

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2014.09.014

基于过氧化物模拟酶催化显色反应的博来霉素比色检测

芦珊¹, 杨媚², 王海燕³, 曹亚^{2*}, 殷咏梅^{1*}

(1. 南京医科大学 第一附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210029; 2. 上海大学 生命科学学院 生物传感实验室, 上海 200444; 3. 南京大学 生物化学系, 江苏 南京 210093)

摘要:首次报道了博来霉素(BLM)与亚铁离子相结合,形成的BLM·Fe(II)复合物具有内在的过氧化物模拟酶催化活性,能够催化过氧化氢氧化2,2'-联氨基-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)的显色反应,产生深绿色的产物。与天然酶辣根过氧化物酶类似,BLM·Fe(II)复合物的催化活性强烈依赖于pH值和温度,相应的最优化条件分别为pH 6.0和30℃。利用BLM·Fe(II)复合物催化ABTS的显色反应,建立了一种简便快捷的可视化检测博来霉素的新方法,检出限可达14.1 nmol/L。该检测方法还显示了良好的可重复性和选择性,在临床分析中具有潜在的应用价值。

关键词:博来霉素;过氧化物模拟酶;紫外-可见吸收光谱;比色检测

中图分类号: O657.72; R978.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2014)09-1068-05

Bleomycin·Fe(II) Complex with Intrinsic Peroxidase-like Activity for Colorimetric Detection of Bleomycin

LU Shan¹, YANG Mei², WANG Hai-yan³, CAO Ya^{2*}, YIN Yong-mei^{1*}

(1. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Laboratory of Biosensing Technology, School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 3. Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Bleomycins (BLMs), a family of glycopeptide-derived antibiotics, are widely used as available chemotherapeutic agents against a variety of cancers. In the presence of Fe(II) ions, BLM form a binary BLM·Fe(II) complex that can activate molecular oxygen. Herein, it is demonstrate for the first time that BLM·Fe(II) complex may possess an intrinsic peroxidase-like activity and could catalyze 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) into colored product in the presence of hydrogen peroxide. Experimental results revealed that the catalytic activity of BLM·Fe(II) complex is strongly dependent on pH value and temperature, which is similar to natural enzymes such as horseradish peroxidase. The conditions for maximum catalytic efficiency were determined to be pH 6.0 and 30℃. Taking advantage of the color reaction of ABTS catalyzed by BLM·Fe(II) complex, a simple and rapid colorimetric method for the detection of BLM was thus established. Under the optimal conditions, a good linear relationship was obtained over BLM concentration in the range of 0.1-2.5 μmol/L with a detection limit of 14.1 nmol/L. With the advantages of good reproducibility and high selectivity, the method is anticipated to have a practical potential for BLM analysis in clinical applications.

Key words: bleomycin; peroxidase mimetic; UV-Vis spectrum; colorimetric detection

癌症是当前严重威胁人类生命和健康的主要疾病之一,发病率呈逐年上升趋势^[1]。博来霉素(Bleomycin, BLM)是一类由日本科学家 Umezawa 等于1966年首次分离得到的糖肽类抗肿瘤抗生素^[2],能够与低价态的氧化还原金属离子(如Fe(II)离子)结合形成博来霉素金属复合物(BLM·Fe(II)复合

收稿日期: 2014-04-22; 修回日期: 2014-05-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(81172503)

* 通讯作者: 殷咏梅, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤诊断和治疗, Tel: 025-83710040, E-mail: ym.yin@hotmail.com
曹亚, 硕士, 实验师, 研究方向: 生化分析与生物传感, Tel: 021-66138133, E-mail: conezimint@shu.edu.cn

物), 并在有氧条件下介导 DNA 链的选择性断裂, 从而阻断 DNA 复制转录等正常代谢过程, 引起细胞的死亡^[3-4]。基于上述机理, 博来霉素被广泛应用于肺癌、宫颈癌、食道癌等多种癌症的治疗。临床研究表明, 博来霉素具有低骨髓抑制和免疫抑制作用的优势, 但也易引发过敏反应、皮肤及肺部伤害、肝肾功能损害等毒副作用^[5]。为了尽可能提高博来霉素的治疗效果, 同时避免不良反应, 研究学者发展了诸多博来霉素检测方法用于监控博来霉素的服用剂量及体内代谢状况。现有的检测博来霉素的方法主要包括酶联免疫法^[6]、放射性免疫测定法^[7]、高效液相色谱法^[8]、荧光共振能量转移法^[9-11]和电化学方法^[12-13]等。这些方法虽然具有一定的灵敏度和特异性, 但普遍存在仪器配置昂贵、样品预处理复杂、检测周期长和步骤繁琐等缺点, 因而建立一种简单、快速、灵敏地检测博来霉素的分析方法十分必要。

近年来, 比色传感技术因操作简便、分析速度快、肉眼可见等特点而逐渐成为小分子^[14]、核酸^[15-16]或蛋白质^[17-18]检测的常用技术。借助金纳米颗粒作为探针, Li 等^[19]发展了一种简便快捷的比色生物传感器用于博来霉素的灵敏检测。但因检测过程依赖于未经修饰的金纳米颗粒的聚集过程, 该方法在检测选择性上存在一定的缺陷。基于上述现状, 本文研究并确定了 BLM·Fe(II) 复合物内在的过氧化物模拟酶催化活性, 考察了其在氧化底物显色反应中的催化性能, 并以此为基础建立了一种博来霉素的比色检测新方法。该方法具有简单、灵敏等优点, 有望为博来霉素的剂量监控提供有力的技术支持。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

硫酸博来霉素(大连美仑生物技术公司); 人血清(北京鼎国生物技术有限公司); 2, 2'-联氨基-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)、过氧化氢(H_2O_2)、柔红霉素、丝裂霉素、放线菌素和氯化亚铁(Sigma-Aldrich 公司)。实验所用其他化学试剂均为分析纯或更高纯度, 在使用中未进一步纯化; 使用的溶液均由电阻率大于 $18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 的双蒸水配制。

紫外-可见吸收光谱实验在 UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu)上进行, 颜色变化由佳能 A630 数码相机记录, 实验用水均经 Milli-Q 纯水系统(美国 Barnstead 公司)纯化。

1.2 BLM·Fe(II) 复合物的过氧化物模拟酶催化活性研究

首先考察了 BLM·Fe(II) 复合物催化 H_2O_2 氧化 ABTS 的显色反应: 取 $20\ \mu\text{L}$ 新鲜配制的氯化亚铁溶液与 $20\ \mu\text{L}$ 相同浓度的博来霉素溶液 1:1 混合, 室温下反应 30 min 形成复合物; 随后, 分别向上述溶液中加入 $20\ \mu\text{L}$ 新鲜配制的 $10\ \text{mmol/L}$ ABTS 溶液、 $11\ \text{mmol/L}$ H_2O_2 溶液以及 $120\ \mu\text{L}$ pH 6.0 的缓冲溶液, 使 ABTS 和 H_2O_2 终浓度分别为 $1\ \text{mmol/L}$ 和 $1.1\ \text{mmol/L}$ 。室温条件下反应 5 min, 观察混合溶液的颜色变化并记录溶液在 $384\sim 500\ \text{nm}$ 波长范围内的紫外-可见吸收光谱。

1.3 博来霉素的定量测定

比色检测博来霉素的具体步骤如下: ①将 $20\ \mu\text{L}$ $2.5\ \mu\text{mol/L}$ 氯化亚铁溶液和 $20\ \mu\text{L}$ 含有不同浓度博来霉素的待测样品溶液混合后在室温下反应 30 min; ②将 H_2O_2 和 ABTS(终浓度分别为 $1.1\ \text{mmol/L}$ 和 $1\ \text{mmol/L}$) 作为底物加入上述溶液中进行催化反应, 反应体系总体积为 $200\ \mu\text{L}$; ③ $30\ ^\circ\text{C}$ 反应 5 min 后, 采用数码相机拍摄反应溶液照片, 并使用 UV-2450 紫外-可见分光光度计记录 $384\sim 500\ \text{nm}$ 波长范围内的吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 BLM·Fe(II) 复合物的过氧化物模拟酶催化活性

在过氧化物酶和 H_2O_2 存在的条件下, ABTS 能够被氧化形成深绿色可溶性产物, 该产物在紫外-可见吸收光谱 $420\ \text{nm}$ 处有一特征吸收峰^[20]。本实验使用 ABTS 作为显色底物, 考察了 BLM·Fe(II) 复合物的过氧化物模拟酶催化活性。如图 1 所示, 当博来霉素或亚铁离子与 ABTS 和 H_2O_2 混合 5 min 后, 溶液颜色及其相应的紫外-可见吸收光谱基本保持不变(图 1a、b); 而当两者形成 BLM·Fe(II) 复合物参与上述反应时, 溶液最终呈深绿色, 同时在 $420\ \text{nm}$ 处出现紫外-可见特征吸收峰(图 1c)。这表明, BLM·Fe(II) 复合物能够催化 H_2O_2 和 ABTS 的显色反应, 具有内在的过氧化物模拟酶活性。

博来霉素分子主要包括 3 个功能部分, 即与 DNA 结合有关的二噻唑和末端胺部分、与金属离子结合和 DNA 断裂有关的嘧啶-咪唑部分以及与细胞识别和摄取有关的二糖部分^[21]。当亚铁离子存在时,

博来霉素嘧啶-咪唑部分提供5个N原子与铁原子进行配位,形成 $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物^[21-22]。如图2所示, $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物具备与天然酶辣根过氧化物酶(HRP)铁卟啉活性中心相似的铁原子配位结构和空间分布,这可能是其过氧化物模拟酶活性的分子基础。本实验考察了 $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物的催化反应动力学:在一定的ABTS和 H_2O_2 浓度范围内,能够得到典型Michaelis-Menten曲线,表明 $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物具有与HRP相似的催化反应机理。利用Lineweaver-Burk双倒数曲线,计算得到 $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物对于底物ABTS和 H_2O_2 的米氏常数分别为0.74 mmol/L和6.13 mmol/L。与HRP对于底物ABTS和 H_2O_2 的米氏常数(0.44 mmol/L和3.7 mmol/L)相比, $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物催化底物反应的米氏常数略高,即其对底物的亲和力略低,这可能与两种分子内部的铁原子中心所处微环境的差异有关。

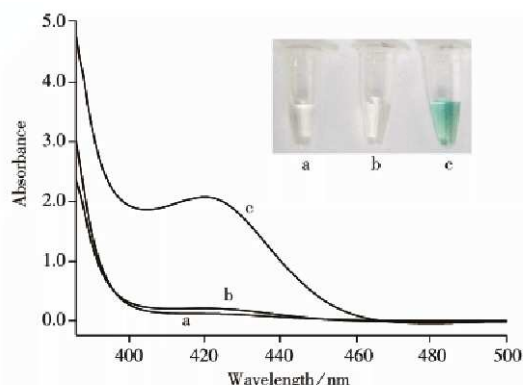


图1 博来霉素(a)、亚铁离子(b)和 $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物(c)分别催化 H_2O_2 和ABTS显色反应的紫外-可见吸收光谱

Fig.1 Typical absorption curves of ABTS reaction solutions catalytically oxidized by BLM(a), $\text{Fe}(\text{II})$ (b) and $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ complex(c) in the presence of H_2O_2 insert shows the color change of different samples

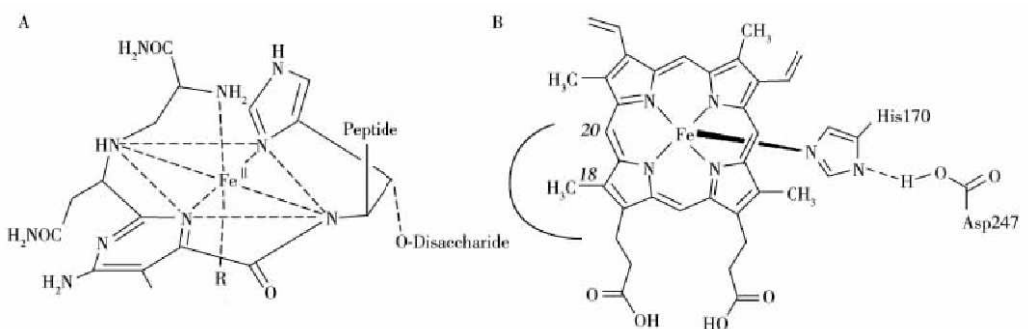


图2 $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物(A)和HRP铁卟啉活性中心(B)的结构

Fig.2 The structure of $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ complex(A) and iron protoporphyrin in HRP(B)

天然过氧化物酶的催化活性依赖于温度和pH值等条件,因此本实验研究了温度和pH值对 $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物过氧化物模拟酶活性的影响。由图3A可以看出, $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物的催化活性在较宽的温度范围内均比较稳定,并在 30°C 时达到最佳。图3B则显示了pH值从4.0升高到10.0时,反应体系在420 nm处吸光度(A_{420})值的变化情况。如图所示,反应体系 A_{420} 值随pH值升高先增大后减小,当 $\text{pH}=6.0$ 时, A_{420} 值达到最大。上述结果表明, $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物催化 H_2O_2 和ABTS显色反应的活性具有温度和pH依赖性,最佳反应温度为 30°C ,最佳反应pH值为6.0。

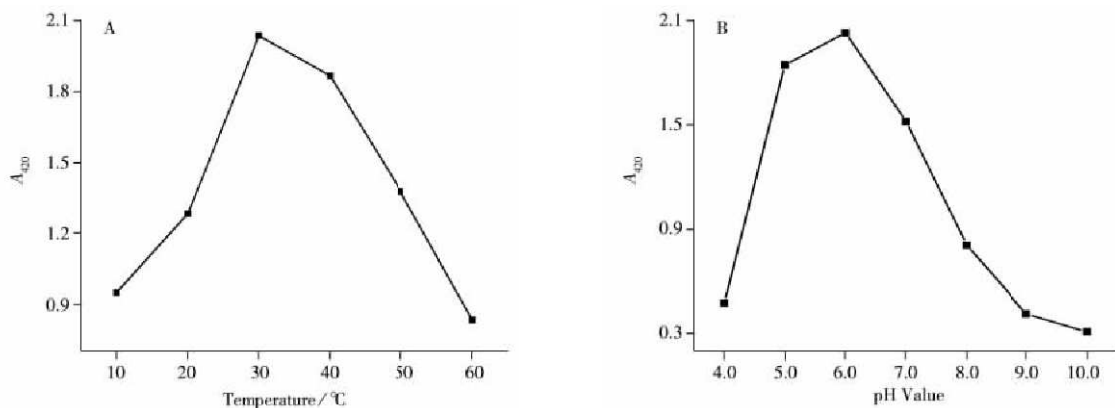


图3 温度(A)和pH值(B)对 $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物催化活性的影响

Fig.3 Temperature(A) and pH value(B) dependency of the catalytic activity of $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ complex

2.2 博来霉素的比色检测

基于 $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物内在的过氧化物模拟酶催化活性, 本实验建立了一种新颖的比色传感方法, 并在最优实验条件下对不同浓度的博来霉素进行分析检测。如图4所示, 当体系中无博来霉素时, 单独的亚铁离子无法催化 H_2O_2 和 ABTS 的显色反应, 溶液保持无色。但当体系中存在博来霉素时, 博来霉素会与亚铁离子结合形成 $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物, 催化 ABTS 的氧化并生成深绿色产物。通过肉眼直接观察, 100 nmol/L 的博来霉素即能引起体系颜色的改变, 且随着博来霉素浓度的增加, 反应体系颜色逐渐呈现出从无色到深绿色变化的趋势。

为更加准确地实现博来霉素的定量检测, 实验进一步研究了反应体系的紫外-可见吸收光谱随博来霉素浓度的变化情况, 结果如图5所示。随着博来霉素浓度的增加, 紫外-可见吸收光谱在 420 nm 处的特征吸收峰逐渐增强, 这说明越来越多的 ABTS 被氧化形成深绿色可溶性产物。图5插图显示了待测博来霉素浓度和紫外-可见吸收光谱 A_{420} 值之间的关系。如图5所示, 在 0.1 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, A_{420} 值随着博来霉素浓度 (c_{BLM}) 的增加而逐渐增大, 且两者在 0.1 ~ 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈线性关系, 线性方程为 $A_{420} = 0.761 c_{\text{BLM}} + 0.188$, $r = 0.995$ 。基于空白组实验数据加上3倍标准偏差的方法^[23], 计算出本方法对博来霉素检测的检出限为 14.1 nmol/L。同时, 根据每一浓度至少重复3次检测的实验结果, 推算出本方法对博来霉素检测的平均标准偏差为 4.2%。方法显示出良好的准确性和可重复性。

2.3 体系的选择性研究

为验证检测体系的选择性, 本实验选取3种常用的抗肿瘤药物(柔红霉素、丝裂霉素和放线菌素)作为对照。图6显示了体系分别检测 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 博来霉素和 5 $\mu\text{mol/L}$ 对照药物时得到的紫外-可见吸收光谱在 420 nm 处的吸收值 A_{420} 。从图中可以看出, 只有在检测博来霉素时, 反应体系的 A_{420} 值会明显增加。这一结果表明本文构建的检测体系对于博来霉素的检测具有良好的专一性和选择性。

3 结论

本文首次报道了 $\text{BLM} \cdot \text{Fe}(\text{II})$ 复合物具有内在的过氧化物模拟酶活性, 基于这一发现, 建立了一种新颖的比色生物传感体系用于博来霉素的检测。实验结果表明, 在最优条件下, 该体系对博来霉素的线性检测范围为 0.1 ~ 2.5 $\mu\text{mol/L}$, 检出限为 14.1 nmol/L。该方法具有简便快捷、操作简单、结果肉眼可见、选择性强、便于高通量检测等优点, 有望用于博来霉素的临床剂量监控。

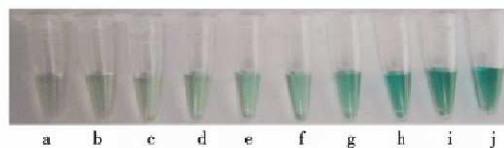


图4 不同浓度博来霉素存在条件下反应体系的颜色变化图

Fig. 4 Photographs of the test solution in the presences of different concentrations of BLM
BLM concentration(a-j): 0, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 5.0, 8.0, 10.0 $\mu\text{mol/L}$

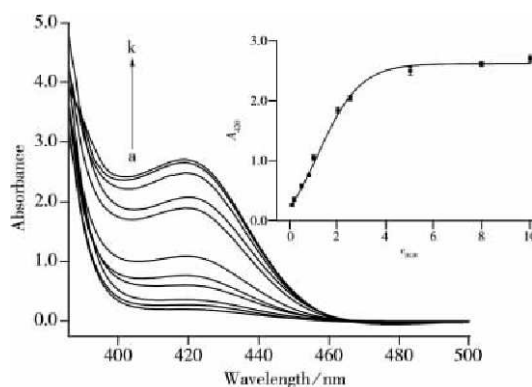


图5 不同浓度博来霉素存在条件下反应体系的紫外-可见吸收光谱

Fig. 5 UV-Vis spectra of the test solution in the presence of different concentration of BLM
concentration of BLM(a-k): 0, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 2.5, 5.0, 8.0, 10.0 $\mu\text{mol/L}$; insert: calibration curve for the detection of BLM

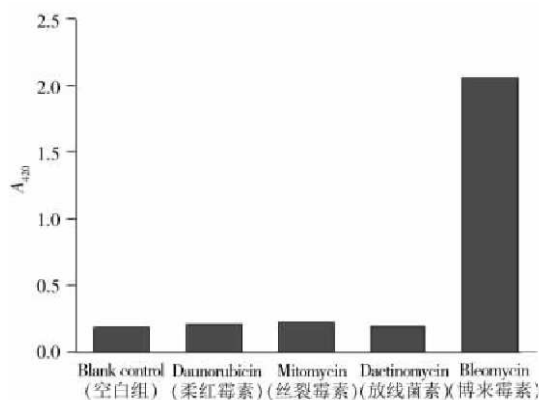


图6 检测体系的选择性

Fig. 6 Selectivity investigation of the proposed detection method
concentration of BLM: 2.5 $\mu\text{mol/L}$, concentration of other drugs: 5 $\mu\text{mol/L}$

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D. *CA. Cancer J. Clin.*, **2011**, 61(2): 69 - 90.
- [2] Galm U, Hager M H, Van Lanen S G, Ju J H, Thorson J S, Shen B. *Chem. Rev.*, **2005**, 105(2): 739 - 758.
- [3] Yu Z Q, Schmaltz R M, Bozeman T C, Paul R, Rishel M J, Tsosie K S, Hecht S M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135(8): 2883 - 2886.
- [4] Claussen C A, Long E C. *Chem. Rev.*, **1999**, 99(9): 2797 - 2816.
- [5] Chen J Y, Stubbe J. *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, 5(2): 102 - 112.
- [6] Fujiwara K, Isobe M, Saikusa H, Nakamura H, Kitagawa T, Takahashi S. *Cancer Treat. Rep.*, **1983**, 67(4): 363 - 369.
- [7] Teale J D, Clough J M, Marks V. *Br. J. Cancer*, **1977**, 35(6): 822 - 827.
- [8] Mahdadi R, Kenani A, Pommery N, Pommery J, Hénichart J P, Lhermitte M. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1991**, 28(1): 22 - 26.
- [9] Li F, Feng Y, Zhao C, Li P, Tang B. *Chem. Commun.*, **2012**, 48(1): 127 - 129.
- [10] Chang Y, Zhang P, Yu Y, Du Y Q, Wang W, Huang C Z. *Anal. Methods*, **2013**, 5: 6200 - 6204.
- [11] Gao F L, Lei J P, Ju H X. *Chem. Commun.*, **2013**, 49(68): 7561 - 7563.
- [12] Yin B C, Wu D, Ye B C. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(19): 8272 - 8277.
- [13] Li Y, Huang C C, Zheng J B, Qi H L, Cao W, Wei Y M. *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, 44: 177 - 182.
- [14] Zhang M X, Qing G Y, Xiong C L, Cui R, Pang D W, Sun T L. *Adv. Mater.*, **2013**, 25(5): 749 - 754.
- [15] Guo L H, Xu Y, Ferhan A R, Chen G N, Kim D H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135(33): 12338 - 12345.
- [16] Wang F, Lu C H, Liu X Q, Freage L, Willner I. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(3): 1614 - 1621.
- [17] Li J S, Jia Y H, Zheng J, Zhong W W, Shen G L, Yang R H, Tan W H. *Chem. Commun.*, **2013**, 49(55): 6137 - 6139.
- [18] Zhou W J, Gong X, Xiang Y, Yuan R, Chai Y Q. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(1): 953 - 958.
- [19] Li F, Feng Y, Zhao C, Tang B. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26(11): 4628 - 4631.
- [20] Zhang Y F, Li B X. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 27(1): 137 - 140.
- [21] Lehmann T E, Ming L J, Rosen M E, Que L Jr. *Biochemistry*, **1997**, 36(10): 2807 - 2816.
- [22] Kryatov S V, Rybak - Akimova E V, Schindler S. *Chem. Rev.*, **2005**, 105(6): 2175 - 2226.
- [23] Centi S, Tombelli S, Minunni M, Mascini M. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(4): 1466 - 1473.

《中国无机分析化学》 征稿征订启事

- 技术交流的平台
- 无机分析的阵地
- 企业联系的桥梁
- 同行朋友的纽带

《中国无机分析化学》是由北京矿冶研究总院主办的无机分析化学专业性学(技)术期刊。本刊包括岩矿分析、冶金分析、材料分析、环境分析、化工分析、生物医药分析、食品分析、仪器研制、综述评论、技术交流、信息之窗等栏目。读者对象为从事无机分析化学及相关技术的广大科研人员、工程技术人员、管理人员、大专院校师生、相关公司及企事业单位。本刊也是相关图书、情报等部门不可少的信息来源。

《中国无机分析化学》是美国“CA 千种表”中我国化学化工类核心期刊,《中文科技期刊数据库》刊源,中国期刊网入网期刊,《中国科学引文数据库》刊源,《中国学术期刊》(光盘版)入编期刊,《中国核心期刊(遴选)数据库》刊源,《中国化学化工文摘》收录期刊。

《中国无机分析化学》一直秉承“读者第一,作者至上,以人为本,以质为根”的办刊理念,全方位为中国无机分析化学工作者服务,促进中国无机分析化学行业的发展!

《中国无机分析化学》在国内外公开发行,季刊,大 16 开,单价 10.00 元,全年 40.00 元。全国各地邮局发行,如有漏订的单位和读者,请直接与编辑部联系。

国内邮发代号: 80 - 377

国内统一连续出版物号: CN 11 - 6005/06

CODEN: ZWFHAZ

国际标准连续出版物号: ISSN 2095 - 1035

国外发行代号: Q9045

京西工商广字第 0425 号

电话: 010 - 63299759; 传真: 010 - 63299754; E-mail: zgwjfxhx@163.com; 邮政编码: 100160;
地址: 北京市南四环西路 188 号总部基地十八区 23 号楼 905; 投稿网址: <http://zgwjfxhx.bgrimm.cn>