

铝酞菁磷酸酯用作碱性磷酸酶红区底物的初步研究

李东辉¹, 郑洪¹, 陈瑞川², 杨黄浩¹, 陈秋影¹, 许金钩¹

(1. 厦门大学化学系, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学抗癌研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 合成了铝酞菁磷酸酯, 对其荧光性质及作为碱性磷酸酶底物的可行性进行了初步考察. 结果表明, 该化合物有望成为一种新型的碱性磷酸酶红区荧光底物.

关键词: 酞菁; 碱性磷酸酶; 荧光

中图分类号: O65.32

文献标识码: A

碱性磷酸酶的活力检测是临床生化检验的重要项目. 在分子生物学、免疫学、组织化学和细胞生物学的研究中, 碱性磷酸酶是一种得到广泛使用的酶标记物. 其底物可分为显色底物和发光底物两大类. 荧光底物由于灵敏度高、选择性好、适合于显微观察等优点而应用广泛. 传统的荧光底物有萘酚、伞形酮、吖啶橙、罗丹明的磷酸酯衍生物^[1]. 其新型荧光底物的开发也一直受到重视, 如苯并噻唑衍生物、荧光多肽、2-(5-氯-磷酰苯基)-6-氯-4(3H)喹啉酮^[2~4]. 这些底物的发射波长大多在 600nm 以下的可见光区. 近几年来, 长波发射(红区和近红外)的荧光化合物由于具有诸多优点而引起人们的极大兴趣^[5]. 我们发现弱荧光的四羟基铝酞菁经磷酸化后, 荧光显著增强, 且发射在红区(688nm); 而在碱性磷酸酶的存在下, 其荧光明显猝灭.

1 仪器与试剂

荧光强度与光谱在 Hitachi 650 - 10s 荧光光度计上获得; 吸收光谱在 760CRT 紫外 - 可见分光光度计上获得; 碱性磷酸酶为 promega 产品; 所用试剂均为分析纯, 所用的水为二次水(一次去离子, 一次重蒸).

2 铝酞菁磷酸酯的合成

以 4-硝基邻苯二甲酸、尿素、钼酸铵、无水三氯化铝为原料, 在硝基苯介质中控温 180~190 反应 6h, 产物经 HCl 和 NaOH 反复纯化得四硝基铝酞菁; 然后以硫化钠水溶液为还原剂控温 55 反应 12h, 产物经酸碱纯化后得四氨基铝酞菁; 四氨基铝酞菁在硫酸介质中与 NaNO₂ 进行重氮化反应(冰浴), 随后加入水, 控温 45~50 浴水解 3h, 产物溶于碱, 不溶于酸, 反复纯化得到四羟基铝酞菁; 四羟基铝酞菁与三氯氧磷在吡啶介质中反应 2.5h 后水解得产物并除去过量的三氯氧磷, 再通过控制酸度的办法纯化产物, 真空干燥得终产物铝酞菁四磷酸酯.

3 羟基铝酞菁铝酞菁和磷酸酯的荧光性质

收稿日期: 1999 - 06 - 17

作者简介: 李东辉 (1967 -), 男, 助理研究员, 博士研究生.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29775021)

羟基铝酞菁在酸性介质中无荧光, 在碱性介质中有弱的荧光; 铝酞菁磷酸酯在酸性介质中发弱的荧光而在碱性介质中荧光显著增强.

4 碱性磷酸酶的存在对铝酞菁磷酸酯荧光性质的影响

我们观察到, 碱性磷酸酶的存在使铝酞菁磷酸酯的荧光明显衰减, 且随时间延长加剧. 为考察荧光衰减是否确为碱性磷酸酶的酶解作用而非蛋白 - 染料相互作用引起, 进行了对照实验. 在相同实验条件下, 浓度远高于酶(10 倍以上)的牛血清白蛋白(BSA)对铝酞菁酯的荧光几乎没有影响(见表 1).

初步研究的结果表明, 铝酞菁磷酸酯很有希望成为红区发射的碱性磷酸酶的新型底物.

表 1 碱性磷酸酶对铝酞菁磷酸酯荧光的影响

t/ min	碱性磷酸酶/ u · mL ⁻¹			参照 BSA (9ug · mL ⁻¹)
	0	0.6	1.5	
30	536	410	375	520
90	433	200	177	414

注: u 活力单位

参考文献:

- [1] Haugland R P Handbook of fluorescent probes and research chemicals [M]. 6th ed. Eugene: Molecular Probes Co, 1996. 219 ~ 223.
- [2] Sasamoto K, Deng G, Ushijima T, et al. Benzothiazole derivatives substrates for alkaline phosphatase assay with fluorescence and chemiluminescence detection [J]. Analyst, 1995, 120 (6): 1709 ~ 1714.
- [3] Higashi H, Sato K, Ohtake A, et al. Imaging of cAMP - dependent protein kinase activity in living neural using a novel fluorescent substrate [J]. FEBS Letters, 1997, 414 (1): 55 ~ 60.
- [4] Paragas V B, Zhang Y Z, Haugland R P, et al. The EL F - 97 alkaline phosphatase substrate provides a bright, photostable, fluorescent substrate [J]. J Histochem, Cytochem, 1997, 45 (3): 345 ~ 357.
- [5] 许金钩. 近红外荧光检测技术及其应用前景 [A]. 分析化学新进展 [M]. 太原: 山西科学技术出版社, 1997. 20 ~ 21.

Preliminary Investigation of Tetra - Substituted Phosphated Aluminum Phthalocyanine as a Novel Fluorescent Substrate Emitting at Red Region for Alkaline Phosphatase

LI Dong - Hui¹, ZHENG Hong¹, CHEN Rui - chuan², YANG Huang - hao¹, CHEN Qiu - ying¹, XU Jin - gou¹

(1. Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China; 2. Cancer Research Center, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

Abstract: A new derivative of aluminum phthalocyanine, tetra - substituted phosphated aluminum phthalocyanine (ALP₄Pc), was synthesized and its fluorescence characteristics in the presence and absence of alkaline phosphatase were investigated. The preliminary results reveal that ALP₄Pc is a potential fluorescent substrate emitting at red region for alkaline phosphatase.

Key words: phthalocyanine; alkaline phosphatase; fluorescence