2007 年第 65 卷 化 学 学 报 Vol. 65, 2007
第 15 期, 1499～1503 ACTA CHIMICA SINICA No. 15, 1499～1503

• 研究论文 •

季胺–辣根过氧化物酶–过氧化氢显色新体系及其在酶活性检测中的应用

李建国 刘 颖 鞠熀先*
(生命分析化学教育部重点实验室 南京大学化学系 南京 210093)

摘要 建立了光度法测定辣根过氧化物酶(HRP)活性的季胺–过氧化氢-HRP 新体系, 探讨了反应机理. 该方法基于含 KI 的 pH 4.5 PBS 介质中, HRP 催化 H_2O_2 氧化季胺[二(4–二甲氨基苯基)甲烷]的显色反应在 462 nm 处的吸光度. 吸光度与 HRP 活性呈线性关系. 该可溶性的季胺比目前临床常用显色剂 3,3',5,5'-四甲基联苯胺更稳定, 克服了后者的缺点. 在选定的实验条件下, 测定 HRP 的线性范围为 2.0×10^{-9}～2.5×10^{-7} g/mL, 检出限为 3×10^{-10} g/mL. 应用于 HRP 标记马抗人甲胎蛋白免疫标记物的测定, 结果满意. 该方法操作简便, 灵敏度高, 在临床上有较好的应用前景.

关键词 光度酶联免疫法; 辣根过氧化物酶; 过氧化氢; 季胺; 二(4-二甲氨基苯基)甲烷

A Novel Tetrabase-horseradish Peroxidase-H_2O_2 Spectrophotometric System and Its Application to Detection of Enzyme Activity

LI, Jian-Guo LIU, Ying JU, Huang-Xian*
(*Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science* (*Ministry of Education of China*), *Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093*)

Abstract A new spectrophotometric system of tetrabase [bis(4-dimethylaminophenyl)methane]-H_2O_2-horseradish peroxidase (HRP) was developed for the detection of HRP activity, and the reaction mechanism was discussed. The detection was based on the HRP catalyzing coloring reaction of tetrabase in pH 4.5 PBS containing KI, which behaved maximum absorption at 462 nm. The absorbance was proportional to the activity of HRP. This new tetrabase reagent is soluble and more stable than 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB), a usually used coloring reagent for ELISA in clinic, and could overcome the shortcomings of TMB. Under optimal conditions, the linear range for HRP detection was 2×10^{-9}～2.5×10^{-7} g/mL with the detection limit of 3×10^{-10} g/mL. This system could be used for the determination of HRP labeled horse anti-human α-fetoprotein with satisfactory results. The new system is simple, rapid and sensitive, and has good application prospect in clinic.

Keywords spectrophotometric enzyme-linked immunosorbent assay; horseradish peroxidase; hydrogen peroxide; tetrabase; bis(4-dimethylaminophenyl)methane

以生物酶为标记物的酶联免疫分析方法已广泛应用于植物病毒鉴定和临床疾病诊断等多个领域. 酶联免疫分析结合酶的催化放大作用和抗原抗体的专一性, 具有很高的灵敏度, 特别适合于低浓度的样品和含有大量蛋白质、氨基酸、糖类等临床样品的检测. 辣根过氧化物酶(HRP)是广泛应用于酶联免疫分析(ELISA)中的一种标记酶[1], 以此已建立了各种光学酶联免疫分析[2,3]和电化学酶联免疫分析等体系[4~8]. 这些方法以测定标记

* E-mail: hxju@nju.edu.cn
Received May 22, 2006; revised July 3, 2006; accepted April 2, 2007.
国家自然科学基金(No. 20325518)、国家自然科学基金创新研究群体项目(No. 20521503)和重点项目(No. 20535010)资助项目.

酶活性为基础, 因此对底物体系的选择非常重要. 传统 ELISA 法最常用的底物是邻苯二胺(OPD)和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)[9~12], 这些底物存在储备液不稳定、水溶性不好等缺点. 本文用新显色剂季胺[二(4-二甲氨基苯基)甲烷]作为 TMB 的代替物, 提出了季胺-过氧化氢-HRP 光度检测新体系. 该季胺可很好地溶于微酸性的水溶液, 储备液无需避光保存, 在室温下可稳定保存三个月以上. 在选定的实验条件下, 用分光光度法可对 2.0×10^{-9}～2.5×10^{-7} g/mL 的 HRP 进行定量分析. 该体系可用于光度酶联免疫分析, 具有操作简便、灵敏度较高、试剂稳定等优点, 在临床上可代替 TMB 进行抗原的免疫检测.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Lambda 35 紫外/可见光谱仪(PE 公司), UV-3100 紫外/可见光谱仪(岛津公司), 722 型光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂), 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司).

辣根过氧化酶 HRP(华美生物工程公司, 250 U/mg, RZ≥3), 配成 1.00 mg/mL 储备液, 于 4 ℃保存, 使用时逐级稀释. 二(4-二甲氨基苯基)甲烷(百灵威试剂公司), 配成 0.02 mol/L 储备液, 使用时稀释为 0.002 mol/L 工作液. 甲胎蛋白酶联免疫法诊断试剂盒(上海飞龙医用诊断用品有限公司). TMB(上海化学试剂公司). KI 和磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液(PBS)分别配成 0.2 mg/mL 和 0.2 mol/L 溶液. 所用试剂均为分析纯, 所用水均为去离子石英亚沸蒸馏水.

1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中依次加入 2.0 mL PBS, 1.2 mL 0.9 mmol•L^{-1} H_2O_2, 50 μL 0.20 mg/mL KI 溶液和适量 10.0 μg/mL HRP 溶液, 旋摇后加入 100 μL 0.002 mol/L 季胺溶液, 亚沸蒸馏水定容, 以无 HRP 的溶液为空白. 40 ℃恒温 15 min 后在 462 nm 波长处, 以亚沸水作参比, 测定催化体系和空白的吸光度 A 与 A_0, 并计算$\Delta A=A-A_0$ 值.

2 结果与讨论

2.1 催化体系吸收光谱

在 KI 存在下, HRP 催化 H_2O_2 氧化季胺可生成一种黄色产物. 酶催化体系和非催化体系(空白)在 40 ℃恒温 15 min 后的紫外-可见光谱如图 1 所示. 酶催化反应后的溶液在 462 nm 处显示一强吸收峰, 峰强度与 HRP 的浓度有关, 且随 HRP 的浓度增加而增加, 故选 462 nm 为工作波长.

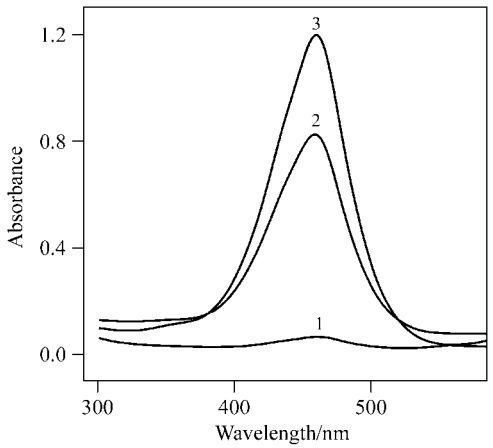


图 1 不同溶液的吸收光谱.

Figure 1 Absorption spectra of different solutions

(1) H_2O_2+tetrabase+KI; (2) H_2O_2+tetrabase+KI+HRP (0.1 μg/mL); (3) H_2O_2+tetrabase+KI+HRP (0.16 μg/mL)

2.2 检测条件选择

用 PBS 可得到较大吸光度, 而用柠檬酸-柠檬酸盐或 HAc-NaAc 缓冲溶液, 体系出现浑浊, 故选择 PBS 为本体系的缓冲溶液. 采用单因素变化法, 在 pH 3.67～5.27 间进行优化, 吸光度在 pH 4.35～4.55 出现一最大值(图 2), 故选择 PBS 的 pH 值为 4.50.

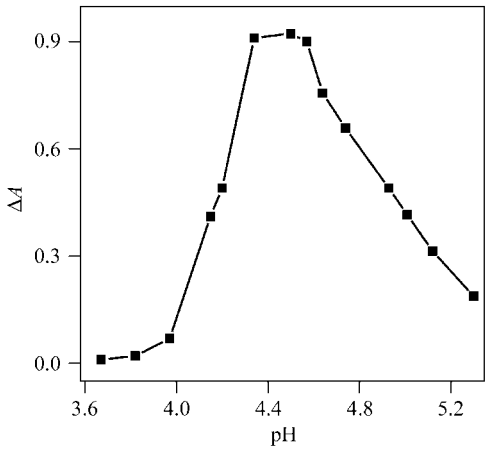


图 2 磷酸盐缓冲液 pH 的影响

Figure 2 Effect of pH of PBS

考虑到体系的吸光度值应在合适的读数范围, 在 10 mL 溶液中指示反应的 0.002 mol/L 季胺溶液的适宜用量为 80～120 μL. 当 H_2O_2 溶液(0.9 mmol•L^{-1})的用量在 1.2 mL 以上时, 吸光度值出现平台. 增敏剂 0.20 mg/mL KI 溶液的用量在 40～60 μL 范围内, 催化作用的效果最为显著, 且ΔA 值基本恒定不变. 本文选用在 10 mL 溶液中加入 100 μL 0.002 mol/L 季胺, 1.2 mL 0.9

mmol•L^{-1} H_2O_2 和 50 μL 0.20 mg/mL KI.

将实验体系分别在 20～60 ℃恒温，测得吸光度值与温度关系如图 3 所示. 酶活性随着温度升高而增强，约在 40 ℃时达到最大值，故选择恒温温度为 40 ℃. 40 ℃时的反应动力学曲线表明，在 7～15 min 内Δ*A* 值与反应时间 *t* 呈线性关系. 15 min 后动力学曲线趋向平台，说明反应在 15 min 后已达完全，本实验采用 40 ℃水浴加热 15 min.

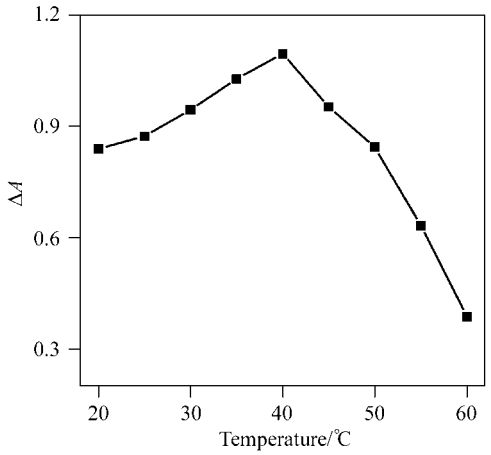


图 3　温度的影响

Figure 3　Effect of temperature

2.3　反应机理的探讨

如图 4 所示, KI 的加入能明显地提高体系的吸光度和反应速率. 在没有 HRP 存在时, H_2O_2 氧化季胺的反应几乎不进行(长时间放置无明显颜色变化)[13]. 即使在 KI 存在下，在 40 ℃恒温 15 min 后体系的吸收曲线也只显示很弱的吸收峰(图 1 曲线 1). 因此 KI 直接与 H_2O_2＋季胺体系反应的速率很低. 在 H_2O_2 和季胺溶液中加入少量(0.1 μg/mL) HRP 溶液后，吸收曲线在 462 nm 处显示一吸收峰，但峰强度较低, HRP 催化 H_2O_2 氧化季胺的反应进行得很慢(图 4 曲线 2). 加入 1.0 μg/mL 的 KI 溶液后，反应速率迅速加快，吸光度增加 5.75 倍(图 4 曲线 3)，因此 I^-参与了 H_2O_2 氧化季胺的反应. 随着反应时间的增加，体系的颜色不断加深，反应越完全. 反应进行 5 min 后，体系为蓝色，最大吸收波长出现在 602 nm 处(图 5 曲线 1). 反应进行 10 min 时体系转变为绿色(蓝色与黄色的混合色)，在 602 nm 和 462 nm 处各显示一吸收峰(图 5 曲线 2). 随着反应时间的增加, 602 nm 处吸收峰减弱, 462 nm 处吸收峰增强，反应进行 15 min 时产物完全变为黄色，此时只显示 462 nm 处的吸收峰(图 5 曲线 3)，结果与 2.2 节中 40 ℃时的反应动力学曲线一致，而且该吸收峰的强度稳定(吸光度可稳定 1 h 以上)，表明反应物在 15 min 后已完全变成产物.

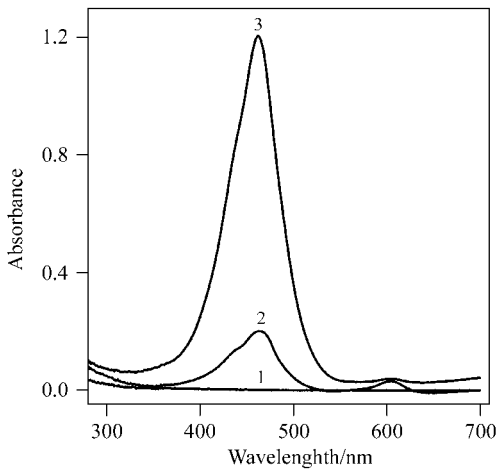


图 4　不同体系的吸收光谱

Figure 4　Absorption spectra of different systems

(1) tetrabase＋KI (1.0 μg/mL)＋HRP (0.1 μg/mL); (2) tetrabase＋H_2O_2＋HRP (0.1 μg/mL); (3) tetrabase＋H_2O_2＋HRP (0.1 μg/mL)＋KI (1.0 μg/mL)

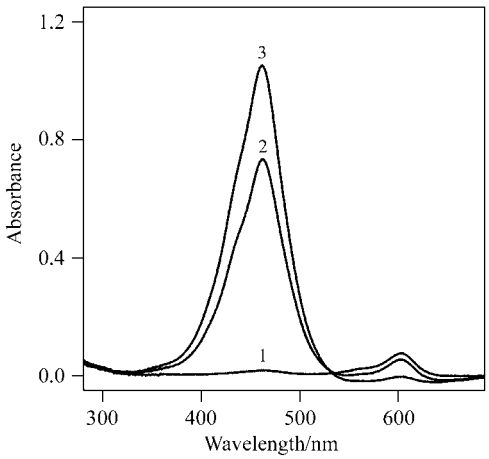


图 5　季胺-H_2O_2-HRP-KI 在不同反应时间的吸收光谱

Figure 5　Absorption spectra of tetrabase-H_2O_2-HRP-KI at different reaction times: (1) 5 min; (2) 10 min; (3) 15 min

由这些实验结果及相关工作[13,14]，推测其反应机理如下:

$$H_2O_2 + I^- \xrightarrow{HRP} IO^- + H_2O \quad (慢反应) \tag{1}$$

$$IO^- + I^- + 2H^+ \longrightarrow 2I + H_2O \quad (快反应) \tag{2}$$

$(H_3C)_2N-C_6H_4-CH_2-C_6H_4-N(CH_3)_2 + I \rightleftharpoons$

(季胺，无色)

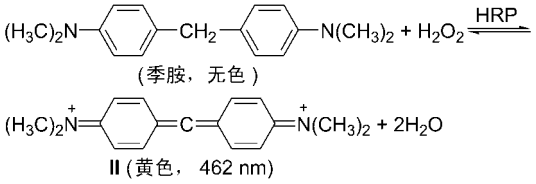
$(H_3C)_2N-C_6H_4-CH=C_6H_4=N^+(CH_3)_2 + I^- + H^+$ (3)

I (喹诺醛，蓝色)

喹诺醛+I $\rightleftharpoons$ $(H_3C)_2\overset{+}{N}=C_6H_4=C=C_6H_4=\overset{+}{N}(CH_3)_2 + I^- + H^+$ (4)

II (黄色，462 nm)

总反应(1)+(2)+(3)+(4)为:



(5)

其中 HRP 催化第一步 H_2O_2 氧化 I^- 的反应为总反应的决速步骤, 故 HRP 的量在一定范围内对体系的吸光度值起决定作用. 在氧化过程中, 两种颜色的出现和在两个波长下吸收峰的涨落表明, 氧化反应分两步进行, 分别生成蓝色的喹诺醌产物(**I**)和黄色的产物(**II**).

2.4 线性范围、检测限及 HRP 活性的测定

取不同量 HRP 标准溶液, 按实验方法测定吸光度并绘制工作曲线, 其线性回归方程为 $\Delta A=-0.131+86.9c$/(μg•mL^{-1}), 相关系数 $r=0.9956$, 线性范围为 2.0×10^{-9}～2.5×10^{-7} g/mL. 对试剂空白进行 11 次平行测定, 按其标准偏差的 3 倍计算, 求得 HRP 的检出限为 3×10^{-10} g/mL.

将本体系应用于甲胎蛋白酶联免疫法诊断试剂盒中 HRP 标记马抗人甲胎蛋白标记物的测定, 最大稀释体积比为 1∶2.5×10^5, 灵敏度稍优于诊断试剂盒所用显色剂 TMB(最大稀释体积比为 1∶2.0×10^5). 而且本体系所用显色剂二(4-二甲氨基苯基)甲烷比 TMB 更稳定, 无需避光保存.

2.5 底物稳定性研究及与常用显色试剂 TMB 的比较

临床上光度酶联免疫分析常用 TMB 为显色剂. TMB 在水中溶解度较差, 需先溶于 1∶1 二甲亚砜溶剂进行配制[11]. 有机溶剂的介入还将影响酶的活性, 直接影响用 HRP 标记免疫试剂(抗原或抗体)进行免疫检测的灵敏度. 同时 TMB 溶液不稳定, 需在棕色瓶中 4 ℃避光保存, 实验操作中也易被其它氧化剂氧化而变色, 对免疫分析产生干扰, 影响实验结果的准确性和试剂盒的使用寿命. 本实验采用二(4-二甲氨基苯基)甲烷为显色试剂, 它可溶于微酸性的水溶液, 且储备液无需避光保存, 在室温下可稳定保存三个月以上, 克服了 TMB 显色剂的上述缺点. 表 1 给出了季胺溶液稳定性考察结果. 可见季胺溶液具有很好的储存和检测稳定性, 三个月后最大吸收波长处的吸光度值仅降低 5%, 对测定结果几乎没有影响, 这一性能优于 TMB. TMB 与二(4-二甲氨基苯基)甲烷在相同浓度下被过氧化氢-HRP 体系氧化后的产物的吸收光谱如图 6 所示, 后者对 HRP 的测定更为灵敏. 该方法操作简便, 灵敏度高, 在临床上有较好的应用前景. 二(4-二甲氨基苯基)甲烷可代替 TMB-过氧化氢-HRP 光度酶联免疫分析体系中的底物 TMB 进行免疫分析.

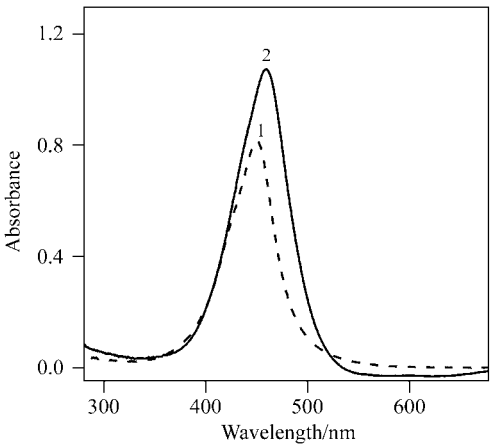


图 6 不同体系的吸收光谱

Figure 6 Absorption spectra of different systems

(1) 20 μmol•L^{-1} TMB-0.108 mmol•L^{-1} H_2O_2-0.15 μg•mL^{-1} HRP; (2) 20 μmol•L^{-1} Tetrabase-0.108 mmol•L^{-1} H_2O_2-1.0 μg•mL^{-1} KI-0.15 μg•mL^{-1} HRP

表 1 季胺的稳定性实验

Table 1 The stability of tetrabase

Day	1	5	10	20	40	60	80	90
A/A_1	1.00	0.99	0.98	0.98	0.97	0.97	0.96	0.95
$\Delta A/\Delta A_1$	1.00	0.99	0.99	0.99	0.98	0.98	0.97	0.97

A_1 和 ΔA_1 分别为第一次测定的吸光度和第一次测定的催化体系与空白吸光度之差.

References

1 Mohanty, J. G. *J. Immunol. Methods* **1997**, *202*, 133.

2 Zhu, M.; Huang, X.-M.; Liu, L.; Shen, H.-X. *Talanta* **1997**, *44*, 1407.

3 Zhou, S.-Y.; Zhang, Z.-J. *Chin. J. Anal. Chem.* **1996**, *24*(8), 877 (in Chinese).
(周四元, 章竹君, 分析化学, **1996**, *24*(8), 877.)

4 Tang, H.-T.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 245.

5 Jiao, K.; Zhang, S.-S.; Wei, L. *Sci. China Ser. B* **1996**, *26*, 57 (in Chinese).
(焦奎, 张书圣, 韦璐, 中国科学 B 辑, **1996**, *26*, 57.)

6 He, Y.-N.; Chen, H.-Y. *Chem. J. Chin. Univ.* **1997**, *18*, 1306 (in Chinese).
(何亚楠, 陈洪渊, 高等学校化学学报, **1997**, *18*, 1306.)

7 Zhang, S.-S.; Chen, H.-Y.; Jiao, K. *Sci. China Ser. B* **1999**, *29*, 83 (in Chinese).
(张书圣, 陈洪渊, 焦奎, 中国科学 B 辑, **1999**, *29*, 83.)

8 Zhang, S.-S.; Jiao, K.; Chen, H.-Y. *Chem. J. Chin. Univ.* **1999**, *20*, 881 (in Chinese).
(张书圣, 焦奎, 陈洪渊, 高等学校化学学报, **1999**, *20*, 881.)

9 Maple, L.; Lathrop, R.; Bozich, S.; Harmana, W.; Tacey, R.; Kelley, M. *J. Immunol. Methods* **2004**, *295*, 169.

10 Metelitza, D. I.; Karasyova, E. I.; Grintsevich, E. E.; Thor-

neley, R. N. F. *J. Inorg. Biochem*. **2004**, *98*(1), 1.

11 Zhou, X.-W.; Hu, X.-Q. *Instrumental Analysis and Experimental Techniques in Biochemistry*, Chemical Industry Press, Beijing, **2003**, pp. 273～285 (in Chinese).
(周先碗, 胡晓倩, 生物化学仪器分析与实验技术, 化学工业出版社, 北京, **2003**, pp. 273～285.)

12 Lü, S.-J.; Chen, Y.-M. *Testing for Immunology*, People's Medical Publishing House, Beijing, **1998**, pp. 119～134 (in Chinese).
(吕世静, 陈育民, 免疫学检验, 人民卫生出版社, 北京, **1998**, pp. 119～134.)

13 Li, J.-G.; Cui, H.-H.; Shi, L.-Y. *Chin. J. Anal. Chem.* **2003**, *31*, 812 (in Chinese).
(李建国, 崔洪华, 史丽颖, 分析化学, **2003**, *31*, 812.)

14 Li, J.-G.; Zhang, M.; Zhao, K. *Spectrosc. Spectr. Anal.* **2004**, *24*, 870 (in Chinese).
(李建国, 张敏, 赵康, 光谱学与光谱分析, **2004**, *24*, 870.)

(A0605222 YANG, X.; ZHENG, G. C.)