

荧光各向异性法均相检测酸性、中性和碱性介质中的蛋白酶

田嘉嘉^a 陈爽^a 李东辉^{b*}

(厦门大学^a 生命科学学院; ^b 医学院抗癌研究中心 厦门 361005)

摘要 建立了一种基于荧光各向异性原理均相测定蛋白酶及其抑制剂的方法。具有如下特点:灵敏度高(可测到纳克级的蛋白酶);是一种均相检测方法,可对酶反应体系进行实时跟踪检测;作用底物是蛋白酶的天然底物—蛋白质;适用的 pH 值范围宽 (pH 2.0~10.0),可用于酸性、中性和碱性介质中蛋白酶的测定;所用荧光标记物 TMR IIC 的发射波长 (581 nm) 大于荧光素类 (520 nm),有利于减少散射光的干扰,提高了荧光各向异性测量的稳定性。还可应用于蛋白酶抑制剂的检测。

关键词 荧光各向异性, 罗丹明, 蛋白酶, 胰蛋白酶, 胃蛋白酶, 菠萝蛋白酶, 蛋白酶抑制剂

中图分类号: O657.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2006)12-1313-04

蛋白酶在理论研究和生产实践中具有广泛的应用前景^[1,2]。蛋白酶的常用测定方法有分光光度法^[3]、化学发光法^[4]、放射性测定法^[5]、凝胶电泳法^[6]以及酶联法^[7]。这些方法或者存在准确度、灵敏度较低、或者易产生放射性污染、或操作步骤繁琐、或成本高等缺点。荧光各向异性技术作为一种均相检测技术,在酶学检测中的应用已受到关注^[8]。它具有可均相(无须分离过程)实时测定,灵敏度较好,成本较低等优点。Hiroshis 等^[9]曾用异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的蛋白质作为底物测定了多种蛋白酶,灵敏度可到微克级。但由于 FITC 的发光行为对酸度变化敏感,只适于检测在中性或弱碱性介质中表现出活性的酶,而不适于检测在酸性介质中具有活性的酶。因此,本文以对酸度不敏感的荧光物质四甲基异硫氰酸罗丹明 (tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TMR IIC) 标记白蛋白作为蛋白酶的荧光底物,利用荧光各向异性原理,建立了测定蛋白水解酶的方法。该法拓宽了荧光各向异性技术在酶学分析中的应用范围,减少了散射光的干扰,提高了测定的稳定性。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Perkin Elmer LS-55 型荧光分光光度计 (1 cm 石英液槽), 超级恒温水浴, 摇床, 层析柱。

胰蛋白酶 (Trypsin), 239 u/mg, Worthington Corporation; 胃蛋白酶 (Pepsin), 纯度 > 85%, 活力 1 3 000, Amersco; 菠萝蛋白酶 (Bromelain), 48 u/mg, Sigma; 四甲基异硫氰酸罗丹明 (Tetramethylisocyanate Rhodamine, TMR IIC), Sigma; 牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA, 北京红星生物化学制品厂); 胰蛋白酶抑制剂 (Aprotinin), Amersco; 多酶片 (四川蜀中制药有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 TMR IIC-BSA 偶联物的制备 将 5 mL (5.0×10^{-3} g/mL) 的白蛋白溶液与 8.5 mL 生理盐水混合, 室温搅拌下缓慢加入 1.5 mL TMR IIC 溶液, 浓度为 0.10×10^{-3} g/mL, 继续搅拌 4~6 h, 过 Sephadex G25 柱 (以 PBS 缓冲液洗脱), 收集第 1 峰。

1.2.2 典型酶解与荧光各向异性的测定 实验用 TMR IIC-BSA 偶联物的浓度为 2.3×10^{-7} g/mL, 变化蛋白酶的浓度对底物 (TMR IIC-BSA 偶联物) 进行酶解。测定激发波长为 560 nm, 发射波长为 581 nm, 在酶反应 10 min 后测量荧光各向异性值。荧光各向异性的计算公式为^[10]:

2006-03-12 收稿, 2006-06-06 修回

国家自然科学基金资助项目 (20105005), 福建省自然科学基金项目 (F0210012), 厦门大学新世纪优秀人才支持计划项目

通讯联系人: 李东辉, 男, 博士, 教授; E-mail: lidh@xmu.edu.cn; 研究方向: 生物医学分子光谱学

$$r = (I - GI) / (I + 2GI)$$

式中, I 和 I' 分别为起偏器和检偏器方向相互平行和垂直时测得的荧光强度。 G 为仪器校正因子, 由仪器自动给出。

1.2.3 方法原理 四甲基异硫氰酸罗丹明 (TMR IIC) 是经典的荧光标记物, 分子中带的异硫氰酸基团容易与蛋白质上的伯氨基发生共价偶联反应, 而与蛋白质牢固结合。与蛋白质 (大分子) 结合后, 其分子运动受到限制而导致荧光各向异性明显增强。当偶联物中的蛋白质被酶催化降解成较小分子量的多肽片断后, TMR IIC 分子各向同性增强, 其荧光各向异性又变小。变小程度与加入的酶量相关, 据此可建立溶液中蛋白酶的直接 (均相) 测定法。如在体系中加入蛋白酶抑制剂, 则酶的活性受到抑制, 导致上述荧光各向异性变小的趋势减弱, 又可依此现象建立测定或研究蛋白酶抑制剂的方法。

2 结果与讨论

2.1 不同 pH 介质中 TMR IIC 的荧光行为

图 1 为不同 pH 介质中 TMR IIC 的荧光强度变化, 在 pH 值为 2.0 ~ 9.0 范围基本保持恒定且具有较强的荧光发射。因此, 当以 TMR IIC 为标记物用于荧光各向异性测定时, 所适用的酸度范围将比经典的荧光标记物——异硫氰酸荧光素 (FITC) 更宽。而且 TMR IIC 的荧光发射波长更长, 其荧光各向异性测定更稳定。

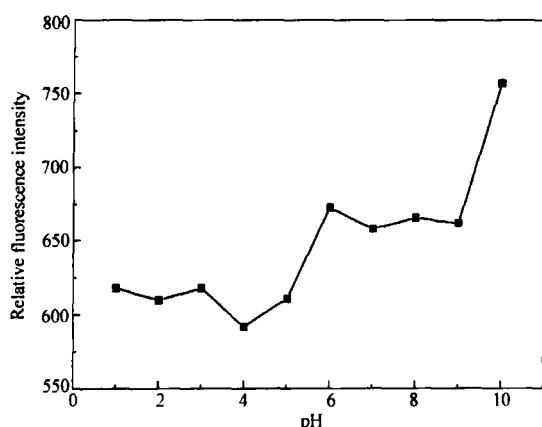


图 1 TMR IIC 的荧光随 pH 变化曲线
Fig. 1 Effect of pH on the fluorescence intensity of TMR IIC

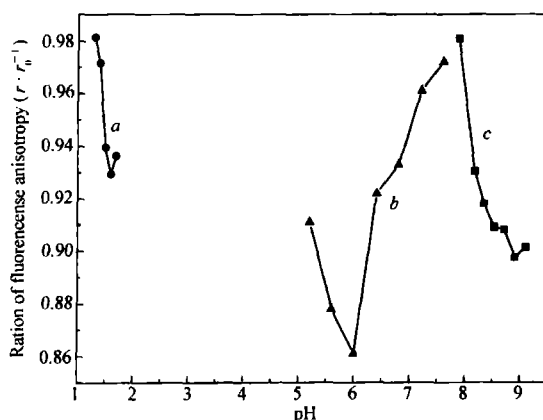


图 2 胰蛋白酶、胃蛋白酶、菠萝蛋白酶降解 TMR IIC-BSA 的缓冲体系选择

Fig. 2 Digestions of TMR IIC-BSA with Trypsin, Pepsin and Bromelain in different buffer systems

a. KCl-HCl, pH: 1.3 ~ 1.7;

b. 柠檬酸-磷酸氢二钠, pH: 5.2 ~ 7.6;

c. Tris-HCl, pH: 7.8 ~ 9.0

2.2 蛋白酶降解 TMR IIC-BSA 偶联物的反应条件

未加入酶时, TMR IIC-BSA 偶联物存在最大荧光各向异性 (r_0)。加入酶后, 体系的荧光各向异性减小 (r)。以荧光各向异性的比值 r/r_0 为指标考察了各反应参数对其值的影响, 优化了反应条件。

按经典的蛋白酶水解法^[11], 考察了 3 种缓冲体系对蛋白酶降解 TMR IIC-BSA 的影响。结果表明, KCl-HCl (pH = 1.6)、柠檬酸-磷酸氢二钠 (pH = 6.0)、Tris-HCl (pH = 8.9) 分别是胃蛋白酶、菠萝蛋白酶和胰蛋白酶的最佳酶解介质 (图 2)。

分别在上述最适 pH 缓冲体系中对蛋白酶的温度效应进行了考察 (图 3)。结果表明, 最适酶解温度: 胰蛋白酶为 37, 胃蛋白酶为 40, 菠萝蛋白酶为 55。

2.3 蛋白酶抑制剂的检测

蛋白酶抑制剂是抑制蛋白酶活性的物质。利用荧光各向异性法同样可检测蛋白酶抑制剂。在蛋白

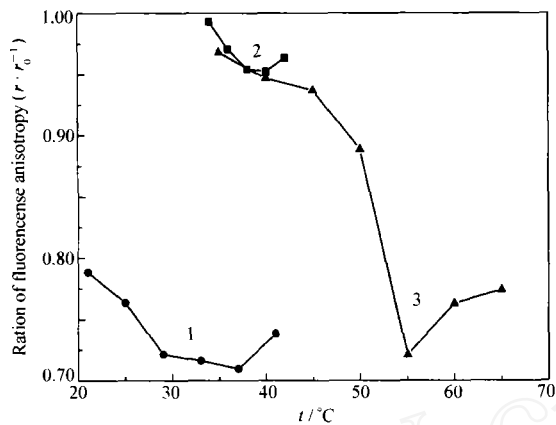


图 3 胰蛋白酶、胃蛋白酶、菠萝蛋白酶在不同温度条件下降解 TMRITC-BSA

Fig. 3 Digestions of TMRITC-BSA with Trypsin, Pepsin, Bromelain at various temperatures
1. Trypsin; 2. Pepsin; 3. Bromelain

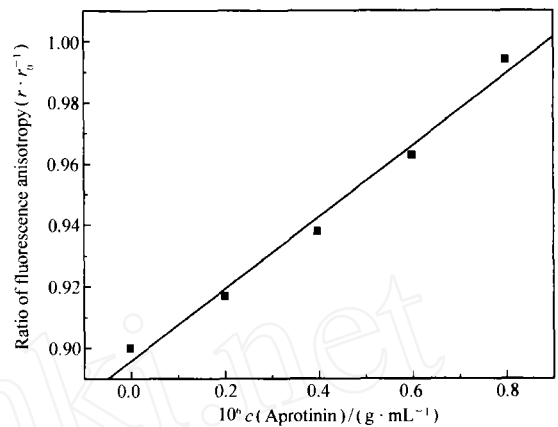


图 4 抑肽酶测定的工作曲线

Fig. 4 Calibration curve of aprotinin

酶抑制剂存在下,蛋白酶的活性受到抑制,体系的荧光各向异性表现出与上述情形相反的现象。荧光各向异性的比值与抑制剂的浓度呈正相关。据此,建立了胰蛋白酶抑制剂抑肽酶(Aprotinin)的检测方法。图 4 为测定抑肽酶的工作曲线。

2.4 分析参数与样品分析

3 种蛋白酶的分析参数列于表 1。表中结果说明,荧光各向异性技术测定蛋白酶及其抑制剂具有较好的灵敏度和线性响应区间。

表 1 不同蛋白酶标准物测定结果

Table 1 Analytical results for different protease standards

	Regression equation	r	10^6 Limit of detection / (g · mL ⁻¹)	10^6 Linear range (g · mL ⁻¹)
Trypsin	$Y = 0.9644 - 0.1164X$	0.9952	0.0054	0.033 ~ 3.00
Pepsin	$Y = 1.0016 - 0.1117X$	0.9971	0.026	0.050 ~ 3.00
Bromelain	$Y = 0.9988 - 0.0420X$	0.9955	0.015	0.050 ~ 3.00

多酶片中含有胰蛋白酶和胃蛋白酶,本文对其中的含量进行了测定。多酶片经去糖衣,溶解,离心后,取上清液,按实验方法进行测定(见表 2)。

表 2 样品分析 多酶片中蛋白酶的测定

Table 2 Analytical results of protease in multienzyme tablets

Content of protease / %	RSD / %	10^6 Addition / (g · mL ⁻¹)	10^6 Determination / (g · mL ⁻¹)	Recovery / % (n = 7)
Trypsin	18.93	2.43	1.70	90.00
Pepsin	10.68	3.35	1.70	107.60

以上结果表明,用罗丹明为荧光标记物的蛋白水解酶荧光测定法具有灵敏度高(可对纳克级蛋白酶做出响应)、线性范围较宽;适用的 pH 范围宽;可均相检测;标记技术简便,底物稳定性好等优点。可能是适合多种蛋白酶及其抑制剂的分析方法。

参 考 文 献

- 1 Rozhin J, Gomez A P, Ziegler G H, et al. *Cancer Res*[J], 1990, **50**: 62
- 2 Maeda H, Yamamoto T. *Biol Chem Hoppe Seyler*[J], 1996, **377**(4): 217
- 3 Lunen B O, Tappel A L. *Anal Biochem* [J], 1970, **36**: 22
- 4 Edwards R, Townshend A. *Stoddart Anal*[J], 1995, **120**: 117

- 5 Robertson B D, Kwan-Lin G E, Maizels R M. *Anal Biochem* [J], 1988, **172** (1): 284
- 6 Brown T L, Yet M G, Wold F. *Anal Biochem* [J], 1982, **122**: 164
- 7 Gutierrez O A, Salas E H, Yanko L, *et al* *Anal Biochem* [J], 2002, **307** (1): 18
- 8 Joseph R L. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Second Edition) [M]. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999
- 9 Hiroshi M. *Anal Biochem* [J], 1979, **92**: 222
- 10 CHEN Guo-Zhen (陈国珍), HUANG Xian-Zhi (黄贤智), XU Jin-Gou (许金钩), *et al* *Fluorescence Analytical Method* (荧光分析法) [M], 2nd Edn (第 2 版). Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1990
- 11 Stelmach (著). QIAN Jia-Yuan (钱嘉渊) Trans (译). *Enzymes Assay Methods* (酶的测定方法) [M]. Beijing (北京): China Light Industry Press (中国轻工业出版社), 1992

Homogeneous Determination of Protease in Acidic, Neutral and Alkaline Media by Fluorescence Anisotropy

TAN Jia-Jia^a, CHEN Shuang^a, LI Dong-Hui^{b*}

(^a School of Life Sciences, ^b Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract This paper reports the application of fluorescence anisotropy technique to the assay of proteases via a protein substrate labeled with tetramethyl isothiocyanate rhodmine (TMR-ITC). The linear ranges for the assay of pepsin, bromelain and trypsin are $5.0 \times 10^{-8} \sim 3.0 \times 10^{-6}$, $5.0 \times 10^{-8} \sim 3.0 \times 10^{-6}$, and $3.3 \times 10^{-6} \sim 3.0 \times 10^{-6}$ g/mL, respectively. The detection limits of the three proteases mentioned above are 26.1×10^{-9} , 14.7×10^{-9} , 5.4×10^{-8} g/mL, respectively. The method is suitable for the real-time quantitative and homogeneous determination of a variety of proteases, because the fluorescence behavior of TMR-ITC is hardly affected in a wide range of pH. The substrate can be prepared easily and is stable under conventional conditions. On the other hand, the emission-wavelength of TMR-ITC is longer than that of fluorescein isothiocyanate (FITC), a conventional fluorescence probe for tagging proteins, thus it improves the detection of fluorescence anisotropy. In addition, this method is suitable for the determination of protease inhibitors, such as aprotinin, an inhibitor of trypsin.

Keywords fluorescence anisotropy, protease, rhodamine, trypsin, pepsin, bromelain, aprotinin