

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.09.019

基于木瓜蛋白酶过氧化物酶活性检测谷胱甘肽^①

庞妍娇, 于媛媛, 郑鹤志, 隆异娟

西南大学 化学化工学院, 重庆 400715

摘要:木瓜蛋白酶是新发现的具有过氧化物模拟酶活性的蛋白酶, 它能催化 H_2O_2 氧化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB), 发生蓝色反应, 并在 652 nm 处有吸收峰. 当引入谷胱甘肽(GSH)后, 由于 GSH 消耗 H_2O_2 , 使其在 652 nm 处吸光度降低, 且溶液颜色变浅. 基于此, 设计了一种方便简单、灵敏的比色分析法检测 GSH, 在生物样品检测中具有潜在的应用.

关键词:木瓜蛋白酶; 过氧化物酶; 比色分析; GSH 检测

中图分类号: O657

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)09-0125-06

谷胱甘肽(Glutathione, GSH), 即 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸, 是一种由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸经肽键缩合而成的生物活性三肽, 也是一种广泛存在于生物体内的非蛋白硫醇化合物^[1]. 自然界中谷胱甘肽以还原型(GSH)和氧化型(GSSG)2 种状态存在, 通常所说的谷胱甘肽是指还原型谷胱甘肽. GSH 的主要特点是具有游离的巯基和很强的供电子或质子的能力, 它可以作为水相的抗氧化剂和抗氧化酶的辅因子. 这些结构特点决定了在生物体内发挥重要的生理功能: 细胞内氧化还原活性的维护^[2]、细胞内信号转换^[3]、细胞的代谢^[4]、基因调控^[5]. 同时, GSH 也广泛应用于医药、食品和化妆品行业.

目前, 关于 GSH 的检测方法较多, 如高效液相色谱法^[6]、荧光法^[7]、毛细管电泳法^[8]和电化学检测法^[9]等. 对于 GSH 的检测, 虽然报道的光学生物传感方法大部分比较简单, 有较高灵敏度, 但存在实验步骤繁琐、样品处理耗时等缺点. 近年来, 随着纳米技术的不断发展, 纳米微粒作为模拟酶分析应用的研究引起了广泛关注. 与天然酶相比, 纳米酶具有一些优点: 低成本的可控合成、高的催化活性、能够耐受更苛刻的环境等^[10]. 但是, 这些纳米材料的制备程序和修饰步骤复杂耗时, 且在合成过程中容易团聚, 合成的纳米材料也存在批间差异, 从而使结果重现性低, 本研究发现一种生物催化剂——木瓜蛋白酶具有类似过氧化物酶的性质. 基于此, 开发了一种新型的 GSH 检测方法来满足临床、生物和医疗需求.

木瓜蛋白酶(EC3.4.22.2)是木瓜中含有的一种低特异性蛋白水解酶, 属巯基蛋白酶, 由 212 个氨基酸残基组成的一条肽链, 活性位点为 25 位的半胱氨酸残基和 158 位的组氨酸残基^[11]. 它具有耐高温、稳定性好和蛋白水解能力强等特征, 在食品和医药等领域有广泛的应用. 最近笔者所在研究组发现木瓜蛋白酶具有类似过氧化物酶的性质, 能催化 H_2O_2 氧化过氧化物酶底物并产生特定的颜色反应^[12]. 而本研究发现, GSH 可以抑制木瓜蛋白酶催化 TMB- H_2O_2 显色反应. 基于此现象, 本研究建立了快速简单的方法用来高灵敏和高选择地检测 GSH, 该方法操作简单, 不需要复杂的仪器设备, 并成功用于实际样品中 GSH 的检测.

① 收稿日期: 2016-11-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(21405124).

作者简介: 庞妍娇(1992-), 女, 四川达州人, 硕士研究生, 主要从事发光分析及光学生物传感器的研究.

通信作者: 隆异娟, 高级实验师.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

H_2O_2 (30%)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、葡萄糖、抗坏血酸、氢氧化钠、氯化钠、氯化钾、硫酸镁、硝酸钙、硫酸锌、硫酸铝、硫酸亚铁和硫酸铜购自重庆川东化工有限公司; 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、丙氨酸(Ala)、异亮氨酸(Ile)、酪氨酸(Tyr)、甲硫氨酸(Met)、天门冬氨酸(Asp)、精氨酸(Arg)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、胱氨酸(Cystine)和 GSH 购自上海生工生物工程有限公司; 超滤管(截留分子量为 5 kDa)购自 Sigma-Aldrich 公司; 尿样为西南大学校医院提供; 所有试剂均为分析纯, 可直接使用; 本实验用水均为 Milli-Q-Plus 超纯水系统所制备的超纯水(Millipore, 18.2 M Ω , 美国)。

UV-2450 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); 漩涡混合器(金坛市医疗仪器厂); 高速台式冷冻离心机 LRH-250-Z383K(德国 HERMLE 公司); 电热恒温水浴槽(上海比朗仪器有限公司)。

1.2 GSH 的检测

首先, 配置 10 mmol/L 的 GSH 储备液, 并通过梯度稀释获得不同浓度的 GSH. 再将 200 μL 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 木瓜蛋白酶与不同浓度的 GSH 于 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 然后向混合液中分别加入 6.0 mmol/L TMB, 10 mmol/L H_2O_2 和 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH=5.0) 200 μL , 并加水至终体积为 2 mL; 混合均匀后, 35 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 2 h, 用紫外可见分光光度计测其在 652 nm 的吸光度. 对于实际样品的检测, 先将样品以超滤管 3 000 r/min 离心 30 min, 滤液以超纯水稀释一定倍数, 代替上述的谷胱甘肽标准液, 按同样的方法进行测定。

2 结果与讨论

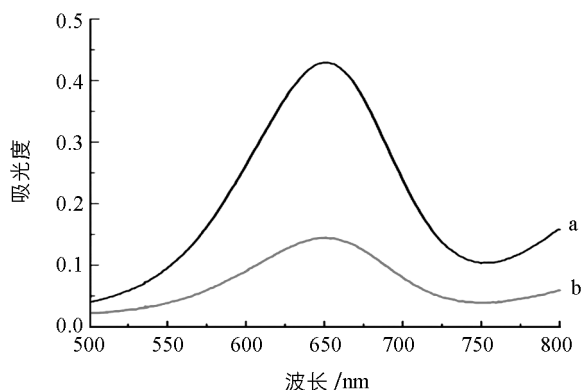
2.1 实验原理

研究发现木瓜蛋白酶具有过氧化物酶活性, 能催化 H_2O_2 氧化过氧化物酶底物 TMB, 产生蓝色反应, 并在 652 nm 处有吸收峰(图 1); 而 GSH 会消耗 H_2O_2 , 导致吸光度值降低且溶液颜色变浅. 基于此, 本研究设计了一种比色分析法检测 GSH, 其检测原理为:



2.2 实验条件优化

实验中优化了 pH 值、温度、 H_2O_2 浓度及 TMB 浓度对检测 GSH 的影响(图 2). 图 2 中纵坐标 $\Delta A = A_0 - A$, 其中 A_0 和 A 分别表示在不加 GSH 和加入 GSH 的吸光度值. 在 1.0~8.0 的范围内优化了 pH 值(图 2(a)): pH 值从 1.0 逐渐增大时, ΔA 也随之增大; 当 pH 进一步增大时, ΔA 逐渐降低. 因此, 5.0 为最佳 pH 值. 在 20~50 $^{\circ}\text{C}$ 范围内优化了最佳温度: 孵育温度在 25~35 $^{\circ}\text{C}$ 之间, ΔA 几乎没有差别; 然而当温度超过 35 $^{\circ}\text{C}$ 时, 随着温度的升高, ΔA 值降低(图 2(b)). 因此, 选择 35 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳反应温度. 当 H_2O_2 浓度在 0.10~1.0 mmol/L 范围内时, ΔA 值随着 H_2O_2 浓度的增大而增大; 在 1.0~8.0 mmol/L 范围内, ΔA 随着浓度的增大而降低, 这是因为较高浓度的 H_2O_2 会抑制木瓜蛋白酶的催化活性(图 3(c)). 因此, 选择 1.0 mmol/L H_2O_2 浓度为最佳测定条件. 在 0.10~1.0 mmol/L 范围内优化了 TMB 浓度(图 2(d)), 当

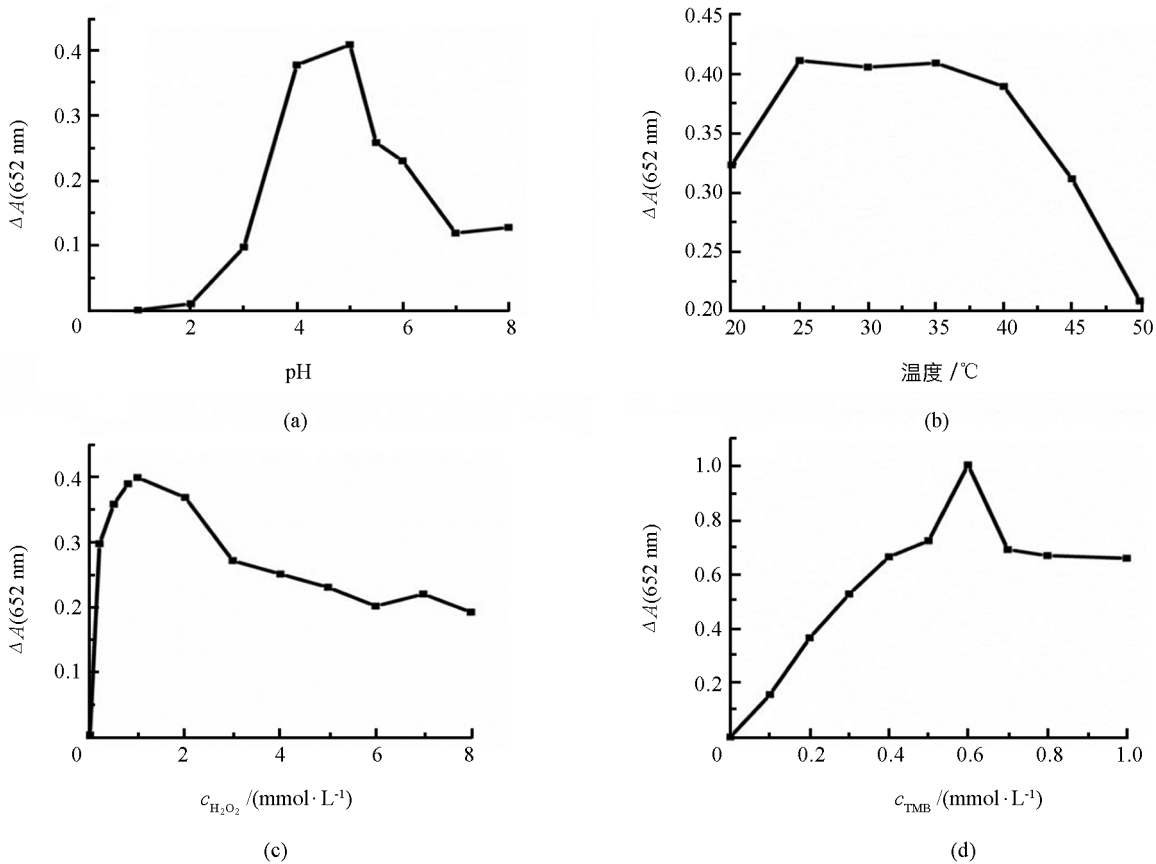


a 为不加 GSH; b 为加入 GSH.

木瓜蛋白酶: 0.1 mg/L, GSH: 5.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$, pH=5.5, H_2O_2 浓度: 1.0 mmol/L, TMB 浓度: 0.50 mmol/L, 孵育时间: 2 h, 孵育温度: 35 $^{\circ}\text{C}$.

图 1 不加或加入 GSH 后木瓜蛋白酶-TMB- H_2O_2 显色体系的吸收光谱图

TMB 浓度为 0.60 mmol/L 时, ΔA 值达到最大, 因此选择 TMB 浓度为 0.60 mmol/L.



a 为不加 GSH; b 为加入 GSH.
木瓜蛋白酶: 100 mg/L, GSH: 5.0 $\mu\text{mol/L}$, pH=5.0, H_2O_2 浓度: 1.0 mmol/L,
TMB 浓度: 0.60 mmol/L, 孵育时间: 2 h, 孵育温度: 35 $^{\circ}\text{C}$.

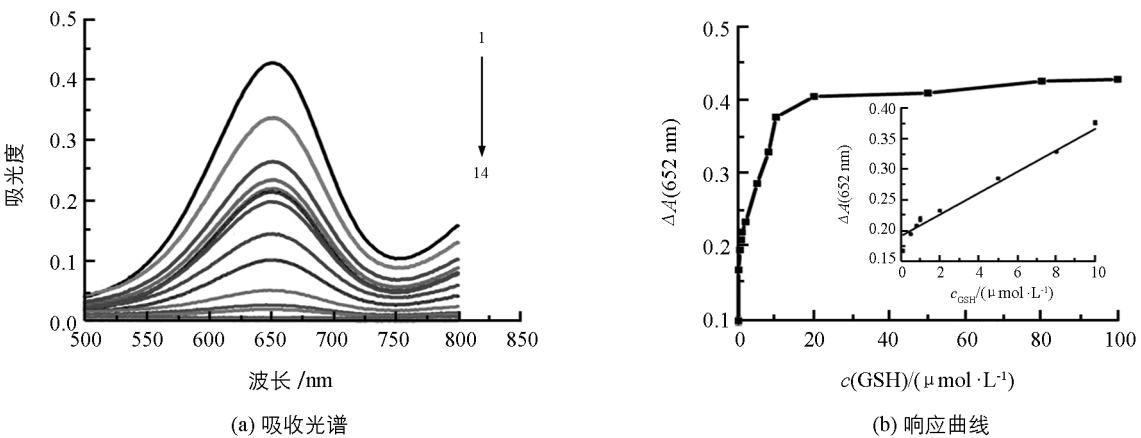
图 2 pH 值、温度、 H_2O_2 浓度和 TMB 浓度优化

2.3 GSH 的检测

在最佳的实验条件下, 将不同浓度的 GSH 加入反应体系中, 通过检测木瓜蛋白酶-TMB- H_2O_2 反应体系在 652 nm 的吸光度, 实现对 GSH 的检测. 对应光谱图和标准曲线(图 3), 在 0.10~10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, GSH 浓度与吸光度具有良好的线性关系, 其线性方程为 $\Delta A=0.0176c+0.1909$, 相关系数为 0.9912, 检出限为 0.03 $\mu\text{mol/L}$. 与其他方法比较(表 1), 本方法具有较高的灵敏度. 此外, 本实验不需要合成纳米材料, 也不需要复杂的仪器设备, 且操作过程简单, 表明该方法在生物技术、生物分析及生物医学上有潜在应用.

表 1 不同方法检测 GSH 的比较

分析方法	LOD/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	线性范围/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	文献来源
CdTe QDs-Hg(II)-荧光法	0.1	0.6~20	[13]
CdSe/ZnS-荧光法	0.6	5~250	[14]
PEI-capped AgNCs-荧光法	0.38	0.5~6	[15]
DNA-Ag NCs-荧光法	0.004	0.008~0.1	[16]
碳点-比色法	0.3	0~7	[17]
BSA-MnO ₂ NPs-比色法	0.1	0.26~26	[18]
HPLC-CL 法	0.5	0.75~10	[19]
TMB and H_2O_2 -比色法	0.03	0.1~10	本研究

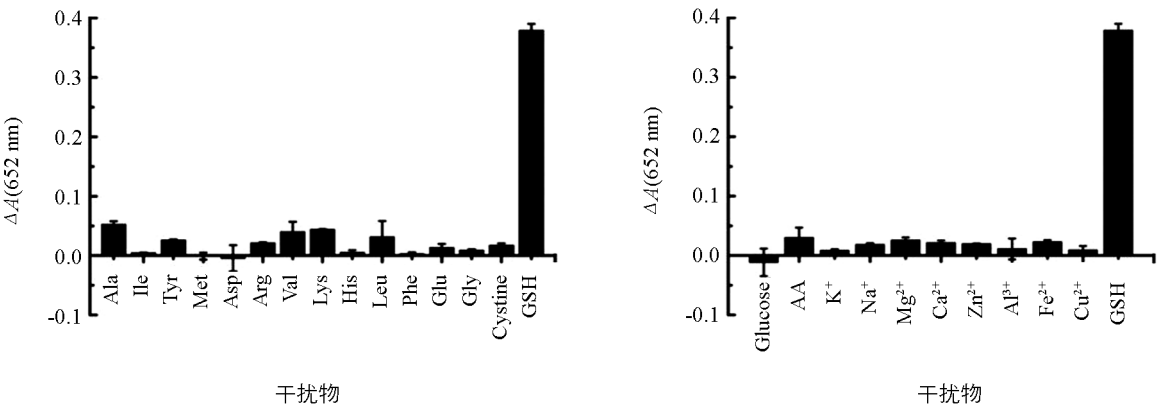


1—14 的 GSH 浓度分别为 0,0.05,0.1,0.5,0.8,1,2,5,8,10,20,50,100 $\mu\text{mol/L}$.
右插图为检测 GSH 的标准曲线,误差线为平行测定 3 次的标准误差.

图 3 不同浓度的 GSH 存在下,木瓜蛋白酶-TMB- H_2O_2 显色体系的吸收光谱图和检测 GSH 的响应曲线

2.4 方法选择性

为了考察该方法的选择性,向木瓜蛋白酶-TMB- H_2O_2 显色体系中分别加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 的葡萄糖、抗坏血酸、14 种氨基酸(丙氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、天门冬氨酸、精氨酸、缬氨酸、赖氨酸、组氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、甘氨酸、胱氨酸)、8 种金属离子(K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+})等常见的干扰物,并在上述最佳条件下,测其在 652 nm 的吸光度(图 4). 结果显示,同浓度的干扰物质均对显色体系无明显影响,表明本方法对 GSH 有很高的选择性.



GSH 和其他干扰物的浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$. 误差线为平行测定 3 次的标准误差.

图 4 木瓜蛋白酶-TMB 对 GSH 的选择性检测

2.5 生物样品分析

为了证实该方法在实际应用中的可行性,检测了人尿液样品中 GSH 的含量. 将尿液样品超滤处理后,并稀释至一定倍数,采用标准加入法进行检测,所得回收率为 97%~109.4%,结果列于表 2 中. 表明该方法能够成功用于实际样品中 GSH 的分析检测.

表 2 检测尿样中 GSH 的含量

样品	GSH 的浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		回收率/ %	平均标准偏差($n=3$; %)
	加入量	检测量		
尿样 1	1.0	0.97 ± 0.02	97.0	2.40
尿样 2	5.0	5.47 ± 0.11	109.4	11.28

3 结 论

基于木瓜蛋白酶的过氧化物酶活性设计了一种简便、灵敏地检测 GSH 浓度的比色分析法. 木瓜蛋白酶可以催化 H_2O_2 氧化 TMB 产生蓝色反应, 并在 652 nm 处有吸收峰; 而当加入 GSH 后, 由于 GSH 会消耗 H_2O_2 , 导致在 652 nm 处的吸收峰强度降低. GSH 检测的线性范围为 $0.10 \sim 10 \mu\text{mol/L}$, 检出限为 $0.03 \mu\text{mol/L}$. 该方法具有灵敏、简单、成本低廉且选择性良好的优点, 可用于实际样品的检测.

参考文献:

- [1] NI P, SUN Y, DAI H, et al. Highly Sensitive and Selective Colorimetric Detection of Glutathione Based on Ag [J] ion-3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 63: 47—52.
- [2] KRAUTH-SIEGEL R L, BAUER H, SCHIRMER R H. Dithiol Proteins as Guardians of the Intracellular Redox Milieu in Parasites: Old and New Drug Targets in Trypanosomes and Malaria-Causing Plasmodia [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(5): 690—715.
- [3] LI M, WU X, WANG Y, et al. A Near-Infrared Colorimetric Fluorescent Chemodosimeter for the Detection of Glutathione in Living Cells [J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(14): 1751—1753.
- [4] SCHIRMER R H, MÜLLER J G, KRAUTH-SIEGEL R L. Disulfide-Reductase Inhibitors as Chemotherapeutic Agents: The Design of Drugs for Trypanosomiasis and Malaria [J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1995, 34(2): 141—154.
- [5] SHI Y, PAN Y, ZHANG H, et al. A Dual-Mode Nanosensor Based on Carbon Quantum Dots and Gold Nanoparticles for Discriminative Detection of Glutathione in Human Plasma [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 56: 39—45.
- [6] BAYRAM B, RIMBACH G, FRANK J, et al. Rapid Method for Glutathione Quantitation Using High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Electrochemical Detection [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 62(2): 402—408.
- [7] GAO X, LI X, LI L, et al. A Simple Fluorescent Off-On Probe for the Discrimination of Cysteine from Glutathione [J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(45): 9388—9390.
- [8] TSARDAKA E C, ZACHARIS C K, TZANAVARAS P D, et al. Determination of Glutathione in Baker's Yeast by Capillary Electrophoresis Using Methyl Propiolate as Derivatizing Reagent [J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1300: 204—208.
- [9] MIAO P, LIU L, NIE Y, et al. An Electrochemical Sensing Strategy for Ultrasensitive Detection of Glutathione by Using Two Gold Electrodes and Two Complementary Oligonucleotides [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(11): 3347—3351.
- [10] 徐秀芳. 纳米材料模拟酶及其分析应用 [D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [11] KAUL P, SATHISH H A, PRAKASH V. Effect of Metal Ions on the Structure and Activity of Papain from Carica Papaya [J]. *Nahrung/Food*, 2002, 46(1): 2—6.
- [12] 于缓缓. 木瓜蛋白酶过氧化物模拟酶性质及其分析应用 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
- [13] HAN B, YUAN J, WANG E. Sensitive and Selective Sensor for Biothiols in the Cell Based on the Recovered Fluorescence of the CdTe Quantum Dots? Hg (II) system [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(13): 5569—5573.
- [14] LIU J, BAO C, ZHONG X, et al. Highly Selective Detection of Glutathione Using A quantum-Dot-Based OFF-ON Fluorescent Probe [J]. *Chemical Communications*, 2010, 46(17): 2971—2973.
- [15] ZHANG N, QU F, LUO H Q, et al. Sensitive and Selective Detection of Biothiols Based on Target-Induced Agglomeration of Silver Nanoclusters [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 42: 214—218.
- [16] HUANG Z, PU F, LIN Y, et al. Modulating DNA-Templated Silver Nanoclusters for Fluorescence Turn-On Detection of Thiol Compounds [J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(12): 3487—3489.
- [17] SHAMSIPUR M, SAFAVI A, MOHAMMADPOUR Z. Indirect Colorimetric Detection of Glutathione Based on Its

Radical Restoration Ability Using Carbon Nanodots as Nanozymes [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 199: 463–469.

[18] CHEN X Q, KO S K, KIM M J, et al. A Thiol-Specific Fluorescent Probe and Its Application for Bioimaging [J]. *Chemical Communications*, 2010, 46(16): 2751–2753.

[19] MCDERMOTT G P, FRANCIS P S, HOLT K J, et al. Determination of Intracellular Glutathione and Glutathione Disulfide Using High Performance Liquid Chromatography with Acidic Potassium Permanganate Chemiluminescence Detection [J]. *Analyst*, 2011, 136(12): 2578–2585.

Colorimetric Detection of Glutathione Based on Peroxidase-Like Activity of Papain

PANG Yan-jiao, YU Yuan-yuan, ZHENG Hu-zhi, LONG Yi-juan

School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Papain, a newly discovered proteinase, possesses peroxidase enzyme activity, which can catalyze the oxidation of the peroxidase substrate 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) in the presence of H_2O_2 to the oxidized TMB to induce a blue colored reaction with a typical absorption peak centered at 652 nm. However, GSH can consume H_2O_2 , which results in a fading of the blue color of the reaction system and a decrease of the absorbance. Accordingly, GSH can be detected by measuring the wastage of H_2O_2 . Based on this approach, a facile, sensitive and selective colorimetric assay has been developed to detect GSH, with a promising application in biological fluids.

Key words: papain; peroxidase-like activity; colorimetric analysis; GSH detection

责任编辑 潘春燕

