

介质环境对辣根过氧化物酶催化荧光反应体系的影响

李庆阁* 赵一兵 许金钩 黄贤智 陈国珍

(厦门大学化学系 现代分析化学研究所 厦门 361005)

摘要 探讨了缓冲溶液、溶剂和表面活性剂对对羟基苯丙酸-过氧化氢-辣根过氧化物酶反应体系反应平衡及产物荧光性质的影响,表明二聚体荧光产物在溶液中存在酸碱平衡,用荧光滴定法求得其酸解常数 $pK_a \approx 8.3$. 碱式产物的荧光强于酸式. 碱性环境使酶活性降低,反应平衡时间延长. 阳离子胶束溴化十六烷基三甲铵 (CTMAB) 和氯化十六烷基三甲铵 (CTMAC) 对该体系兼有催化和增敏作用,据此提出一种更为灵敏的测定辣根过氧化物酶的方法.

关键词 介质环境, 辣根过氧化物酶, 对羟基苯丙酸, 催化荧光反应

辣根过氧化物酶 (HRP) 催化氧化荧光反应在环境检测和生化分析中占有重要地位,广泛应用于大气和海洋中 H_2O_2 的测定^[1],也是提高酶免疫分析灵敏度的荧光酶免疫分析的依据^[2]. 此外,活体细胞作用伴随产生的活性氧也常用该反应测定^[3],而且通过与能生成 H_2O_2 的各类反应尤其是氧化酶的催化氧化反应偶联可以间接测定大量的生物物质^[4].

目前已经发现并应用于实际测定的 HRP 催化氧化生荧物质已有数种,以对羟基苯丙酸 (HPPA) 为代表的对位取代酚类化合物因其灵敏稳定等优点应用最广,但是 pH 不匹配问题限制了该类物质的应用^[5]. 由于 HRP 在中性环境中活力最大,荧光产物在强碱中荧光最强,为获取最高灵敏度,常需反应和测定分别进行^[6].

为探求解决 pH 不匹配问题及进一步提高测定灵敏度的途径,详细研究了缓冲溶液、有机溶剂及表面活性剂对 HPPA- H_2O_2 -HRP 反应平衡和产物荧光性质的影响及规律,最后提出一种克服 pH 不匹配问题的方法及更灵敏地测定 HRP 的方式.

1 实验

1.1 仪器

Shimadzu RF-5000 荧光分光光度计.

1.2 试剂

HRP (EC 1.11.1.7, RZ=3.0, >250IU/mg) 购自北京华美生物工程公司. HPPA (保证试剂) 和对羟基苯乙酸 (HPAA) (保证试剂) 购自上海东京化成寄售部. 高香草酸 (HVA) (生化试剂) 系 Merck 产品. H_2O_2 (A.R. 30%) 系上海桃浦化工厂产品. 有机溶剂及试剂为市售分析纯,表面活性剂及 β -环糊精 (β -CD) 为市售化学纯. 实验用水为石英亚沸蒸馏的二次去离子水.

1993年8月5日收到. 修改稿于1993年12月20日收到.

1.3 实验方法

1.3.1 缓冲溶液的影响 于 1-cm 带塞石英液池中, 依次加入缓冲溶液 2.6mL, 0.725IU/mL HRP 50 μ L, 7.5mmol \cdot L⁻¹ HPPA 200 μ L, 0.03% H₂O₂ 100 μ L, 上下摇匀, 按选定的最大激发、发射波长 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) 记录荧光动力学曲线 ($F-t$), 并测定平衡后溶液的激发、发射光谱.

1.3.2 溶剂的影响 以 0.1mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4) 为缓冲溶液, 按上述方法得到平衡后的反应液, 取反应液 1.0mL 与 1.0mL 溶剂混匀, 测定激发、发射光谱.

1.3.3 表面活性剂的影响 取 200 μ L 表面活性剂溶液 (浓度见表 2) 与 2.4mL 0.1mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲溶液混合, 按同样方法记录 $F-t$ 曲线及平衡液的激发、发射光谱.

1.3.4 HRP 测定 于 1-cm 带塞石英液池中依次加入 2.5mL 0.1mol \cdot L⁻¹ (pH 7.4) Tris-HCl 缓冲溶液, 200 μ L 0.01mol \cdot L⁻¹ CTMAB, 不同体积的 0.725IU/mL HRP, 200 μ L 37.5mmol \cdot L⁻¹ HPPA, 100 μ L 0.03% H₂O₂, 上下摇匀, 待反应平衡后 (约 5min), 记录 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=333/421$ nm 的荧光强度.

实验时, 仪器入射、发射狭缝均为 3nm, 时间和波长扫描均选“FAST”, 灵敏度置“HIGH”, 水浴温度为 25 \pm 0.5C.

2 结果与讨论

2.1 平衡液的激发、发射光谱

从 HPPA-H₂O₂-HRP 体系反应平衡液的荧光激发、发射光谱 (图 1) 可知, 溶液中存在两个荧光物质, 经对照实验核实, a 是反应物 HPPA, b 是反应产物.

HPPA 和其它对位取代酚类化合物如 HVA, HPAA 等, 在此反应体系中一直被认为是非荧光物质^[1,6,7]. Guilbault 等^[7]最初研究该体系是采用滤光片式荧光计, 具有更短发射波长的反应物的荧光无法检测. Matsumoto 等^[8]及以后的研究者采用的强碱环境中测量荧光的方法使 HPPA 的荧光严重猝灭. 我们的实验表明, 在 0.1mol \cdot L⁻¹ NaOH 中, HPPA 的荧光已完全猝灭. 实际上 HPAA 和 HPPA 已被确认是荧光物质^[9]. 我们的结果是: 在上述介质中, HPPA 及其氧化产物的最大激发、发射波长分别是 284/310nm 和 299/406nm, HVA 是 270/300nm 和 315/430nm, HPAA 是 284/310nm 和 300/405nm.

2.2 缓冲溶液对反应平衡及产物荧光的影响

比较了 pH7.4 的 0.1mol \cdot L⁻¹ KH₂PO₄-K₂HPO₄, 0.1mol \cdot L⁻¹ 硼砂-1mol \cdot L⁻¹ HCl 和 0.1mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl 三种缓冲溶液对反应速率及产物荧光强度的影响, 结果是 Tris-HCl 给出最大的反应速率和产物荧光强度.

考察了 0.05~0.25mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl 在 pH 7.0~9.5 范围内对平衡时间及产物荧光的影响, 结果是 0.10mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl 效果最好.

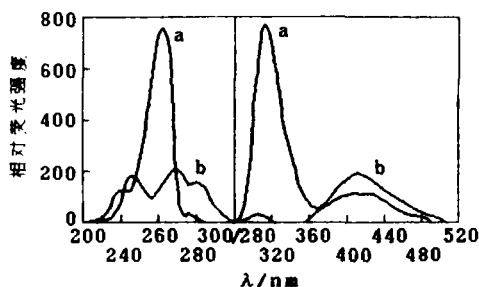


图 1 0.1mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4) 中, HPPA-H₂O₂-HRP 反应平衡液的激发、发射光谱
a—HPPA; b—反应产物

选取 $0.10\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 考察 pH 对反应平衡及产物荧光强度的影响, 如图 2 所示。

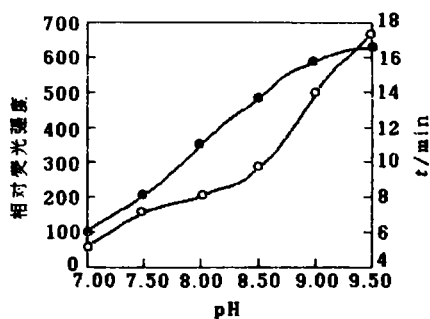


图 2 酸度对反应平衡及产物荧光强度的影响
—平衡时间: ●—荧光强度

pH 升高, 平衡时间变长, 说明 HRP 的活性降低; 产物荧光强度提高, 说明产物在碱性介质中荧光更强。以上即说明了该体系的 pH 不匹配问题以及反应、测定分立进行的道理。

我们进一步研究了荧光产物的酸碱性质, 图 3 给出了 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.4) 中平衡液的激发光谱以及强酸、强碱加入后两种极端条件下的激发光谱, 可见平衡液中荧光产物的 325nm 激发峰在强酸中消失, 299nm

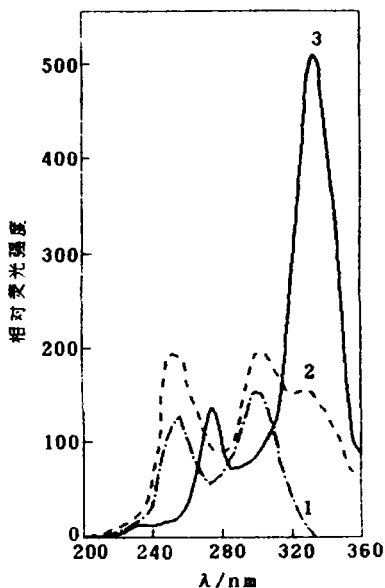


图 3 产物的激发光谱 ($\lambda_{em} = 406\text{nm}$)
1— $10\mu\text{L} 1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl; 2—pH 7.4;
3— $300\mu\text{L} 1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH

激发峰在强碱中消失, 同时 325nm 峰显著升高。因此, 325nm 峰对应产物的离子型 B, 299nm 峰对应产物的质子型 A。无论在 299nm 或 325nm 激发, 荧光峰均为 406nm, 说明激发品种无论是 A 或 B, 发射荧光的品种仅有 B^* , 因而存在激发态的酸解离。

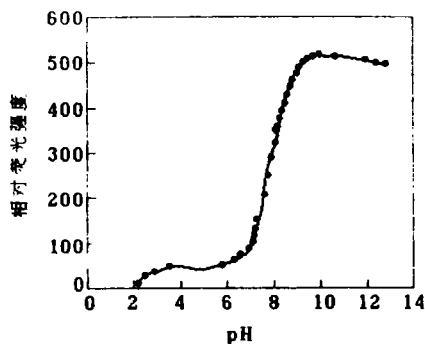
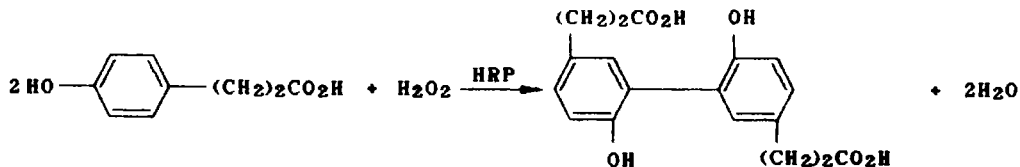


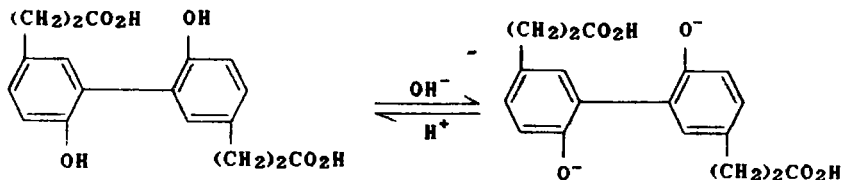
图 4 荧光产物的滴定曲线
($\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 325 / 406\text{nm}$)

图 4 给出了在 325nm 激发, 产物荧光强度随 pH 的变化, 因激发的唯一品种是 B, 该曲线表示了 B 的滴定曲线, 拐点相当于产物的酸解离常数 pK_a , 其值约为 8.3。

HRP-H₂O₂-HPPA 反应如下^[1]:



不考虑距苯环较远的 CO₂H 的影响, 产物的酸碱平衡如下式:



OH 为给电子基, 处于激发态时, OH 与苯环的共轭程度增加, 使 OH 的酸性大大增强^[10], 因而发生激发态的酸离解, 使荧光品种仅有 B^{*}.

2.3 有机溶剂对产物荧光性质的影响

表 1 给出了数种有机溶剂对产物荧光的影响及与 H₂O 的对照. 可见从水、甲醇、乙醇到异丙醇, λ_{ex_1} 和 λ_{ex_2} 均有所红移, 对应的荧光强度递增, 而 325nm 的激发强度 (峰位置不受溶剂影响) 则递降. 另外, 丙酮强烈猝灭产物荧光.

表 1 溶剂对荧光激发光谱的影响

溶 剂	λ_{ex_1}	F_1	λ_{ex_2}	F_2	F_{325nm}
水	250.8	373	299.0	389	212
甲 醇	252.0	494	301.6	490	115
乙 醇	253.0	582	302.0	573	102
异丙醇	253.4	612	304.0	610	85
异丁醇*	251.6	595	301.0	635	285
异戊醇*	251.6	453	300.8	555	210
乙 腈	251.6	478	301.9	557	110
丙三醇*	252.5	380	301.8	465	268
甲 醛	251.6	348	299.0	394	14
乙酸乙酯**	254.0	267	299.0	380	20
乙 醚	251.0	253	300.2	310	10
丙 酮	—	—	—	—	10

* 溶液分层; ** $\lambda_{em} = 400nm$, 且溶液分层.

由于水和醇类溶剂都可与产物形成分子间氢键, 这些溶剂的影响难以用描述一般溶剂效应的 Lippert 方程解释, 但从形成氢键能力和溶剂极性相对大小的角度就可以理解. 芳环上 OH 的孤对电子与芳环之间的激发态荷移作用 (共轭程度增加) 会部分地受到氢键抑制, 在较弱的氢键供体溶剂中, 这种抑制作用降低, 从而有利于荷移, 因而出现了质子化产物 A 的激发峰红移和强度提高. 离子型 B 的激发峰强度下降可归因于溶剂极性对产物酸碱平衡的作用, 极性较强的溶剂 (如 H₂O) 有利于产物的酸解, 使 B 的相对浓度增高, 而在异丙醇中, 则呈相反的结果.

将未加入丙酮的激发光谱除以加入丙酮的 (但未完全猝灭) 激发光谱, 得到一峰形图, 其位置恰与丙酮的吸收峰重叠, 说明丙酮的吸收导致了荧光猝灭.

2.4 表面活性剂对反应速率及产物荧光的影响

如表 2 所示, 阳离子胶束影响显著, 其中 CPB (氯化十六烷基吡啶) 和 DTPB (溴化十二烷基三苯基磷) 表现为抑制和猝灭作用, CTMAB 和 CTMAC 则为催化和增敏作用. 阴离子胶束、非离子胶束及 β -CD 无显著影响.

表 2 有序介质对反应速率及产物荧光强度的影响

	反应速率 ($\Delta F / \text{min}$)	$F_{\lambda_{ex} = 299nm}$	$F_{\lambda_{ex} = 325nm}$
H ₂ O	1.0	340	160
SDS ($2 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.9	335	155
SLS ($1 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.8	330	152
T _{ween} -20 (0.5%)	1.0	320	140
T _{ween} -80 (0.036%)	1.0	310	130
Triton X-100 (0.2%)*	1.1	—	—
β -CD ($1 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.1	320	110
PEG 400 (0.8%)	0.7	330	140

(续表 2)

	反应速率 ($\Delta F/\text{min}$)	$F_{\lambda_{ex}=299\text{nm}}$	$F_{\lambda_{ex}=325\text{nm}}$
PEG 6000 (0.8%)	1.1	338	158
CPB ($1 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.0	0	0
DTPB ($1 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.1	66	30
CTMAB ($1 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.6	370	387
CTMAC ($5 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.4	363	370

* 于 $\lambda_{ex} = 245\text{nm}$, 289nm 处有很强的激发峰, 致使产物荧光峰畸变, 使两 F 值无实际意义, 故略去。

胶束的最重要性质是其增溶作用和静电作用^[10]。由于离子型荧光产物 B 与阳离子胶束带有相反的电荷, 在胶束界面电场作用下, B 被吸引至胶束表面 (或增溶至内部), 从而显现胶束的作用。阴离子胶束和非离子胶束与 B 带有同性电荷或不带电荷, 而无明显作用。β-CD 对此荧光产物无增敏作用。

我们进一步考察了 CTMAB 的增敏和催化作用, 表明 CTMAB 的增敏不受介质酸度的影响, 但对 A 和 B 两种型态的荧光产物的增敏程度有别, 即对 B 的增幅更大。另外, CTMAB 在增加反应速率的同时, 并未使平衡时间缩短, 通过计算加入 CTMAB 与否 HPPA 在反应中荧光降低的多少, 得出在 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.4) 中, $200\mu\text{L}$ $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTMAB 的加入使 HPPA 的转化率由 19.2% 提高到 26.1%, 因此 CTMAB 的作用是提高了反应的进行程度 (实验表明, 在上述 CTMAB 存在下, HPPA 的荧光性质不受影响, 因而可以真实地得出转化率)。CTMAB 的增敏作用可以进一步提高原来分立测定方式的灵敏度, 催化作用则可使反应于中性介质中快速平衡, 使反应速率得以提高, 这实际上部分克服了该体系的 pH 不匹配缺点, 为使反应和测定一步完成提供了依据。

实验证明, CTMAB 的催化增敏作用同样适用于 HVA 和 HPPA, 同时还证明 CTMAB 对此类对位取代酚类化合物的催化氧化荧光产物的类似物 2,2'-二羟基联苯亦表现出增敏荧光作用, 因而又为测定此类物质提供了增敏途径。

2.5 HRP 的测定方法比较

比较了原始的 Zaitzu 法^[11]、Matsumoto 等改进的方法^[8]及 CTMAB 增敏法, 结果见图 5, 显然, 最后一种方法最灵敏。

3 结语

HRP 催化的对位取代酚类化合物的氧化荧光产物在水溶液中存在酸碱平衡, 碱式荧光强于酸式。阳离子胶束 CTMAB 和 CTMAC 对该反应具有催化和增敏作用。据此提供了一条解决该反应 pH 不匹配问题的途径, 不仅进一步提高了该体系在分析应用上的测定灵敏度, 而且促进了快速、连续测定的实现 (如流动注射分析)。

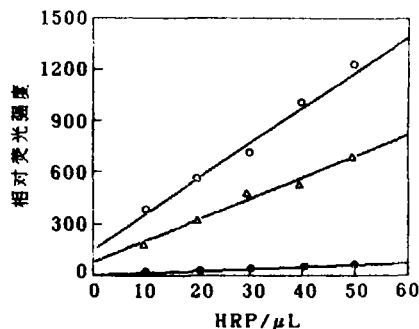


图 5 三种测定 HRP 方法比较
●—Zaitzu 法; Δ—Matsumoto 法; ■—胶束法

参考文献

- 1 Gunz, D.M.; Holfmann, M.R., *Atoms. Environ.*, **1990**, *24A*, 1601.
- 2 Tijssen, R., "Practice and Theory of the Enzyme Immunoassays", Elsevier, Amsterdam, **1985**, p. 369.
- 3 Hyslop, P.A.; Sklar, L.A., *Anal. Biochem.*, **1984**, *141*, 280.
- 4 Guilbault, G.G., "Enzymatic Methods of Analysis", Pergamon, New York, **1970**, p. 77.
- 5 Tijssen, R., "Practice and Theory of the Enzyme Immunoassays", Elsevier, Amsterdam, **1985**, p. 372.
- 6 Zhang, G.; Dasgupta, P.K.; Edgmond, W.S.; Mars, J.N., *Anal. Chim. Acta.*, **1991**, *243*, 207.
- 7 Guilbault, G.G.; Brignac, P.J.; Zimmer, M., *Anal. Chem.*, **1967**, *39*, 271.
- 8 Matsumoto, T.; Furuta, T.; Nizura, Y.; Suzuki, O., *Anal. Biochem.*, **1984**, *138*, 133.
- 9 Sadtler Research Laboratory, Inc., "The Sadtler Standard Spectra Fluorescence Spectra", Sadtler Research Laboratory, Inc., Philadelphia, **1974**, p. 288, 618.
- 10 陈国珍, 黄贤智, 许金钩, 郑朱梓, 王尊本, "荧光分析法" (第二版), 科学出版社, 北京, **1990**, 第75~111页.
- 11 Zaitse, K.; Ohkura, Y., *Anal. Biochem.*, **1980**, *109*, 109.

The Effect of Media Properties on the Horseradish Peroxidase-Catalyzed Fluorogenic Reaction

Li, Qing-Ge* Zhao, Yi-Bing Xu, Jin-Gou
Huang, Xian-Zhi Chen, Guo-Zhen

(Department of Chemistry, Institute of Modern Analytical Chemistry, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract The effect of the media properties on the horseradish peroxidase-catalyzed fluorogenic reaction is investigated. There existed acid-base equilibrium in the dimer product. For *p*-hydroxylphenolpropionic acid, the pK_a of the product is 8.3. The product fluorescence increases with higher pH, however, longer time is needed to reach the reaction equilibrium due to the pH mismatch with the enzyme activity. Cationic micelles cetyltrimethyl ammonium bromide and cetyltrimethylammonium chloride have catalytic and enhancing effects on the reaction at the neutral pH. A more sensitive method for the determination of horseradish peroxidase is thus suggested.