

荧光法水相快速测定HRP酶浓度

阙雨婷, 马天凤, 李雨芯, 蔡燕*, 葛存旺*

南通大学化学化工学院, 江苏 南通

收稿日期: 2022年9月10日; 录用日期: 2022年9月30日; 发布日期: 2022年10月11日

摘要

本文采用2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸作为水溶性的高荧光量子荧光探针, 用于辣根过氧化物酶的检测。在pH = 7.2, 25℃下, 配体2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸浓度为 6×10^{-6} mol/L, H_2O_2 浓度为 1×10^{-4} mol/L时, 回归方程为 $F = 60.934x + 1745.9$, 该体系的检测范围可达 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ mol/L, 灵敏度较高, 操作简便, 抗干扰能力强, 可用作检测游离的辣根过氧化物酶和辣根过氧化物酶标记物的新方法, 具有实际的应用前景。

关键词

荧光, 水相, 辣根过氧化物酶, 浓度

Rapid Determination of HRP Enzyme Concentration in Aqueous Phase by Fluorescence Method

Yuting Que, Tianfeng Ma, Yuxin Li, Yan Cai*, Cunwang Ge*

School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong Jiangsu

Received: Sep. 10th, 2022; accepted: Sep. 30th, 2022; published: Oct. 11th, 2022

Abstract

In this paper, 2,6-di-(2-pyridyl)-4-picolinic acid was used as a water-soluble high fluorescence quantum product as a fluorescence probe for the detection of HRP enzyme. At pH = 7.2 and 25°C, the ligand PPA concentration is 6×10^{-6} mol/L, H_2O_2 concentration 1×10^{-4} mol/L, the regression equation is $F = 60.934x + 1745.9$. The detection range of the system can reach $10^{-7} \sim 10^{-8}$ mol/L. It

*通讯作者。

has high sensitivity, simple operation and strong anti-interference ability. It can be used as a new method for the detection of free HRP and HRP markers, and has a practical application prospect.

Keywords

Fluorescence, Aqueous Phase, Horseradish Peroxidase, Concentration

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)是一种糖蛋白,它以铁卟啉为辅基,在过氧化氢存在时能催化苯酚、苯胺及其取代聚合物。由于其活性高且稳定性好,提取制备简单,常被制备成免疫类(ELISA)试剂盒,广泛用于工、农、医和环境等各领域[1]。设计出一种更为简便、有效的 HRP 酶活性检测方法具有实际意义[2] [3] [4]。目前检测酶活用得最多的是分光光度法和荧光法。荧光法除可应用于检测荧光物质,还可分析原本无荧光的生物大分子。酶蛋白本身的荧光强度一般很弱,若将荧光探针与其结合使用,则有利于酶蛋白的检出,大为提高灵敏度。在体系成分复杂时,荧光探针作为一种非放射性的标记技术,安全性和灵敏度较高,因此是值得尝试的一个研究方向。

开发有效的小分子荧光探针以实时跟踪和可视化多种生物酶检测是近年来的研究热点。三联吡啶配合物与含 NS 的生物大分子如蛋白质、DNA 等有很好的亲和性,由于发光性质可发生变化可应用于生物探针。三联吡啶衍生物日益受到重视,主要是以打破三联吡啶单一的配位模式为主要目标,同时又逐步向多功能方向发展[5] [6] [7] [8]。若在三 4' 位置引入羧基可以与各种金属 M^{n+} 构成丰富的配位,而且羧基配体能溶于弱碱性水溶液,易于在水相中与生物大分子发生相互作用[9] [10] [11]。本文利用荧光光谱在水相中采用 2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸(配体 PPA, 见图 1)测定 HRP 酶浓度。该方法的原理是以 HRP 酶催化 H_2O_2 氧化配体 PPA 形成水溶性产物,通过测定体系荧光强度变化以确定 HRP 酶浓度。配体 PPA 易于合成,与 HRP 的最适 pH 作用范围十分匹配,在接近中性的条件下能溶于水和 HRP 作用。

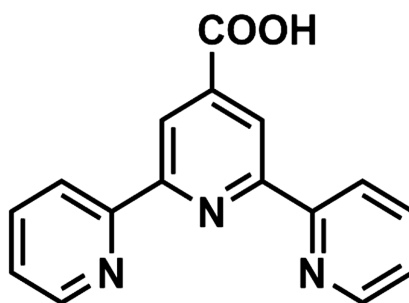


Figure 1. The Structure of 2,6-di-(2-pyridyl)-4-Picolinic acid

图 1. 2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸结构

目前未见 2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸用于荧光光度法检测 HRP 酶浓度的研究。本方法可用于游离 HRP 的检测,响应快、灵敏度高、操作简便,可为 HRP 酶检测的发展和完善提供有效选择,具有实际的应用前景。

2. 实验部分

2.1. 实验试剂与仪器

2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸, 辣根过氧化物酶(HRP), 阿拉丁; 30% H_2O_2 , NaOH, KOH, NaHSO_3 , 无水乙醇, 分析纯, 西陇化工股份有限公司。荧光光谱仪(F-7000, 日立分析仪器有限公司)。

2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸溶液: 准确称取一定量配体 PPA, 加蒸馏水溶解, 并加入几滴配制好的 NaOH 溶液, 后移入 250 mL 容量瓶中, 定容成浓度为 5×10^{-4} mol/L 的溶液, 常温保存, 稀释为不同浓度为后续使用。

辣根过氧化物酶溶液: 准确称取一定量 HRP 溶于水, 后移入 250 mL 容量瓶中, 配制成 1×10^{-6} mol/L 的溶液, 放入 4℃ 冰箱中保存, 稀释为不同浓度供后续使用。

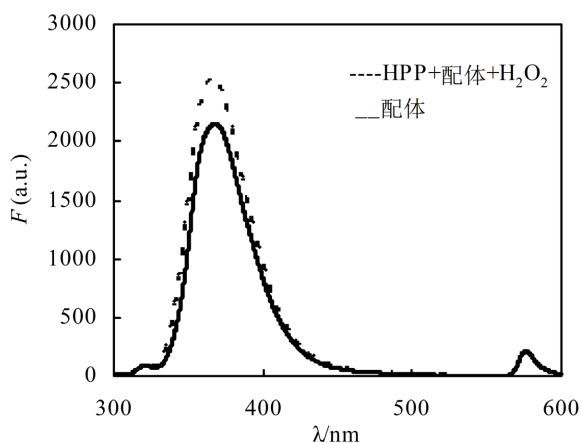
2.2. 实验方法

在一定发射波长下, 测定配体 PPA 和酶 HRP 的荧光发射光谱。固定配体和 HRP 酶浓度, 寻找合适的 H_2O_2 浓度。采用单因素法, 分别考察时间、温度、pH 对该作用体系的影响。在一定配体和 H_2O_2 浓度下, 绘制 HRP 酶的荧光光谱工作曲线。

3. 实验结果

3.1. 配体荧光光谱

由图 2 可知, 当激发波长为 286 nm 时, 配体 PPA 的荧光光谱在 366 nm 处有一较强的发射峰, 550~600 nm 处的小峰为倍频峰。该水溶性三联吡啶配合物具有很高的荧光量子产率, 可以在低浓度下使用。加入酶和双氧水, 体系荧光发射峰增强。



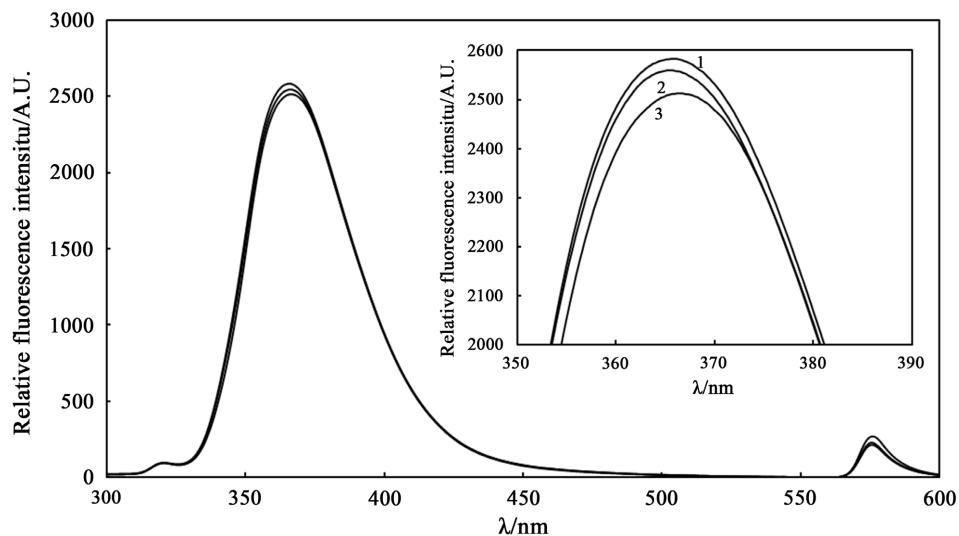
$C(\text{配体 PPA}) = 1 \times 10^{-5}$ mol/L, $C(\text{HRP}) = 1 \times 10^{-7}$ mol/L, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \times 10^{-4}$ mol/L; 室温, pH = 7.2, 反应时间 0.5 h。

Figure 2. Effect of HRP on fluorescence intensity of ligand PPA

图 2. HRP 对配体 PPA 荧光强度的影响

3.2. H_2O_2 浓度的影响

H_2O_2 浓度对体系发光强度有影响, 浓度过高会相应增加背景, 太低又会由于其本身不稳定会影响 HRP 检测的灵敏度和准确性, 有必要考察合适的 H_2O_2 浓度。图 3 是在一定浓度的配体 PPA 与 HRP 中加入不同浓度的 H_2O_2 所测得的荧光图谱。366 nm 的发射波长处出现最高峰, 峰值随 H_2O_2 浓度增大而略有增加, 但 H_2O_2 过量后峰值不再变化。后续实验中使 H_2O_2 过量, 以消除 H_2O_2 的干扰。



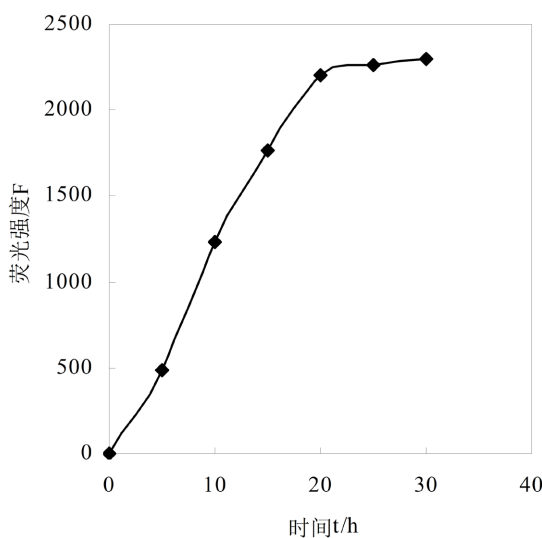
$C(\text{配体 PPA}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $C(\text{HRP}) = 1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2)$: 1— $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 2— $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 3— $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; 室温, $\text{pH} = 7.2$, 反应时间 0.5 h。

Figure 3. Effect of H_2O_2 concentration on fluorescence intensity of the system

图 3. H_2O_2 浓度对体系荧光强度的影响

3.3. 时间因素

影响体系吸光度的因素很多, 如时间、 pH 、温度等。反应随催化时间的增加, 体系的吸光度亦增加, 前 10 min 几乎呈线性。20 min 之后, 速度增加缓慢, 渐趋于平衡, 见图 4。达到平衡后的体系非常稳定, 48 h 内吸光度基本保持恒定。



$C(\text{配体 PPA}) = 0.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $C(\text{HRP}) = 1.056 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 室温, $\text{pH} = 7.2$ 。

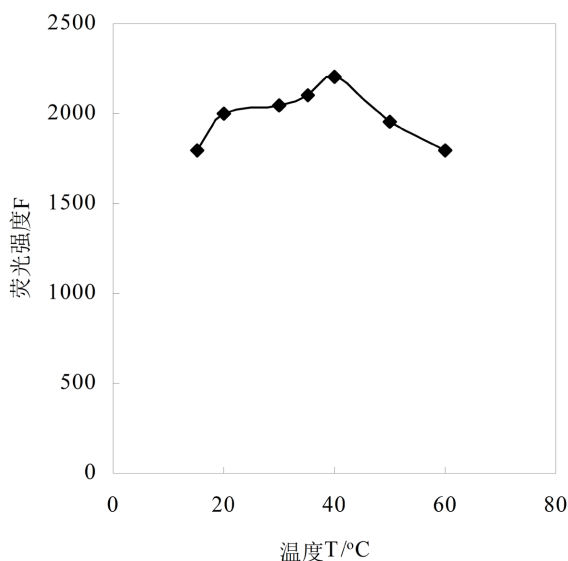
Figure 4. Reaction process of ligand PPA-HRP- H_2O_2 system

图 4. PPA-HRP- H_2O_2 体系的作用进程

3.4. 温度因素

温度不仅影响酶反应速率, 而且影响酶的稳定性。如图 5 所示, HRP 酶反应在 40°C 左右为比较适宜,

较高温度时反应速率有所提升，但不利于酶的稳定。本体系在室温下即可得到满意的反应速率，且室温操作较为节能方便，故本实验在室温下进行。



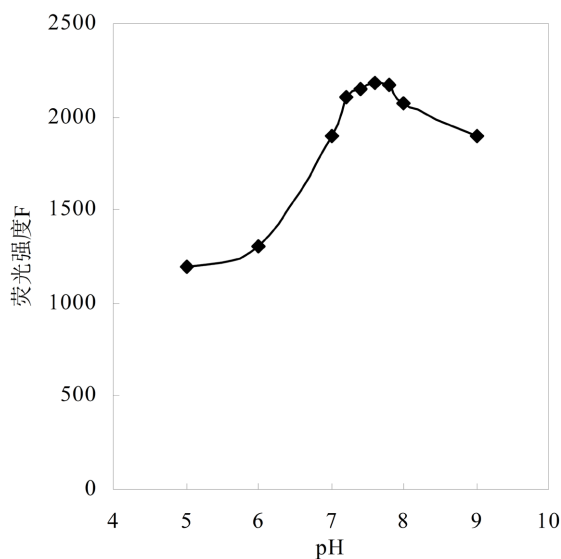
$C(\text{配体 PPA}) = 0.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $C(\text{HRP}) = 1.056 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 反应时间 0.5 h, pH = 7.2。

Figure 5. Effect of temperature on the fluorescence intensity of the system

图 5. 温度对体系荧光强度的影响

3.5. pH 因素

HRP 催化作用的最佳 pH 是中性或弱酸性。配体 PPA 在中性条件下溶解性较差，在酸性时易溶于有机溶剂。如图 6 所示，实验测试配体 PPA 在 pH = 7.2 的弱碱性体系中溶解良好，该 pH 也在 HRP 催化反应的最适 pH 范围，因此该体系的 pH 定为 7.2。



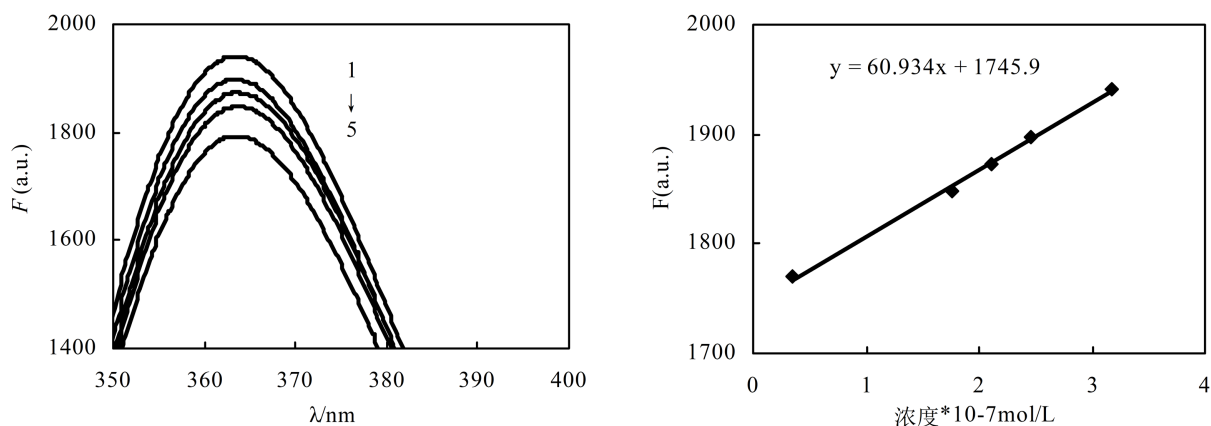
$C(\text{配体 PPA}) = 0.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $C(\text{HRP}) = 1.056 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 室温, 反应时间 0.5 h。

Figure 6. Effect of pH on fluorescence intensity of the system

图 6. pH 对体系荧光强度的影响

3.6. 工作曲线

图7是在 6×10^{-6} mol/L 的配体 PPA 溶液中加入梯度浓度的 HRP 溶液所测得荧光图谱。随着 HRP 浓度的增大, 荧光强度逐渐升高, 于 366 nm 峰值处绘制荧光强度的工作曲线。可见体系荧光强度对 HRP 浓度之间有良好的线性关系。HRP 对配体 PPA 的氧化能力与酶浓度成正相关。把该体系在常温下放置 48 h 后再测试其荧光发射光谱, 其荧光强度保持稳定, 有比较强的抗干扰能力。荧光光谱对配体 PPA-HRP-H₂O₂ 体系的识别性能好, 可简单快速识别, 灵敏度高, 具有一定的应用潜力。



1— $C(\text{HRP}) = 3.168 \times 10^{-7}$ mol/L; 2— $C(\text{HRP}) = 2.464 \times 10^{-7}$ mol/L; 3— $C(\text{HRP}) = 2.112 \times 10^{-7}$ mol/L; 4— $C(\text{HRP}) = 1.760 \times 10^{-7}$ mol/L; 5— $C(\text{HRP}) = 7.040 \times 10^{-8}$ mol/L; $C(\text{配体}) = 6 \times 10^{-6}$ mol/L; $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \times 10^{-4}$ mol/L; 室温, pH = 7.2, 反应时间 0.5 h。

Figure 7. Fluorescence working curve of ligand PPA-HRP-H₂O₂ system

图7. 配体 PPA-HRP-H₂O₂ 体系荧光工作曲线

4. 结论

本文利用荧光光谱在水相中采用 2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸测定辣根过氧化物酶浓度。HRP 对过氧化氢氧化配体 PPA 的反应具备显著的催化作用, 得到的化合物对 366 nm 发射波长的光具有较强的荧光。在 HRP 浓度为 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ mol/L 时, 配体 PPA-HRP-H₂O₂ 体系的荧光强度与 HRP 的浓度有较好的线性关系, 检测限可达 10^{-8} mol/L。该 2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸-H₂O₂-HRP 体系的灵敏度较高, 操作简便, 抗干扰能力强, 成本相对较低, 可用作检测游离的 HRP 和 HRP 标记物的新方法, 具有实际的应用前景。

基金项目

国家青年自然科学基金(21801139)资助。

参考文献

- [1] 孙旭东, 马林, 刘伟, 等. 非水介质中辣根过氧化物酶(HRP)荧光活性测定法[J]. 生物化学杂志, 1994, 10(4): 490-495.
- [2] Fang, X., Wu, X.-M. and Hu, X.-L. (2016) Native Carbon Nanodots as a Fluorescent Probe for Assays Based on the Use of Glucose Oxidase or Horseradish Peroxidase. *Microchim Acta*, **183**, 2761-2770. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1921-5>
- [3] Tang, B. and Zhang, P.P.A. (2006) FIA-Near-Infrared Spectrofluorimetric Trace Determination of Hydrogen Peroxide Using Tricarchlorobocyanine Dye (Cy.7.Cl) and Horseradish Peroxidase (HRP). *Talanta*, **68**, 876-882. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.053>

-
- [4] Gong, T.T., Liu, J.F. and Wu, Y.W. (2017) Fluorescence Enhancement of CdTe Quantum Dots by HBcAb-HRP for Sensitive Detection of H₂O₂ in Human Serum. *Biosensors and Bioelectronics*, **92**, 16-20. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.048>
- [5] Ferraro, G., Marzo, T., Infrasca, T., *et al.* (2018) A Case of Extensive Protein Platination: The Reaction of Lysozyme with a Pt(II)-Terpyridine Complex. *Dalton Transactions*, **47**, 8716-8723. <https://doi.org/10.1039/C8DT01254G>
- [6] Biniuri, Y., Albada, B., Wolff, M., *et al.* (2018) Cu²⁺ or Fe³⁺ Terpyridine/Aptamer Conjugates: Nucleoapzymes Catalyzing the Oxidation of Dopamine to Aminochrome. *ACS Catalysis*, **8**, 1802-1809. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b03454>
- [7] Qiu, C., Hua, P., Yu, H., *et al.* (2020) Synthesis and Properties of Octyl Glucoside. *Textile Auxiliaries*, **37**, 22-30.
- [8] Yao, Y., Chen, J. and Wang, C.W. (2019) Construction and Application of 3D Supramolecular Polymers Based on Pillar[n]arenes. *Journal of Nantong University*, **18**, 8-15.
- [9] Chen, L.M., Yu, S.S., Xiao, M., *et al.* (2017) Recognition of Chiral Amines by a Terpyridine-Zn-II-Complex-Based Circular-Dichroism Sensor. *European Journal of Organic Chemistry*, **16**, 2338-2343. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700066>
- [10] Lin, C.P., Florio, P., Campi, E.M., *et al.* (2014) Synthesis of Substituted Terpyridine Ligands for Use in Protein Purification. *Tetrahedron*, **70**, 8520-8531. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.09.074>
- [11] Du, J., Huang, Z., Yu, X.Q., *et al.* (2013) Highly Selective Fluorescent Recognition of Histidine by a Crown Ether-Terpyridine-Zn(II) Sensor. *Chemical Communications*, **49**, 5399-5401. <https://doi.org/10.1039/c3cc42081g>