

SOD酶生物传感器筛选清除超氧阴离子自由基的活性物

冉良骥¹, 吕太平^{1*}, 乔小蓉²

(四川大学 1. 华西药学院, 2. 分析测试中心, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 制备超氧化物歧化酶传感器, 建立清除氧自由基药物的体外筛选方法。方法 将固定化铜锌超氧化物歧化酶与光纤氧传感器通过特定装置组装为酶传感器。以邻苯三酚的自氧化作为超氧阴离子的发生源, 预置的固定化酶响应为内标, 以已知有氧自由基清除作用的 Vit C 为阳性对照, 验证测定方法; 通过对比加入样品前后邻苯三酚自氧化速度的变化情况考察样品清除超氧阴离子自由基能力。结果 酶传感器检测限为 7.0 U, 使用寿命大于 2 周。以本传感器对 15 种样品进行了体外清除氧自由基活性实验, 分别验证和发现了部分样品的清除活性。结论 所研制的传感器信号稳定性较好, 测定方法简便、快速, 能直观地获得氧自由基清除的动力学信息, 可用于大量药物的体外初筛实验。

关键词: 超氧化物歧化酶; 光纤氧传感器; 生物传感器; 超氧阴离子

中图分类号: R917; TQ460.72 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2004)06-0453-05

Superoxide dismutase biosensor for screening substances possessing scavenging superoxide anion activity

RAN Liang-ji¹, LI Tai-ping^{1*}, QIAO Xiao-rong²

(1. West China School of Pharmacy, 2. Research Center of Analysis, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Aim** To establish a method for screening active substance with scavenging effects on superoxide anion *in vitro* by designed superoxide dismutase biosensor. **Methods** The enzyme sensor was built by connecting the immobilized CuZnSOD with optical oxygen sensor through a special way. Superoxide anions were generated by auto-oxidation of pyrogallol. The auto-oxidation speed was examined before and after adding samples into the system, and the Vit C having the scavenging radical activities was served as a positive control. **Results** The limit of biosensor detection was 7.0 U in activity, and lifetime of the immobilized enzyme in the reaction-cell was above 2 weeks. The scavenging effects on superoxide radicals of fifteen active substance were studied *in vitro* by the sensor, and some of them presented scavenging activities. **Conclusion** The signal from biosensor is stable, easy to be determined, and the kinetic information on scavenging superoxide radicals could be obtained directly. The biosensor system can be used for screening drugs simply and rapidly.

Key words: superoxide dismutase; optical fiber oxygen sensor; biosensor; superoxide anion

超氧阴离子自由基不仅有重要的生物功能,而且和多种疾病密切相关^[1],故在自由基生物学研究中具有特别重要意义。目前,对于物质清除氧自由

基的研究,主要采用电子顺磁共振波谱法^[2]、化学发光法^[3]、单扫描示波极谱法^[4]等。本课题采用自制的 SOD 酶生物传感器为检测手段,通过邻苯三酚自氧化体系产生超氧阴离子,以光纤氧传感系统监测其浓度变化,以固定化 SOD 酶为内标,建立了一套简便的测定超氧阴离子自由基的方法,并将其用于超氧阴离子自由基清除剂的体外筛选。

收稿日期: 2003-06-25.

* 通讯作者 Tel: 86-28-85501396,

E-mail: ltaiping@sohu.com

材料和方法

仪器与试剂 RF-5000 荧光分光光度计(日本岛津公司);双臂石英光纤束(光纤束随机分布,北京玻璃研究院加工);荧光猝灭型光纤氧传感器(自制)^[5]。

铜锌超氧化物歧化酶(CuZnSOD酶, 3 500 U·mg⁻¹, 华东理工大学), 牛血清白蛋白(上海长阳生化制药厂), 壳聚糖粉(上海伯奥生物科技有限公司, 脱乙酰度 > 90%), Vit C、香草醛和亚硒酸(均为分析纯); 对照品(中国药品生物制品检定所): 没食子酸, 咖啡酸, 肉桂酸; 注射剂: 参麦注射液(华西医科大学制药厂, 10 mL/支, 批号: 021003)、参附注射液(雅安三九药业, 10 mL/支, 批号: 021205)、香丹注射液(雅安三九药业, 10 mL/支, 批号: 021202)、血塞通注射液(云南植物药业有限公司, 10 mL/支, 批号: 021107)、清开灵注射液(山西太行药业, 10 mL/支, 批号: 20021221)、阿魏酸钠(西南药业, 0.1 g/瓶, 批号: 20011207)、注射用还原型谷胱甘肽(重庆药友制药, 0.6 g/瓶, 批号: 020701); 药材提取物(自制): 丹参提取物(黄色干粉, 总丹酚酸含量 > 90%), 红景天提取物(红色干浸膏)。

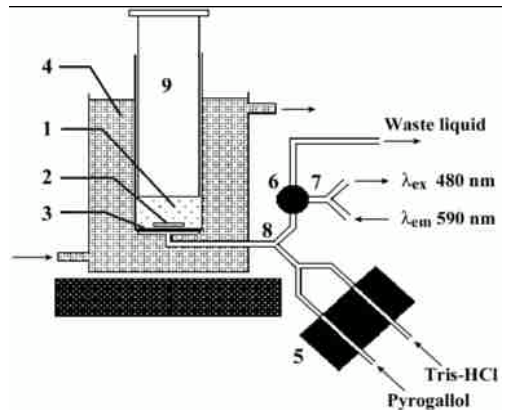
CuZnSOD酶的固定化 取壳聚糖粉末2.00 g, 加入戊二醛溶液 25 mL, 在室温下搅拌 3 h后, 置于 4 °C下放置过夜, 抽滤, 用 pH 7.0 磷酸盐缓冲液 50 mL 分 5 次洗涤, 得到淡黄色活化的壳聚糖粉末; 取活化后的壳聚糖粉末 0.50 g, 加入 SOD 酶液 10 mL, 在室温下搅拌 1.5 h, 置于 4 °C下放置过夜; 吸除少量上清酶液, 抽滤, 用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 50 mL 分 5 次洗涤, 即得到固定化 SOD 酶壳聚糖粉末, 置于 4 °C下保存待用。另取活化的壳聚糖粉末 0.50 g, 加入牛血清白蛋白液 10 mL, 同法可得到空白壳聚糖粉。

CuZnSOD 酶活力测定 采用以 Vit C 为终止剂, 邻苯三酚自氧化比色法^[6]进行测定。

酶传感器装置的设计 本传感器是基于溶解氧对基础氧传感器中敏感膜上荧光物质(激发波长 480 nm, 发射波长 590 nm)的猝灭而建立的, 为了充分发挥固定化酶和氧传感器的原有性能, 组装后的酶传感器必须同时符合固定化酶反应及溶解氧测定的一般要求, 具体的偶联设计方案如图 1 所示。

邻苯三酚自氧化曲线的制备 以室温下空气饱和的水配制的邻苯三酚溶液(1 mmol·L⁻¹)和 Tris-HCl 溶液(0.1 mol·L⁻¹, pH 8.6)在 25 °C的水浴中恒温 20 min 后, 由蠕动泵同时泵入流通池; 当荧光信

号稳定后, 停泵, 并进行荧光时间扫描, 即可得到邻苯三酚自氧化 F-t 曲线(图 2a)。

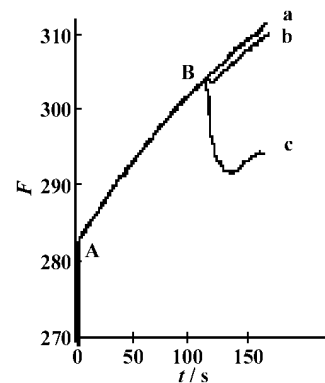


1: Immobilized CuZnSOD powder; 2: Stirrer; 3: Filter; 4: Water bath; 5: Squirm pump; 6: Cell of oxygen sensor; 7: Optical fiber; 8: T-pipe; 9: Plunger

Figure 1 Schematic diagram of SOD biosensor

空白壳聚糖响应曲线的制备 用空气饱和和水冲洗管道; 将邻苯三酚溶液(1 mmol·L⁻¹)和 Tris-HCl 溶液(0.1 mol·L⁻¹, pH 8.6)由蠕动泵同时通入含有空白壳聚糖粉末, 且已排除空气的酶反应器中, 并打开电磁搅拌器, 计时 30 s 后, 停泵, 将反应器中部分反应液压入流通池, 进行时间扫描, 计时 2 min 后, 将反应器中剩下的溶液压入流通池, 计时 1 min 后, 结束时间扫描, 即可得到酶传感器的 F-t 空白曲线(图 2b)。

酶传感器响应曲线的制备 在反应器中改为加入固定化超氧化物歧化酶, 重复以上两步, 即可得到酶传感器的响应曲线(图 2c)。



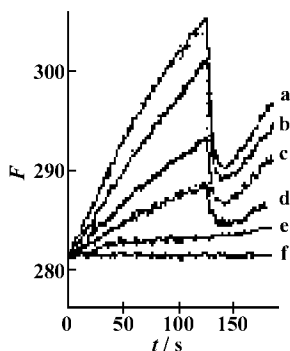
a: Plot for auto-oxidation of pyrogallol; b: Plot of blank enzyme biosensor; c: Response plot of enzyme biosensor; AB: Overlap of three plots

Figure 2 F-t plot

清除超氧阴离子自由基药物筛选方法的建立 Vit C(抗坏血酸)是自由基清除剂, 与超氧阴离子自由基的作用机理已十分明确^[1], 本文以邻苯三酚的

自氧化作为超氧阴离子的发生源,酶传感器中预置的固定化铜锌超氧化物歧化酶的响应作为内标,以 Vit C 作为阳性对照物,利用自行设计的 SOD 酶传感器绘制 $F-t$ 曲线,通过比较加入 Vit C 前后邻苯三酚的自氧化速度(即耗氧速度)的变化,获得以下信息: Vit C 清除 O_2^- 能力(SOD 酶样活性)的大小和 Vit C 对固定化的超氧化物歧化酶活性的影响。检测流程为:将 Tris-HCl 缓冲液直接泵入流通池,当荧光信号稳定后,停泵并进行荧光-时间扫描,得空白响应曲线(图 3f)。以 Tris-HCl 配制 Vit C 溶液($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),直接泵入流通池,当荧光信号稳定后,停泵并进行荧光-时间扫描,可得到 Vit C($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的自氧化曲线(图 3e)。依次用缓冲液和空气饱和和水冲洗管道;分别将 Tris-HCl 缓冲液和含有不同浓度 Vit C 的邻苯三酚混合溶液泵入酶反应系统,按“空白壳聚糖响应曲线的制备”项下“计时 30 s 后……”操作,可得到不同浓度 Vit C 存在时的传感器响应曲线,见图 3a~d。

按照上述相同的方法操作,分别绘制其他待测样品相应的空白 $F-t$ 曲线、自氧化 $F-t$ 曲线、含样品和不含样品的响应曲线,按照上述量化方法进行测定(各样品均为临时配制;若信号不明显,则加大浓度测定)。



a: No Vit C; b: $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; c: $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; d: $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; e: Auto-oxidation curve of Vit C ($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); f: Blank curve

Figure 3 Response curve for various concentration of Vit C

结果与讨论

1 酶传感器 $F-t$ 曲线制备

测定过程中超氧阴离子、氧和荧光的关系为:①邻苯三酚耗氧→总氧浓度逐渐减少→荧光强度逐渐增加。② $[O_2^-] \propto$ 邻苯三酚耗氧速度 $\propto F-t$ 曲线斜率。③加入 SOD 酶或氧自由基清除剂→ $[O_2^-]$ 减小→ $F-t$ 曲线斜率减小。

对比图 2 中 3 条曲线,可证明:①在 02 min 内,3 条曲线均呈现逐步上升的趋势,这是由于停泵后,流通池内溶液中的邻苯三酚不断发生自氧化,导致敏感膜的荧光信号逐渐增强;同时对比中还可发现各曲线 AB 段斜率基本一致,证明流通池中邻苯三酚的反应速度与是否偶联反应器及反应器中所加物质无关,在静止条件下,两部分溶液不会产生相互影响。②2 min 时,当反应器中的溶液泵入流通池后,曲线 b 上出现一个较小的脉冲,而曲线 c 荧光信号则出现了大幅度下降。根据实验经验,b 的变化主要是由于流速突然变化造成,随后曲线斜率未变,说明空白壳聚糖粉末对邻苯三酚的自氧化无明显影响,而 c 表明,此时在反应器中与固定化 SOD 酶接触了 2 min 后的溶液,含氧量高于流通池中原有的溶液,由于在反应器和流通池中,邻苯三酚的自氧化是同时进行的,且 pH、邻苯三酚浓度、溶液含氧量等条件完全一致,所以此时邻苯三酚在反应器中自氧化耗氧速度低于流通池,说明壳聚糖固定化的 SOD 酶,发挥了歧化抑制作用,并能被氧传感器检测。③2 min 后,曲线 b、c 均以原有的斜率向上延伸,证明反应器中的固定化酶已与溶液分离,对流通池中溶液不再产生影响,邻苯三酚以原有的自氧化速度继续进行反应。

2 谱图的量化

由以上各 $F-t$ 图谱中,也可间接反映溶液(流通池中)中超氧阴离子的浓度。通过对图谱中曲线斜率进行量化,可对实验结果进行比较,并为进一步建立超氧阴离子的检测方法奠定基础。图 4 曲线 CFGH 为无样品参与时的响应曲线,曲线 CJKL 为加入样品后的响应曲线。D 为 120 s 处。

曲线 CF 斜率: $k_0 = (OA - OC) / OD$ (邻苯三酚自氧化速率和超氧阴离子浓度水平)

曲线 CG 斜率: $k_1 = (OB - OC) / OE$ (加入 SOD 酶后,邻苯三酚自氧化速率和超氧阴离子浓度水平)

曲线 CJ 斜率: $k_0' = (OM - OC) / OD$ (Vit C 存在下,邻苯三酚的自氧化速率和超氧阴离子浓度水平)

曲线 CK 斜率: $k_1' = (ON - OC) / OE$ (Vit C 或样品溶液和 SOD 酶共存时,邻苯三酚自氧化速率和超氧阴离子浓度水平)

SOD 酶对邻苯三酚自氧化反应的抑制率: $I = (k_0 - k_1) / k_0 \times 100\%$

加入样品(如 Vit C)对邻苯三酚自氧化的抑制率(反映样品溶液清除超氧阴离子活力大小): $I_1 =$

$$(k_0 - k'_0) / k_0 \times 100\%$$

样品与 SOD 酶共存时对邻苯三酚自氧化的抑制率: $I' = (k_0 - k'_1) / k_0 \times 100\%$

SOD 酶抑制率的变化(反映酶活力的变化): $\Delta I = I' - I$

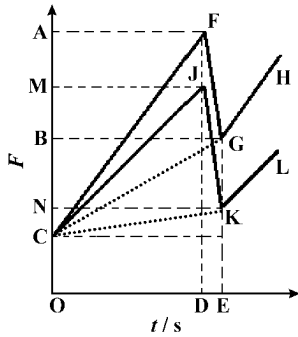


Figure 4 Quantification of response plot

3 清除超氧阴离子自由基药物筛选方法的建立

由图 3 可看出: ① 对比 Vit C 自氧化曲线(图 3e)和空白时间扫描曲线(图 3f), 可观察到单纯 Vit C 在本测定系统中(为碱性环境)有一定的耗氧作用。② 对比曲线 a 和 d, 发现邻苯三酚自氧化体系中加入 Vit C(浓度同曲线 e)后, 曲线斜率并未因二者共同耗氧进一步增加, 反而有所降低, 说明 Vit C 对邻苯三酚的自氧化抑制作用较自身耗氧作用更为明显, Vit C 在本系统中主要作为超氧阴离子自由基的清除剂, 而非抗氧化剂。③ 随着 Vit C 加入量的增大, 对邻苯三酚自氧化的抑制率相应增加; 当 Vit C 与固定化酶共存时, 对邻苯三酚自氧化的抑制率 I' 较其单独作用邻苯三酚的抑制率 I 有所增加 ($\Delta I > 0$), 说明 Vit C 在 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 能与 SOD 酶协同抑制邻苯三酚产生的超氧阴离子。

4 酶传感器测定条件的考察

分别固定其他条件, 依次改变邻苯三酚浓度、溶液 pH、溶液温度和固定化酶的加入量, 测定相应的酶传感器响应曲线, 计算 k_0 , k_1 和 I 值, 结果发现: 邻苯三酚耗氧速度 (k_0) 与邻苯三酚浓度、溶液 pH 值、温度成正性相关, 邻苯三酚浓度增加, 使检测灵敏度有所提高, 但超氧化物歧化酶对邻苯三酚自氧化抑制率 (I) 却有所下降, 固定化酶粉量则与超氧化物歧化酶的抑制率 (I) 呈正性相关, 综合试验结果, 确定邻苯三酚浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 溶液 pH 值为 8.6, 反应温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 酶的加入量为 0.5 g 。

5 酶传感器的性能考察

5.1 精密度测定 在优化的条件下测定精密度。 k_0 , k_1 和 I 日内精密度 ($n=5$) 分别为 2.20%, 4.14% 和 1.27%; 日间精密度 ($n=7$) 分别为 3.79%, 5.64% 和 1.35%。

5.2 检测限(以固定化 SOD 酶的活力表示) 在优化的条件下, 当固定化酶粉加入量为 0.05 g 时(即 7.0 U), 测得的响应曲线在 2 min 时, 荧光信号下降值约为空白曲线在此处产生的脉冲的 3 倍, 故本传感器检测限为 7.0 U 。

5.3 使用寿命 在优化的条件下, 在 1 个月内, 连续使用同一固定化酶粉进行测定, 考察固定化酶对反应的抑制率 I 值的变化。结果发现, 固定化酶粉活力在使用 2 周后开始逐渐下降。

6 超氧阴离子检测方法的日内精密度考察

在同一工作日内, 连续 5 次测定含 Vit C 高、中、低 3 种不同浓度 ($0.5, 2$ 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的邻苯三酚溶液的响应曲线, 并按上述量化方法计算 I , RSD 分别为 1.6%, 1.0% 和 1.6%, 说明 Vit C 的各种浓度下测得的抑制率都有较好的重现性。

7 清除超氧阴离子自由基活性物的筛选

由表 1 可知, 对超氧阴离子有清除作用的样品有(分别按清除能力 I_1 排序): Vit C、谷胱甘肽、香草醛、亚硒酸、阿魏酸钠; 参麦注射液、参附注射液; 丹参提取物、红景天提取物。以上各物质均可与 SOD 酶共同作用于超氧阴离子自由基 ($\Delta I > 0$)。

Table 1 Quantification of the samples' signals (ordered with I_1)

Sample	I_1	ΔI	$\frac{\Delta F}{3 \text{ min}}$
Vitamin C ($1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	70.1	26.2	2
Estathion ($1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	63.9	23.7	2.1
Vanillin ($1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	43.4	20.5	2.2
Cinnamyllic acid ($1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	42.2	13.5	2.5
Selenous acid ($1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	37.5	18.5	0
Sodium ferulate ($1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	31.4	5.8	4
Caffeic acid ($1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	-18.4	-10.3	4.2
Acid pyrogallol ($1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	-15.4	-28.8	7.8
Shen Mai injection ($10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)	43.9	11.7	2.5
Shen Fu injection ($10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)	35.9	12.1	3.5
Qing Kai Ling injection ($10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.0	0.0	0
Xue Sai Tong injection ($10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.0	0.0	0
Xiang Dan injection ($10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)	-20.2	-14.2	5.2
Extrac of <i>Saltia miltiorrhiza</i> ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)	25.7	16.8	3.2
Extrac of <i>Rhodiola rosea</i> ($100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)	25.5	9.5	3.4

$\Delta F/3 \text{ min}$: Change of fluorescence in 3 min on auto oxidation curve

在实验中发现, 自氧化速度最快的样品如没食

子酸、香丹注射液、咖啡酸均未测到有明显的清除自由基活性,而且出现了负抑制率(其 I_1 分别为 -15.4, -20.2 和 -18.4) 的现象。由于本实验所采用的氧传感装置是以氧浓度为信号进行间接的测定,若样品自身在此实验条件下较不稳定,有较强的还原作用,可能会掩盖样品清除超氧阴离子自由基的信号。

考察各具有较强氧自由基清除活性样品的化学结构,发现其分子中多存在酚羟基、双键等还原性结构,推测这些基团可能是与超氧阴离子作用的主要活性部位。

体外实验具有简便、高效、直观等优点,对大量微量化合物清除超氧阴离子自由基的活性进行初筛,本法具有突出的优越性。本课题通过自制的超氧化物歧化酶传感器建立了清除超氧阴离子自由基药物的体外筛选方法,反应器中采用悬浮酶粉,使底物与酶反应更充分,同时也便于仪器的拆卸和酶粉的更换;传感器性能考察表明,信号稳定性较好,初步用于有关样品的测定,尚未见类似报道。

References :

- [1] Fang YZ, Li WJ. *Free Radical and Enzyme — Basic Theories and Applications in Biology and Medicine* (自由基与酶基础理论及其在生物学和医学中的应用) [M]. Beijing: Science Press, 1989. 147 - 162.
- [2] Xu YK, Chen ZW, Sun J. Synthesis and esr study of a novel phosphorylated lipophilic spin trap [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2002, **23**(2): 333 - 335.
- [3] Liu H, Yang XL, Zhou LZ, et al. Study on effects of scutellarin on scavenging reactive oxygen [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, **25**(7): 491 - 493.
- [4] Yuan ZB, Ma ZR. Studied on the scavenging effect of *Rhodiola rosea* L. and *Radix Alviae Miltiorrhizae* on O_2^- and $\cdot OH$ by electrochemistry method [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 1999, **27**(6): 626 - 630.
- [5] Ran LJ, Lü TP, Xiang SX. Optical oxygen sensor based on a sol-gel encapsulation method [J]. *J Sichuan Univ* (Med Sci Ed) (四川大学学报医学版), 2003, **34**(2): 337 - 340.
- [6] Jing TY, Zhao XY. The improved pyrogallol method by using terminating agent for superoxide dismutase measurement [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1995, **22**(1): 84 - 86.
- [7] Fang YZ, Li WJ. *Free Radical and Enzyme — Basic Theories and Applications in Biology and Medicine* (自由基与酶基础理论及其在生物学和医学中的应用) [M]. Beijing: Science Press, 1989. 159.