

微孔板化学发光法检测碱性磷酸酶技术的建立

刘欢, 胡亚萍, 高习习, 王鹏, 丁凡, 王钦富*

(大连大学生命科学与技术学院, 辽宁大连 116622)

摘要:碱性磷酸酶(ALP)能催化发光底物 APLS 迅速水解并持续发光, 据此建立了化学发光技术检测 ALP 活性的方法。利用一种新的发光底物 APLS, 建立微孔板化学发光法检测 ALP 活性, 并对实验条件进行优化。优化后的最适反应条件为: 微孔板上每孔加 200 μ L APLS, 在 pH=9.5, 37 $^{\circ}$ C 条件下与 ALP 反应 10 min, 多功能酶标仪检测发光光子数(RLU), 检测 ALP 线性范围是 0.01~1 U/L。微孔板化学发光法检测 ALP, 敏感度更高, 且操作简便易行。

关键词:碱性磷酸酶; 化学发光法; 微孔板

中图分类号: O657.39 文献标识码: A 文章编号: 1006-6144(2017)02-291-03

碱性磷酸酶(Alkaline Phosphates, ALP)是一种广泛存在于人体、动物、植物及微生物体内的膜结合蛋白, 在碱性条件下具有催化活性。ALP 直接参与磷酸基团的转移和代谢等生理过程, 对体内钙磷的吸收与代谢、维持体内适宜钙磷比例, 以及动物的骨化过程有着极其重要的作用^[1]。血清中的 ALP 活力增高可见于阻塞性黄疸、急性或慢性黄疸型肝炎、肝癌等肝胆疾病, 因此 ALP 酶活力测定常作为肝胆疾病的临床辅助诊断指标。另外, ALP 是乳中天然存在的一种酶, 该酶作为一种热处理强度指标被广泛应用于评价牛奶巴氏杀菌是否彻底^[2]。

目前, 检测 ALP 的主要方法有电化学法^[3-4]、荧光分光光度法^[5-7]、紫外-可见分光光度法^[8-9]、化学发光法^[10-12]等。电化学法是以磷酸苯酯为底物, 通过 TYR 和电活性产物之间能够进行反复连续的反应, 化学反应信号得到增强, 从而测定 ALP 活性。该方法较为快捷方便, 但是选择性较差, 反应条件不易控制。荧光分光光度法采用的是动力学连续性检测, 在作用时间内对产生的荧光增加量与标准曲线对比, 计算相应的酶活力, 方法准确、简便、灵敏度高, 但用时较长, 不易测量。紫外-可见分光光度法是在碱性磷酸酶的催化作用下, 生成一种蓝色的化合物靛酚, 通过与一套标准颜色进行对比或者用分光光度计检测, 得出 ALP 的活性。虽然这种方法快速、方便, 但苯酚极易受到污染, 造成假阳性结果, 且结果判断具有主观性, 影响测定准确度。本实验采用的化学发光法是利用发光底物 APLS 能被 ALP 迅速水解, 且水解产物能够持续发光, 通过多功能酶标仪检测发光强度, 以测定 ALP 活性。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

pH 计(上海天达公司); 生化培养箱(Bluepard 公司); Synergy2 多功能酶标仪(BioTek 公司)。

ALP 标准品(Sangon Biotech 公司)酶活力是 5 000 U/mg; ALP 标准品稀释液为 10 mmol/L Tris-HCl(pH=8.0), 1 mmol/L MgCl₂, 50% 甘油。APLS 底物液(InnosepBio 公司); 白色 96 孔微孔板(Mabtech 公司)。

1.2 实验方法

微孔板化学发光法检测 ALP 的操作步骤是在白色 96 孔微孔板中加入 ALP 及其底物 APLS, 孵育

收稿日期: 2016-01-28

修回日期: 2016-03-28

* 通讯作者: 王钦富, 男, 博士, 教授, 研究方向: 兽医免疫学, 分子免疫学. E-mail: qinfuwang@126.com

后,用多功能酶标仪检测其发光强度,进而测量 ALP 的活性(ΔRLU)。仅加入 APLS 底物的发光光子数为 RLU_0 ,ALP 作用产生发光光子数为 RLU , $\Delta\text{RLU}=\text{RLU}-\text{RLU}_0$ 。

2 结果与分析

2.1 孵育温度对化学发光体系的影响

1 U/L ALP 标准品与 200 μL 、 $\text{pH}=9.5$ 的 APLS 底物液在温度分别为 27 $^{\circ}\text{C}$ 、32 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$ 、47 $^{\circ}\text{C}$ 、52 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 min 后,体系的 ΔRLU 与温度的关系见图 1。可见在 37 $^{\circ}\text{C}$ 处达到峰值。因此,ALP 最适反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 APLS 底物液体积对化学发光体系的影响

1 U/L ALP 标准品与 $\text{pH}=9.5$ 、体积分别为 25、50、100、150、200 μL 的 APLS 底物液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 10 min,体系的 ΔRLU 与 APLS 底物液体积的关系见图 2。结果表明 ΔRLU 随 APLS 底物液体积增大而增大,当体积大于 200 μL 时, ΔRLU 达到平台,因此,最适 APLS 底物液体积为 200 μL 。

2.3 pH 对化学发光体系的影响

1 U/L ALP 标准品与 200 μL 、 pH 分别为 8、8.5、9、9.2、9.5、10、11 的 APLS 底物液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 10 min,其发 ΔRLU 与 pH 的关系见图 3,结果显示在 $\text{pH}=9.5$ 时, ΔRLU 最大。因此,APLS 法检测 ALP 反应体系的最适 pH 值为 9.5。

2.4 孵育时间对化学发光体系的影响

在酶促反应中,孵育时间对 ALP 催化底物 APLS 的水解反应速度影响很大。从图 4 中可以看出, ΔRLU 在孵育 2、10、20、30、40、50、60 min 等不同时间点检测时呈现曲线关系,当时间为 10 min 时, ΔRLU 最大。因此,ALP 与底物 APLS 的最佳反应时间是 10 min。与赵启仁等^[1]发光法检测 ALP 和茹柿平等^[2]电化学法检测 ALP 的时间为 20 min 相比,本文建立的化学发光法所用时间缩短。

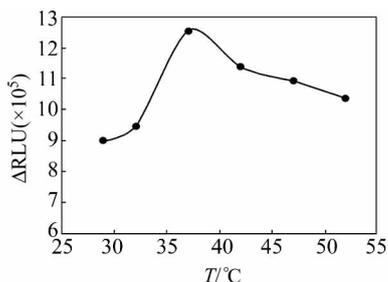


图 1 温度对于反应体系的 ΔRLU 的影响
Fig. 1 Effect of temperature on ΔRLU of reaction system

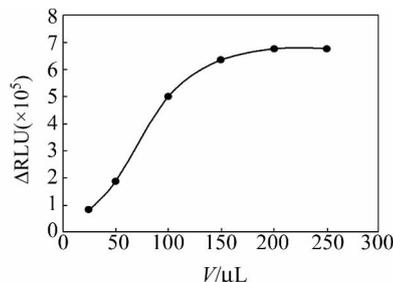


图 2 APLS 底物体积对反应体系 ΔRLU 的影响
Fig. 2 Effect of APLS volume on ΔRLU of reaction system

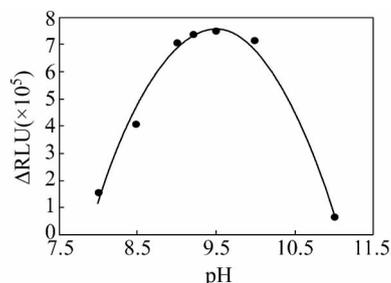


图 3 pH 对反应体系 ΔRLU 的影响
Fig. 3 Effect of pH on ΔRLU of reaction system

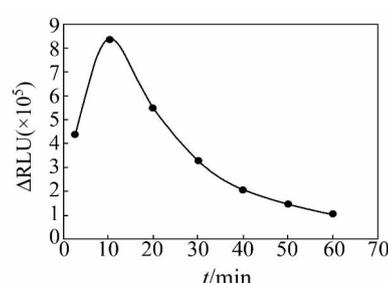


图 4 反应时间对反应体系的 ΔRLU 的影响
Fig. 4 Effect of incubation time on ΔRLU of reaction system

2.5 灵敏度和线性范围

0.0001~1 000 U/L 不同酶活力的 ALP 与 $\text{pH}=9.5$ 、200 μL APLS 底物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 10 min。微孔板化学发光法检测,ALP 酶活力在 0.01~1 U/L 范围呈现良好的线性关系,线性回归方程为: $\Delta\text{RLU}=7.1478x+0.25857$,相关系数为 0.9918。

3 结论

本文利用一种新的发光底物 APLS,建立微孔板化学发光法检测 ALP 并进行条件优化。优化最适反应条件为:微孔板上每孔加 200 μL APLS,在 $\text{pH}=9.5$ 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下与待测 ALP 反应 10 min。结果表明检测 ALP 线性范围是 0.01~1 U/L,相对于光吸收法等本文方法灵敏度更高,且操作简便易行。

参考文献:

- [1] WANG H, Determination of Alkaline Phosphatase Using Sequential Injection Fluorimetry Method and Its Application for Evaluation of Milk Product Pasteurization. Dalian: Liaoning Normal University(王欢. 顺序注射荧光法测定碱性磷酸酶及其应用. 大连: 辽宁师范大学), 2012.
- [2] SHEN J S, WANG J Q, BU D P, et al. China Dairy Industry(申军士, 王加启, 卜登攀, 等. 中国乳品工业), 2009, **37**(6): 31.
- [3] RU P P, WU J, YING Y B, JI F. Chinese Journal of Analytical Chemistry(茹柿平, 吴坚, 应义斌, 季峰. 分析化学), 2012, **40**(6): 835.
- [4] Nie Fei, Luo Kai, Zheng Xiaohui, Zheng Jianbin, Song Zhenghua. Sensors And Actuators B: Chemical, 2015, **218**: 152.
- [5] LEI Yingjie, Ouyang Jie, ZHANG Youlai, et al. Chinese Journal of Chemistry, 2009, **27**(12): 2413.
- [6] ZHANG N, BIAN W W, LI Y H. Chinese Journal of Analytical Chemistry(张娜, 边玮玮, 李耀辉. 分析化学), 2009, **37**(5): 721.
- [7] HUI Y H, Han L Q, YANG G Y, WANG L. Chemistry & Bioengineering(惠永华, 韩立强, 杨国宇, 王路. 化学与生物工程), 2008, **25**(3): 74.
- [8] ZHU Y R, WU F C, LIN Y. Spectroscopy and Spectral Analysis(朱元荣, 吴丰昌, 林樱. 光谱学与光谱分析), 2013, **33**(7): 1845.
- [9] Hirata S, Kitamura C, Fukushima H, Nakamichi I, Abiko Y, Terashita M, Jimil E. Journal of Cellular Biochemistry, 2010, **111**(6): 1445.
- [10] WANG Y, WANG Z L, CUI L G, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry(王宇, 王宗良, 崔立国, 等. 分析化学), 2012, **40**(8): 1279.
- [11] ZHAO Q R, LI M J, LIU J, et al. Progress In Biochemistry and Biophysics(赵启仁, 李美佳, 刘洁, 等. 生物化学与生物物理进展), 1998, **25**(1): 70.
- [12] Albillos S M, Reddy R, Salter R. Journal of Food Protection, 2011, **74**(7): 1144.

Microplate Chemiluminescence Method for Alkaline Phosphatase Detection

LIU Huan, HU Ya-ping, GAO Xi-xi, WANG Peng, DING Fan, WANG Qin-fu*
(College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622)

Abstract: Alkaline phosphatase (ALP) can catalyze its substrate, leading to emitting light continuously. In this paper, a new substrate, APLS, was used, and a chemiluminescence technique for detecting alkaline phosphatase on microplate was developed and optimized. The results showed that the linear range for the determination of ALP was 0.01–1 U/L. Compared with other techniques for detecting ALP, this method is more sensitive and simpler.

Keywords: Alkaline Phosphatase; Chemiluminescence technique; Microplate