量浓度为5%的GA滴加6μL到上述制备成功的C₆₀-Chit/GCE表面,交联3.5h,然后用Tris-HCl (pH 8.0) 冲洗除去吸附的物质,得到GA/C₆₀-Chit/GCE。

[0088] c.将25μM的Ap1滴加6μL到GA/C₆₀-Chit/GCE电极表面交联14h,然后用Tris-HCl (pH 8.0) 冲洗除去吸附的物质,得到Ap1/GA/C₆₀-Chit/GCE电极;

[0089] d.将质量浓度为1%的BSA滴加6μL到Ap1/GA/C₆₀-Chit/GCE电极表面进行封闭,封闭后用Tris-HCl缓冲溶液冲洗去吸附的物质,即得到可检测肿瘤标志物(MMP-14)的电化学发光生物传感器。

[0090] 具体实施例4

[0091] 一种检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,具体制备步骤如下:

[0092] (1) 富勒烯-壳聚糖(C₆₀-Chit)的制备

[0093] 先配置2mg/mL的C₆₀溶液,超声30min,保证C₆₀均匀分散到溶液中,再配置质量浓度

为0.5%的壳聚糖溶液。将两种溶液等体积混合后搅拌60min,确保 C_{60} 均匀分散在壳聚糖溶液中,即得到 C_{60} -Chit。

[0094] (2) MMP-14特异性识别信号探针的制备

[0095] 将多肽抑制剂Ap1溶解于Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,Ap1浓度为50 μ M。

[0096] (3) 电化学发光传感器的组装

[0097] a. 将直径为3mm的玻碳电极依次用1.0 μ M、0.3 μ M、0.05 μ M的三氧化二铝粉末抛光处理,然后再依次用乙醇和去离子水超声清洗干净后滴加质量浓度为1mg/mL的 C_{60} -Chit 6 μ L,待其自然晾干后得到 C_{60} -Chit/GCE。

[0098] b. 将质量浓度为5%的GA滴加6 μ L到上述制备成功的 C_{60} -Chit/GCE表面,交联4h,然后用Tris-HCl (pH 8.0) 冲洗除去吸附的物质,得到GA/ C_{60} -Chit/GCE。

[0099] c. 将50 μ M的Ap1滴加6 μ L到GA/ C_{60} -Chit/GCE电极表面交联15h,然后用Tris-HCl (pH 8.0) 冲洗除去吸附的物质,得到Ap1/GA/ C_{60} -Chit/GCE电极;

[0100] d. 将质量浓度为0.75%的BSA滴加6 μ L到Ap1/GA/ C_{60} -Chit/GCE电极表面进行封闭,封闭后用Tris-HCl缓冲溶液冲洗去吸附的物质,即得到可检测肿瘤标志物(MMP-14)的电化学发光生物传感器。

[0101] 具体实施例5

[0102] 一种检测MMP-14的电化学发光生物传感器的制备方法,具体制备步骤如下:

[0103] (1) 富勒烯-壳聚糖(C_{60} -Chit)的制备

[0104] 先配置2mg/mL的 C_{60} 溶液,超声30min,保证 C_{60} 均匀分散到溶液中,再配置质量浓度为0.5%的壳聚糖溶液。将两种溶液等体积混合后搅拌60min,确保 C_{60} 均匀分散在壳聚糖溶液中,即得到 C_{60} -Chit。

[0105] (2) MMP-14特异性识别信号探针的制备

[0106] 将多肽抑制剂Ap1溶解于Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,Ap1浓度为15 μ M。

[0107] (3) 电化学发光传感器的组装

[0108] a. 将直径为3mm的玻碳电极依次用1.0 μ M、0.3 μ M、0.05 μ M的三氧化二铝粉末抛光处理,然后再依次用乙醇和去离子水超声清洗干净后滴加质量浓度为1mg/mL的 C_{60} -Chit 6 μ L,待其自然晾干后得到 C_{60} -Chit/GCE。

[0109] b. 将质量浓度为5%的GA滴加6 μ L到上述制备成功的 C_{60} -Chit/GCE表面,交联3.5h,然后用Tris-HCl (pH 8.0) 冲洗除去吸附的物质,得到GA/ C_{60} -Chit/GCE。

[0110] c. 将15 μ M的Ap1滴加6 μ L到GA/ C_{60} -Chit/GCE电极表面交联15h,然后用Tris-HCl (pH 8.0) 冲洗除去吸附的物质,得到Ap1/GA/ C_{60} -Chit/GCE电极;

[0111] d. 将质量浓度为1%的BSA滴加6 μ L到Ap1/GA/ C_{60} -Chit/GCE电极表面进行封闭,封闭后用Tris-HCl缓冲溶液冲洗去吸附的物质,即得到可检测肿瘤标志物(MMP-14)的电化学发光生物传感器。

[0112] 应用实例

[0113] 实例1 MMP-14蛋白检测:

[0114] 上述检测MMP-14的电化学发光生物传感器的使用方法,具体包括以下步骤:

[0115] (1) 以上述制备得到的检测MMP-14的电化学发光生物传感器为工作电极,Ag/AgCl电极(饱和KCl)为参比电极,铂丝电极为对电极,构建三电极系统;

[0116] (2) 将多肽抑制剂Ap2与钌配合物Ru混合,避光搅拌合成信号探针Ap2-Ru,Ap2浓度为20 μ M,Ap2与Ru的摩尔比为1:3.3。

[0117] (3) 在工作电极表面依次滴加浓度分别为0.05ng/L、0.07ng/L、0.1ng/L、0.3ng/L、0.5ng/L、0.7ng/L、1ng/L、3ng/L、5ng/L、7ng/L的MMP-14蛋白溶液(pH=8.0),40-50min后,用缓冲溶液冲洗除去吸附的物质,将工作电极浸入Ap2-Ru溶液中,40-50min后,用缓冲溶液冲洗除去吸附的物质,在电化学发光测试液中,测试不同浓度时的电化学发光强度I;

[0118] (4) 根据测试结果发现,电化学发光强度I在MMP-14蛋白浓度为0.05ng/L-7ng/L范围内呈线性关系 $I=736.74C+753.39$, $R^2=0.9909$ (不同浓度的MMP-14蛋白对应的电化学发光信号,如图3所示)。

[0119] (5) 在工作电极表面滴加已知MMP-14浓度的Tris-HCl缓冲溶液(pH=8.0),40-50min后,用缓冲溶液冲洗除去吸附的物质,将工作电极浸入Ap2-Ru溶液中,40-50min后,用缓冲溶液冲洗除去吸附的物质,在电化学发光测试液中,测试发光强度;根据电化学发光强度及拟合曲线得到待测样品中MMP-14的浓度,单位为ng/L。

[0120] 由该实例1可知,电化学发光值与MMP-14浓度在0.05ng/L-7ng/L浓度范围内呈线性关系,因此,根据检测限计算公式 $3\sigma/S$,经计算实施例1制备得到的检测MMP-14的电化学发光生物传感器检测MMP-14的检测限可达8.1pg/L,这说明本发明的电化学发光传感器的灵敏度很高。

[0121] 实例2选择性测试:

[0122] 以上述具体实施例1制备得到的检测MMP-14的电化学发光生物传感器为工作电极,实验条件与上述具体实施例1相同,检测0.7ng/L MMP-14以及35ng/L常见干扰蛋白:MMP-2、MMP-7、Thrombin、BSA,结果如图4所示。

[0123] 结果表明:除目标物MMP-14外,其余干扰蛋白与电化学发光生物传感器相互作用后,电化学发光值均很小。这说明50倍的常见的干扰蛋白不影响检测,本发明的生物传感器具有较好的选择性。这主要是因为生物传感器是通过MMP-14与多肽抑制剂(Ap1和Ap2)分别发生特异性反应,使电化学发光生物传感器界面上的电化学发光值增大的原理来检测MMP-14。

[0124] 实例3稳定性测试

[0125] 以上述制备实施例1制备得到的检测肿瘤标志物的电化学发光生物传感器为工作电极,实验条件与上述实例1相同,ECL生物传感器与0.7ng/L MMP-14相互作用后,在0.2V-1.35V电位范围内连续扫描16圈ECL响应信号,结果如图5所示。ECL生物传感器的ECL信号强度连续扫描16圈的相对标准偏差为2.7%。结果表明,本发明制备的ECL生物传感器具有良好的稳定性。

[0126] 基于多肽抑制剂与MMPs的血红素蛋白域(PEX)相互作用,本发明首次构建了一种新颖的电化学发光生物传感器用于特异性的定量检测MMP-14。首先将能够抑制MMP-14同源二聚化的多肽抑制剂(Ap1)通过戊二醛(GA)交联法组装在玻碳电极上,用牛血清蛋白(BSA)封闭后生物传感器组装完成。Ap1可以直接与MMP-14相互作用抑制MMP-14的同源二聚化,Ap2可以直接与MMP-14相互作用抑制MMP-14的异源二聚化,因此双特异性肽夹心生物传感器可以用于检测MMP-14。在检测MMP-14过程中,以Ru作为探针检测传感器界面上电化学发光值的变化。MMP-14浓度在0.05ng/L-7ng/L范围内与电化学发光值呈现良好的线性关系,

检出限为8.1pg/L。本发明通过研究多肽抑制剂与MMPs的血红素蛋白域(PEX)之间的相互作用,提出了一种新颖的方法用于评估MMPs介导的肿瘤扩散,并且为筛选MMPs的抑制剂提供了一个平台。

[0127] 上述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围,本发明的保护范围以权利要求书为准。

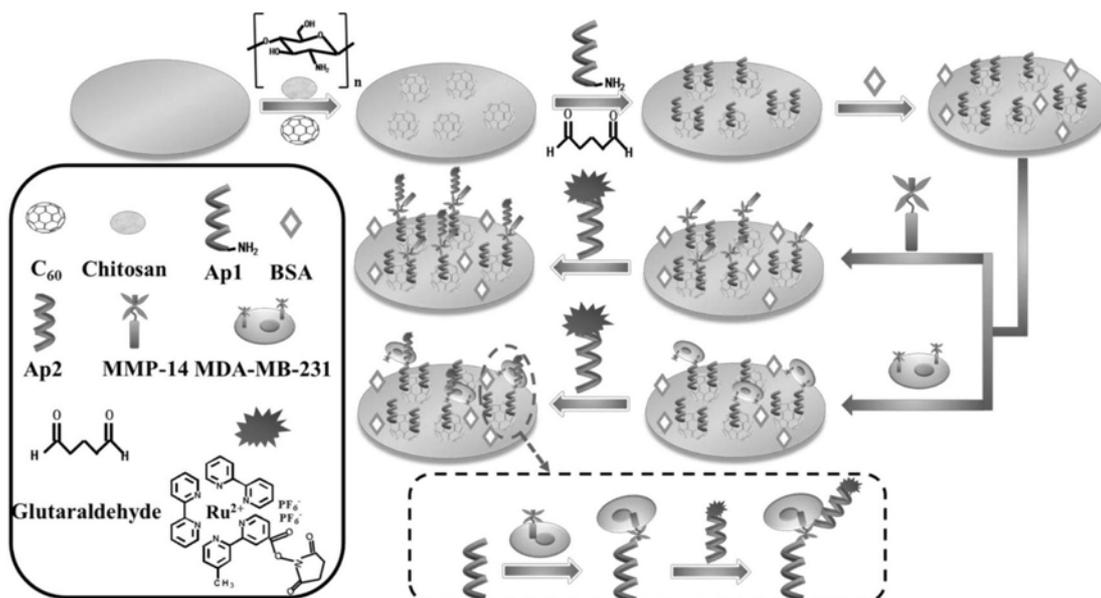


图1

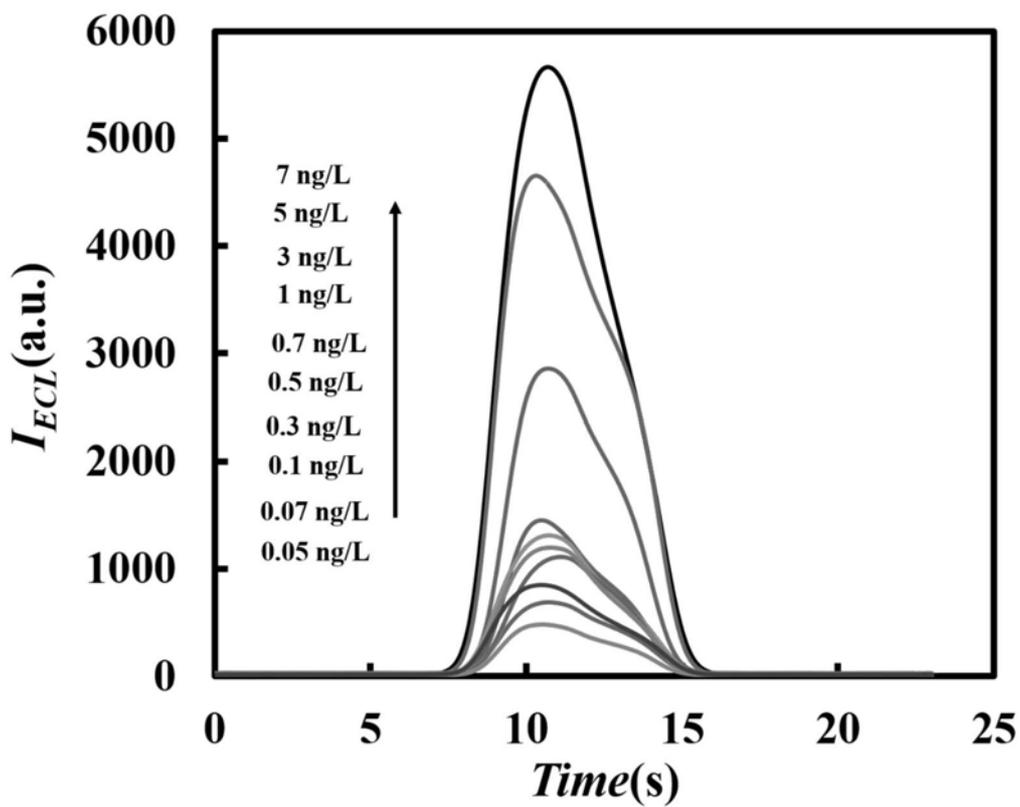


图2

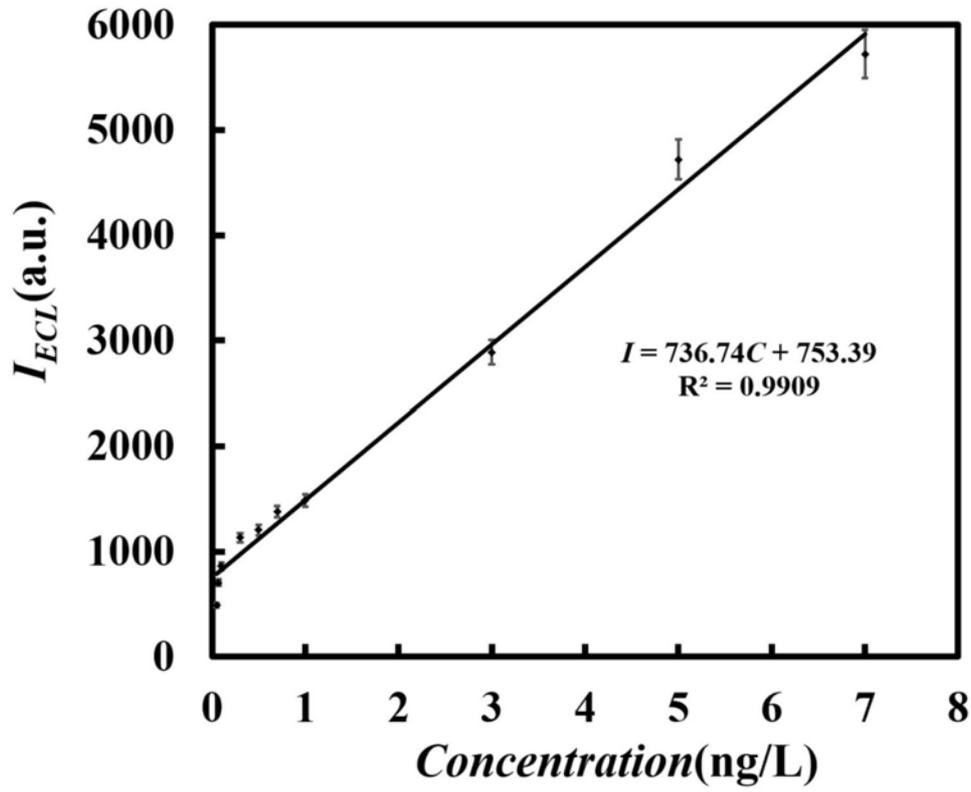


图3

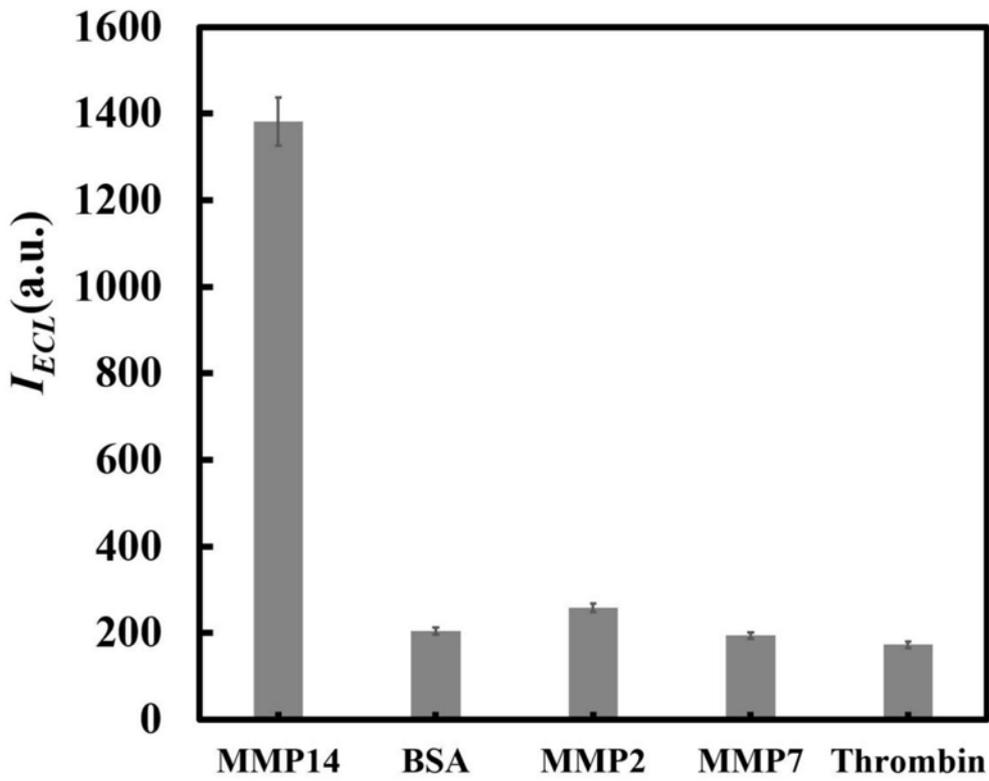


图4

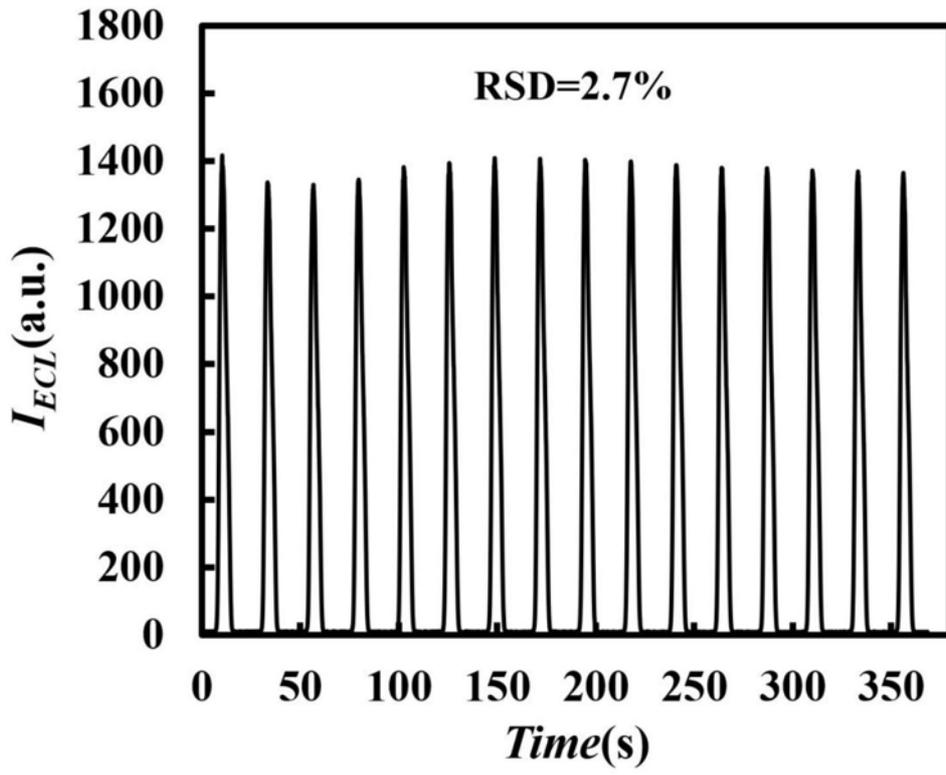


图5