

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01781

以四磺基铝酞菁-牛血清白蛋白为底物的 荧光恢复均相法测定胃蛋白酶

陶云^{1,2} 黄萍² 邓雅斌² 李东辉^{* 2}(厦门大学生命科学学院¹, 厦门大学医学院抗癌研究中心², 厦门 361005)

摘要 酸性介质中, 红区荧光探针四磺基铝酞菁(AlS_4Pc)的荧光被白蛋白显著猝灭, 加入胃蛋白酶后, 体系荧光明显回复。基于此现象, 建立了荧光恢复均相测定胃蛋白酶的新方法。考察了各种影响因素, 在最佳实验条件(pH 2.5、反应温度 50 °C、反应时间 1 h)下, 本方法的线性范围为 0.04 ~ 4 mg/L, 检出限为 20 μ g/L。用本方法测定实际样品中胃蛋白酶, 取得了满意的结果。

关键词 荧光探针; 酞菁; 胃蛋白酶; 荧光恢复; 红外区荧光

1 引言

胃蛋白酶(Pepsin)是一种消化性蛋白酶, 在酸性环境中具有较高活性^[1, 2], 其最适宜 pH 值为 1.5 ~ 3.0。胃蛋白酶原(Pepsinogen, PG)是胃蛋白酶的无活性的前体, 血液中 PG 含量可作为胃基底膜功能和病理改变的理想标志物^[3], 可应用于萎缩性胃炎和胃癌早期预防。胃蛋白酶的检测方法有: 酶联免疫吸附测定(ELISA)^[4, 5], 它采用抗原与抗体的特异反应将待测物与酶连接, 然后通过酶与底物产生颜色反应, 用于定量测定, 反应产物可用分光光度计或酶标仪测定, 测定灵敏度为 5 ~ 10 mg/L; 考马斯亮蓝染色法^[6, 7], 采用染料与蛋白结合在 595 nm 处光吸收的增加量得到与其结合的蛋白质量, 可检测出 1 mg/L 蛋白质; 火箭免疫电泳法(RIE)^[8]是将单向免疫扩散与电泳相结合的一项定量检测技术, 检测灵敏度可达 0.3 mg/L。

荧光探针在生物大分子检测中得到广泛应用^[9]。例如, 陈莉华等^[10]用 CdSe 量子点作标记物检测人胃液中的胃蛋白酶。四磺基铝酞菁(Aluminium tetrasulphonated phthalocyanine, AlS_4Pc)是一种红区荧光探针, 具有荧光性质稳定、量子产率高等特点。酸性介质中, AlS_4Pc 可与牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)结合, 荧光显著猝灭^[11, 12]。在酸性条件, 于 AlS_4Pc -BSA 体系中加入胃蛋白酶, 体系的荧光显著恢复。基于此现象, 本研究建立了胃蛋白酶荧光均相定量分析方法, 并对其机理进行了探讨。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LS-55 型荧光分光光度计(美国 PerkinElmer 公司); 电热恒温水浴锅(上海精密试验设备有限公司); CHN81801 pH 酸度计(美国奥立龙公司); 1 cm 石英比色皿; 精密天平(Germany Sartorius 公司); Acy-6000-U 超纯水机(重庆艾科浦超纯水机公司)。

四磺基铝酞菁的合成与纯化参考文献[13], 产物的紫外-可见吸收光谱、荧光光谱和红外光谱显示的特征谱带与文献[14]相符。牛血清白蛋白和胃蛋白酶均购自国药集团。其它试剂均为分析纯。所用水为高纯水。1.0 mmol/L AlS_4Pc 储备液; 5 g/L BSA 储备液 4 °C 保存备用。5 g/L Pepsin 溶液(现配)。缓冲液为 0.05 mol/L 的甘氨酸(Gly)-HCl 溶液(pH 2.5)。

2.2 实验方法

在试管中依次加入 5 mL 1.0 μ mol/L AlS_4Pc 0.5 mL 0.05 mol/L Gly-HCl 缓冲液(pH 2.5)及牛血清白蛋白(5 mg/L), 待混匀后加入不同浓度的胃蛋白酶, 混匀、加热、冷却, 测定体系荧光强度。荧光激

2010-03-10 收稿; 2010-06-07 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20015005)和福建省科技项目(No. 99H048)资助

* E-mail: lidh@xmu.edu.cn

发波长选择为 610 nm,发射扫描范围为 630 ~ 800 nm。激发和发射带宽均为 5 nm,测定温度为室温。根据胃蛋白酶加入量测定荧光恢复程度,绘制工作曲线。样品的测定条件与工作曲线测定条件相同。

3 结果与讨论

3.1 AlS_4Pc 的分子结构和光谱特性

AlS_4Pc 是一种具有类似卟啉结构的强荧光化合物(图 1),由于其外周的 4 个苯环上有强极性的磺酸基,因而在水中的溶解度较大,便于实际应用。 AlS_4Pc 的荧光发射峰位于 690 nm(图 1),其激发带有两个,一个位于紫外区,称 Soret 带,峰位置约 350 nm(图 1 未给出);另一个位于长波处,称 Q 带。如采用短波激发,将于 700 nm 处产生很强的二级散射,为避开此二级散射的干扰,激发波长选择在 610 nm。加入 BSA 后, AlS_4Pc 的荧光发生猝灭,但峰位置并未改变。而在上述溶液中继续加入胃蛋白酶后,体系

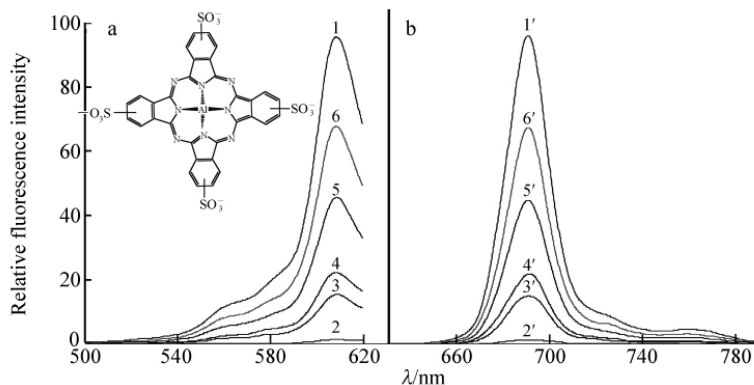


图 1 AlS_4Pc 的激发光谱 (a) 和发射光谱 (b) 及胃蛋白酶的加入对四磺基铝酞菁荧光光谱的影响

Fig. 1 Variations in excitation (a) and emission (b) spectra of aluminium tetrasulphonated phthalocyanine (AlS_4Pc) in absence and presence of pepsin

1, 1'. Buffer + AlS_4Pc ; 2, 2'. Buffer + AlS_4Pc + BSA; 3, 3'; 4, 4'; 5, 5'; 6, 6'. Buffer + AlS_4Pc + BSA + Pepsin (with concentrations of 0.05, 0.2, 0.5 and 1.0 mg/L, respectively). 1.0 μ mol/L AlS_4Pc , 0.05 mol/L Gly-HCl buffer (pH 2.5), 5 mg/L BSA. The excitation and emission wavelengths were set at 610 and 690 nm, respectively.

荧光显著恢复(图 1 曲线 3 ~ 6)。酸性介质中,BSA 上的氨基质子化而呈正电状态,与溶液中带负电的 AlS_4Pc 发生相互作用导致 AlS_4Pc 的聚集,进而发生减色效应(吸光值减小)与荧光猝灭现象^[15,16]。胃蛋白酶是一种酸性蛋白酶,BSA 是其合适底物,可在酸性条件下被胃蛋白酶水解成小片段多肽,从而将 BSA 上的 AlS_4Pc 释放出来,使反应体系荧光恢复。本方法正是根据此现象而建立的。 AlS_4Pc 的荧光发射波长位于红外区波段,在此区域能发出荧光的物质很少;其次,使用 AlS_4Pc 作为 AlS_4Pc 分子探针有利于避开试样背景荧光的干扰,提高测定的灵敏度和准确度。此外,由于采用长波激发(610 nm),光漂白作用小,有利于体系荧光的稳定。

3.2 实验条件的优化

3.2.1 缓冲溶液和 pH 值的选择 胃蛋白酶在酸性条件下活力较高。当体系 pH = 2.5 时,荧光恢复程度最大,可达到酶加入前体系荧光强度的 65 倍。提高体系 pH 值 (pH > 4),加入 BSA 后,不能使 AlS_4Pc 的荧光发生猝灭(图 2)。缓冲体系的性质对胃蛋白酶的催化活性有较大影响。比较 4 种缓冲溶液在相同 pH 值 (pH = 2.5) 下的胃蛋白酶催化活性(图 2) 结果表明,胃蛋白酶在 Gly-HCl 缓冲

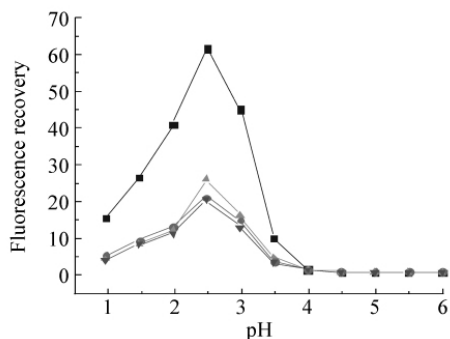


图 2 荧光恢复与缓冲溶液及 pH 值的关系

Fig. 2 Dependence of fluorescence recovery on different pH and different buffer system

1.0 μ mol/L AlS_4Pc , 5.0 mg/L BSA; Reaction temperature: 50 $^{\circ}C$. ■: Gly-HCl buffer; ●: KHP-HCl buffer; ▲: $Na_2HPO_4-H_3Cit$ buffer; ▼: $H_3Cit-NaOH-HCl$ buffer.

体系中催化活性最好。

3.2.2 温度的影响 考察了不同温度条件下胃蛋白酶活力的变化, 在 20 ~ 50 °C 范围内, 胃蛋白酶的活力随温度升高而增加。50 °C 时胃蛋白酶活力达到最大值; 温度超过 50 °C, 胃蛋白酶活力下降。本实验反应温度为 50 °C (图 3)。

3.2.3 反应时间的影响 AlS_4Pc 荧光强度随胃蛋白酶对 BSA 的水解反应时间的延长而逐渐升高, 约在 1 h 后体系的荧光强度达到最大值, 并趋于稳定(图 4)。

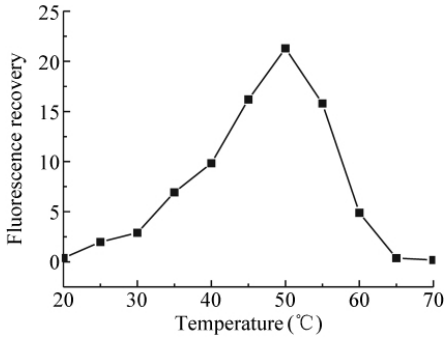


图 3 温度对四磺基铝酞菁荧光恢复的影响

Fig. 3 Effect of temperature on fluorescence recovery

1.0 $\mu\text{mol/L}$ AlS_4Pc , 5.0 mg/L BSA, 0.05 mol/L Gly-HCl (pH 2.5)

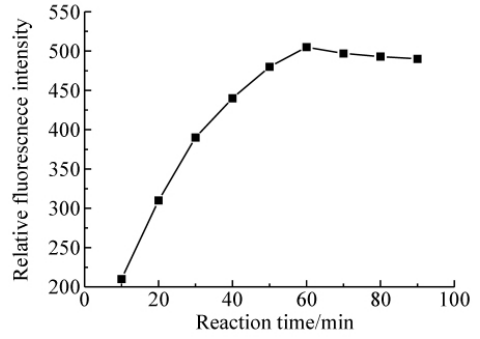


图 4 反应时间对四磺基铝酞菁相对荧光强度的影响

Fig. 4 Effect of reaction time on relative fluorescence intensity of AlS_4Pc

1.0 $\mu\text{mol/L}$ AlS_4Pc , 5.0 mg/L BSA, 0.05 mol/L Gly-HCl (pH 2.5); Reaction temperature: 50 °C。

3.3 干扰实验

对胃蛋白酶测定中常见的干扰物质进行了考察

(表 1)。取 1.0 mg/L 胃蛋白酶为考察浓度, 最大允许误差为 5%。实验表明, 氨基酸的干扰很小。人体内一些常见无机离子 (Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 和 DNA、RNA 等生物大分子对检测的干扰也较小, 此外维生素的最大耐受浓度可达 25 mg/L。

3.4 标准曲线

取 12 根试管, 分别加入 10 mL 1.0 $\mu\text{mol/L}$ AlS_4Pc (pH 2.5) 和 10.0 μL 5 g/L BSA, 再分别加入不同浓度的胃蛋白酶 (40 ~ 4000 $\mu\text{g/L}$), 反应 1 h 在室温下进行荧光测定。根据 AlS_4Pc 荧光的恢复程度绘制工作曲线。标准曲线的线性方程为 $F/F_0 = 12.462 + 0.229c$ (mg/L), 胃蛋白酶的线性范围为 0.040 ~ 4.0 mg/L, $r = 0.9996$, 检出限为 0.02 mg/L。

表 1 共存物质的干扰

Table 1 Test for tolerance of coexisting substances

共存物质 Coexisting substances	共存物质浓度 Coexisting conc. (mg/L)	相对误差 Relative error (%)	共存物质 Coexisting substances	共存物质浓度 Coexisting conc. (mg/L)	相对误差 Relative error (%)
Na^+ (Cl)	50	1.1	脯氨酸 Proline	100	3.0
K^+ (Cl)	50	3.5	赖氨酸 Lysine	100	4.8
Ca^{2+} (Cl)	50	3.0	色氨酸 Tryptophane	100	4.7
Mg^{2+} (Cl)	50	5.0	L-亮氨酸 L-Leucine	100	1.1
维生素 A Vitamin A	25	4.5	L-谷氨酰胺 L-Glutamine	100	5.0
维生素 B ₆ Vitamin B ₆	25	2.8	L-苏氨酸 L-Threonine	100	3.1
维生素 C Vitamin C	25	1.7	小牛胸腺 DNA Calf thymus DNA	20	2.2
维生素 D Vitamin D	25	3.5	Yeast ribonucleic acid (RNA)	20	3.2
球蛋白 Globulin (IgG)	10	3.5	溴铵盐 Cetrinonium Bromide	25	0.8

1.0 $\mu\text{mol/L}$ AlS_4Pc ; 5.0 g/L BSA; 1 mg/L Pepsin; 0.05 mol/L Gly-HCl buffer (pH 2.5); 50 °C。

3.5 样品分析

将本法应用于多酶片中胃蛋白酶含量的测定, 测量值与实际值符合良好。在样品中加入已知浓度的标准样品 (1.0 mg/L), 测量后计算回收率 (表 2), 结果令人满意。

表 2 多酶片样品分析

Table 2 Analytical results for multienzyme tablets samples

多酶片样品 Multienzyme sample	胃蛋白酶含量 Content of pepsin		相对误差 Relative error (%)	回收率 Recovery (%)
	实际含量 Actual content (mg/L)	测量值 Measurement value (mg/L, $n=6$)		
1	0.50	0.47	4.40	93.7 ~ 96.8
2	1.00	0.90	9.20	104.5 ~ 107.7
3	2.50	2.35	6.00	94.5 ~ 97.3

1.0 $\mu\text{mol/L}$ AlS_4Pc , 5.0 mg/L BSA 0.05 mol/L Gly-HCl (pH 2.5), 50 $^\circ\text{C}$.

References

- ZHENG Sui-Ping(郑穗平), GUO Yong(郭勇), PAN Li(潘力). *Enzymology(酶学)*. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2008: 9~14, 86~145
- Joseph S F. *The Quarterly Review of Biology*, 2002, 77(2): 127~147
- Yoshinori O, Yutaka K, Michiaki K, Keiichi T. *Am. J. Epidemiol.*, 2006, 163(7): 629~637
- Coan R, Allen A, Pearson J, Smith J. *Digestive Diseases and Sciences.*, 1994, 39(4): 893~895
- Stan R S, Kamal L E, Jun W, Milan S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 20(3): 549~555
- Lozzi I, Pucci A, Pantani O L, Calamai L. *Anal. Biochem.*, 2008, 376(1): 108~116
- Chun Y L, Chung S L. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(1): 111~113
- Axelsson C K, Axelsen N H, Szecsi P B, Foltmann B. *Clinica Chimica Acta.*, 1983, 129(3): 323~331
- YANG Dong-Zhi(杨冬芝), XU Shu-Kun(徐淑坤), CHEN Qi-Fan(陈启凡). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2007, 27(9): 1807~1810
- CHEN Li-Hua(陈莉华), BU Xiao-Ying(卜晓英), WEN Shi-Cai(文世才), LI Chao-Yang(李朝阳). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2007, 35(8): 1211~1214
- Mary S C F, Andrew B, Anthony W P, Steven M B. *J. Photochem. Photobiol B: Biol.*, 1997, 38(1): 10~17
- LIN Wei(林伟), PENG Yi-Ru(彭亦如), CHEN Kui-Zhi(陈奎治), WENG Jia-Bao(翁家宝), XU Guo-Xing(徐国兴). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2006, 34(3): 411~414
- Weber J, Busch J H. *Inorg. Chem.*, 1965, 4(4): 469~471
- Beeby A, MacRobert J, Simpson M S C. *J. Photochem. Photobiol B: Biol.*, 1991, 9(1): 87~95
- Tevetan G G, Rene Q, Johan E L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 366(1): 21~30
- FANG Ying(方莹), LI Dong-Hui(李东辉). *Journal of Xiamen University(厦门大学学报)*, 1997, 3: 408~412

A Novel Method for Determination of Pepsin Based on Fluorescence Recovery of Aluminium Tetrasulphonated Phthalocyanine-Bovine Serum Albumin Complex Used as Substrate

TAO Yun^{1,2}, HUANG Ping², DENG Ya-Bin², LI Dong-Hui^{*2}

(School of Life Science¹, Medical College Cancer Research Center², Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract It was found that the fluorescence of aluminium tetrasulphonated phthalocyanine(AlS_4Pc), a red-region fluorescence probe, was extremely quenched by bovine serum albumin(BSA) in acidic media, but recovered dramatically after the addition of pepsin. Based on this phenomenon, a new method was developed for homogeneous determination of pepsin. Under the optimal conditions(pH 2.5, reaction temperature 50 $^\circ\text{C}$ and reaction time of 1 h), the linear range of assay was 0.04 ~ 4 mg/L and the detection limit was 20 $\mu\text{g/L}$. The constructed method has been used to the analysis of pepsin tablet samples with satisfied results.

Keywords Fluorescence probe; Phthalocyanine; Pepsin; Fluorescence recovery; Red-region fluorescence

(Received 10 March 2010; accepted 7 June 2010)