

基于固定化酶的蛋白质磷酸酶抑制率法测定 大田软海绵酸

孙海燕^{1,2}, 张晓娟¹, 方旭波^{1,2}, 袁高峰^{1,2*}

(1. 浙江海洋学院食品与医药学院, 舟山 316022; 2. 浙江省水产品加工技术研究联合重点实验室, 舟山 316022)

摘要: **目的** 建立和优化用于检测大田软海绵酸(OA)的固定化蛋白质磷酸酶 2A (PP2A)抑制率法。**方法** 以分离提取的PP2A为材料, 根据OA抑制PP2A酶活性的原理, 建立用于检测OA的固定化PP2A酶抑制率法, 并对最佳酶用量和反应体系参数等进行优化。**结果** 最佳固定化PP2A酶蛋白量 2 μg 、固定化配比为琼脂糖与PP2A酶蛋白量为 1:1、pH 值为 8.4; 采取 4 参数 Logistic 曲线法进行标准曲线拟合, 曲线 R^2 值达 0.994, 检测限为 3.45 $\mu\text{g/L}$, 实际样品测定时具有良好的准确性和重复性。**结论** 建立的固定化PP2A酶抑制率法有望作为低成本、操作简单的OA快速筛检方法推广应用。

关键词: 大田软海绵酸; 蛋白质磷酸酶 2A; 快速检测; 酶抑制率法

Research on detection of okadaic acid by using immobilized protein phosphatase inhibition assay

SUN Hai-Yan^{1,2}, ZHANG Xiao-Juan¹, FANG Xu-Bo^{1,2}, YUAN Gao-Feng^{1,2*}

(1. School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Products Processing Technology of Zhejiang Province, Zhoushan 316022, China)

ABSTRACT: Objective To develop and optimize an immobilized enzyme inhibition assay for okadaic acid (OA). **Methods** Based the principle which OA could inhibit the activity of protein phosphatase 2A (PP2A), the assay was established by using the extracted PP2A in this paper. The parameters such as the amount of enzyme and reaction condition were optimized. **Results** The optimal PP2A immobilized enzyme protein was 2 μg , the optimal ratio of agarose and PP2A enzyme protein was 1:1, and the optimal pH value was 8.4. The standard curve fitting was made by the 4-parameter Logistic curve method. R^2 value of curve fitting was 0.994, which suggested standard curve fitting has good fit. The detection limit of OA was 3.45 $\mu\text{g/L}$. This assay for detecting the actual sample had a good accuracy and repeatability. **Conclusion** These results suggested that the immobilized enzyme inhibition assay may be used as a low-cost and easy operation method for the rapid detection of OA.

KEY WORDS: okadaic acid; protein phosphatase 2A; fast detection; enzyme inhibition assay

基金项目: 浙江省科技厅公益技术研究工业项目(2013C31067)、浙江省水产品加工技术研究联合重点实验室开放基金资助项目(2011E10002)

Fund: Supported by Gongyi Technology Application Project of Zhejiang Province (2013C31067), Joint Key Laboratory of Aquatic Products Processing Technology of Zhejiang Province (2011E10002)

*通讯作者: 袁高峰, 博士, 副教授, 主要研究方向为水产品质量与安全。E-mail: yuangf@zjou.edu.cn

*Corresponding author: YUAN Gao-Feng, Ph.D, Associate Professor, College of Food and Medicine, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China. E-mail: yuangf@zjou.edu.cn

1 引言

随着食品贸易全球化,加工食品的便利与普及、人们餐饮习惯的改变,食品安全问题越来越深刻地影响着人们生活并受到全社会高度关注。及时、全面地从各环节监控食品安全状况的要求越来越强烈,食品安全快速检测技术的出现满足了这种需求并保障食品安全性。海产品如贝类、鱼类等因其味美、营养价值高深受人们欢迎,但其中的贝类毒素如海洋腹泻性贝类毒素(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)给人类健康带来危害^[1]。DSP的致腹泻性组分为大田软海绵酸(okadaic acid, OA)及其衍生物鳍藻毒素(dinophysistoxins, DTxs)^[2]。OA常蓄积于贝类等海洋生物体内,并经食物链引起人类以腹泻为主要特征的食物中毒,导致严重的胃肠功能紊乱,中毒症状与细菌性胃肠炎极为相似,另一方面OA具有长期致癌效应^[3-5]。为保证海产品安全性,最大限度降低贝类毒素等对人类健康的危害,有必要建立快速、灵敏和可靠的检测方法。

OA是蛋白磷酸酶PP1和蛋白质磷酸酶2A(PP2A酶)的烈性抑制剂,能抑制蛋白磷酸酶活性而导致蛋白质过磷酸化。利用OA对PP2A酶活力抑制这一特性,选择一种在酶催化反应后能产生显色产物的物质作底物,根据产物产生速率表示酶活力受抑制程度,进而计算抑制剂OA浓度,可以发展和建立OA的蛋白磷酸酶活力抑制测定法^[6,7]。然而商业化生产的PP2A主要从红细胞中提取,价格昂贵且难于获取,影响利用蛋白质磷酸酶抑制率法对OA进行快速检测的推广应用;另一方面,使用PP2A抑制率法测定OA的一个主要缺陷是PP2A酶长时间储存的不稳定性,这也影响该方法作为商业化试剂盒的开发应用。因此,本研究以分离提取的PP2A为材料,根据OA抑制PP2A酶活性的原理,建立用于检测OA的固定化PP2A酶抑制率法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

硝基苯磷酸二钠六水合物(PNPN, 纯度大于99%),大田软海绵酸(纯度大于90%,美国Sigma公司,中国分公司);乙二醇二乙醚二胺四乙酸(ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetracetic acid, EDTA)、苯甲基磺

酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、巯基乙醇、三羟甲基氨基甲烷(Tris)(分析纯,上海生工生物工程有限公司)。

2.2 蛋白磷酸酶2A的提取

根据徐立红等^[8,9]的方法进行,取鲤鱼肝加入含0.25 mol蔗糖和10%甘油的50 mmol Tris缓冲液,Tris缓冲液含2 mmol EDTA, 2 mmol EGTA, 0.2 mmol PMSF, 2 mmol 巯基乙醇冰浴匀浆,匀浆液4500 r/min离心30 min后,继续12000 r/min离心30 min,上清液过DEAE纤维素柱后用不同浓度NaCl的缓冲液洗脱。

2.3 反应体系建立和酶活性测定

以对硝基苯磷酸二钠六水合物作为反应底物,以提取纯化得到的PP2A酶催化PNPN形成对硝基酚(PNP),建立反应体系(图1)。

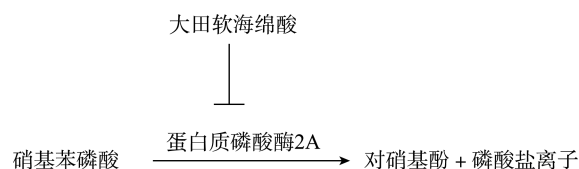


图1 分析示意图

Fig. 1 Diagram of analysis

酶活性测定反应系统的组成如下:在酶标板微孔中加入20 μ L 100 mmol PNPN溶液和10 μ L PP2A酶溶液或者10 μ L PP2A固定化酶凝胶,再加入含2 mmol二硫苏糖醇(DTT)和0.2 mg/mL牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)的Tris-HCl缓冲溶液(pH8.4)使最终体积到200 μ L,空白不含PP2A酶溶液或者10 μ L PP2A固定化酶凝胶,用缓冲液代替。37 $^{\circ}$ C育温5 min后在405 nm波长下采用酶标仪测定吸光度值。

2.4 PP2A酶的固定

将分离得到的PP2A酶溶解在含30 mmol Tris-HCl, 2 mmol EDTA和20 mmol $MgCl_2$ 的缓冲液中,制成不同浓度的酶溶液;将0.1 g琼脂糖加入到50 mL Tris-HCl缓冲液中,60 $^{\circ}$ C加热5 min,充分溶解后得琼脂糖溶液,待该琼脂糖溶液降温至27 $^{\circ}$ C时,将PP2A酶加入到琼脂糖溶液中并充分混合形成混合液;取上述混合液10 μ L加入到酶标板微孔中并在4 $^{\circ}$ C下放置干燥6 h。

2.5 反应体系优化

在反应体系建立基础上,对影响PP2A固定化酶催化反应的各参数如固定化配比、反应pH、缓冲溶液中DTT和BSA添加等进行优化。除非特别指明,

采用的反应体系与2.3相同。

2.6 酶抑制率法测定腹泻性贝类毒素

腹泻性贝类毒素抑制PP2A酶活性,导致反应产物形成减少,吸光度值降低。在制备的固定化酶标板中加入20 μL不同浓度的OA和20 μL 100mmol PNNP溶液,再以含2 mmol DTT和0.2 mg/mL BSA的Tris-HCl缓冲溶液(pH8.4)使最终体积到200 μL,对照不含毒素,其余与样品孔相同。37℃育温1 h后在405 nm波长下采用酶标仪测定吸光度值。按照下面的公式计算OA对PP2A酶活性抑制率。

PP2A酶活性抑制率(%)= $[(A_0-A)/A_0] \times 100$, 其中 A_0 为对照的吸光度值, A 为加入OA后吸光度值。

2.7 实际样本的测定

根据Campas等^[10]的方法,对添加OA贻贝的样品进行提取。样品先匀浆后,以甲醇:水(80:20)进行振荡提取10 min,粗提物以3500 r/min离心10 min后,采用2.6的方法进行测定。

3 结果与讨论

3.1 最佳酶蛋白量的确定

选取0.5~3.5 μg的酶蛋白测定其催化的相对活性(吸光度值),当酶蛋白量范围为在0.5~2 μg时,酶量与相对酶活性(吸光度值)呈现良好的线性关系,因此实验酶量控制在此范围内,以固定2 μg酶蛋白量作为最佳的酶用量。从图2可以看出,随着酶用量的进一步增加(大于3 μg),吸光度值还有所降低,这可能是由于制备的PP2A酶存在着某些干扰物质,酶的用量增加反而会抑制酶促反应的进行。

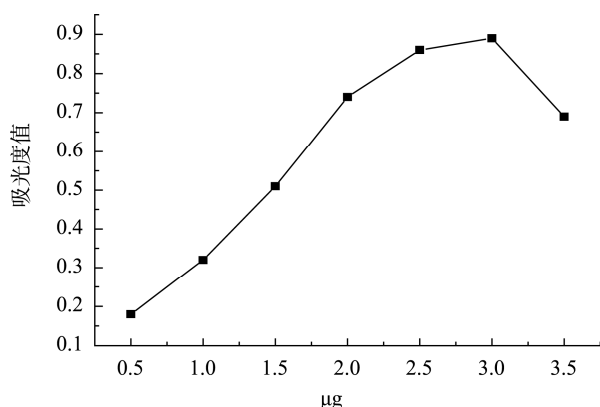


图2 酶量与酶相对活性的关系

Fig. 2 Effect of the amount of PP2A on the enzymatic relative activity

3.2 最佳固定化配比分析

琼脂糖加入到50 mL Tris-HCl缓冲液中,60℃加热5 min,充分溶解后得琼脂糖溶液,待该琼脂糖溶液降温至27℃时,将PP2A酶加入到琼脂糖溶液中并充分混合形成混合液,混合溶液冷却后在96孔板孔壁底部形成琼脂糖凝胶。

琼脂糖与PP2A酶量之比影响酶固定化过程和固定化凝胶的形成,因此本研究以不同琼脂糖与PP2A酶量配比分析其对酶催化活性的影响,探明最佳的固定化配比,其结果如图3所示,琼脂糖与PP2A酶量在4:1~1:1范围内吸光度值呈现明显升高,而在1:1~1:4范围内吸光度值显著降低,因此琼脂糖与PP2A酶量在1:1时为最佳的固定化配比。

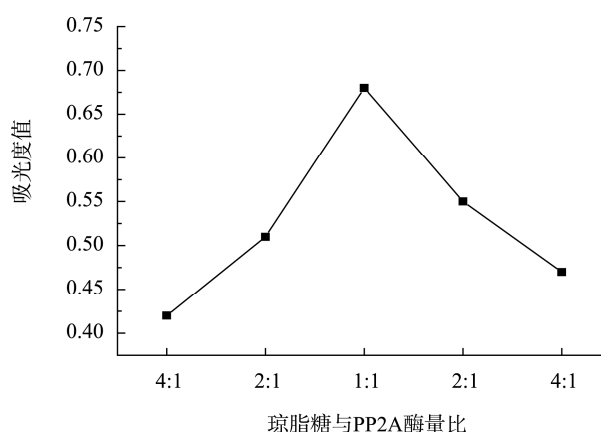


图3 琼脂糖与PP2A酶量之比对酶活性的影响

Fig. 3 Effect of the ratio of agarose, PP2A on the enzymatic activity

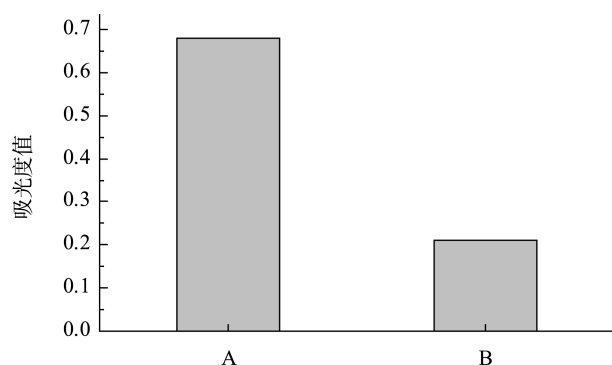
3.3 DTT和BSA添加对酶催化反应影响分析

缓冲溶液的性质影响固定化PP2A酶催化活性的大小,本研究分析在固定化PP2A酶促反应的缓冲溶液中是否添加DTT和BSA对固定化PP2A酶催化活性的影响,其结果如图所4示,DTT和BSA的添加显著增加了酶活性,这与Hayat等^[11]的结果一致。

3.4 反应pH对酶催化反应影响分析

酶促反应都是在一定pH条件下进行的,酸、碱既能影响酶的活性,也能直接影响酶的催化活^[12]。pH值对酶促反应有一定影响,因此考察pH值范围7.6~9.0之间对固定化PP2A酶活性的影响,结果如图5所示,pH值在7.6~8.2之间酶促反应吸光度值呈显著增加,8.2~8.4之间基本稳定,但随着pH值进一步

升高(8.6~9.0), 吸光度值显著降低, 因此 8.2~8.4 之间为理想 pH 值范围, 随后的研究以 8.4 作为反应条件。



A: 添加 DTT 和 BSA, B: 未添加 DTT 和 BSA

A: DTT and BSA, B: without DTT and BSA

图 4 缓冲溶液性质情况对酶活性的影响。

Fig. 4 Effect of the buffer nature on the enzymatic activity

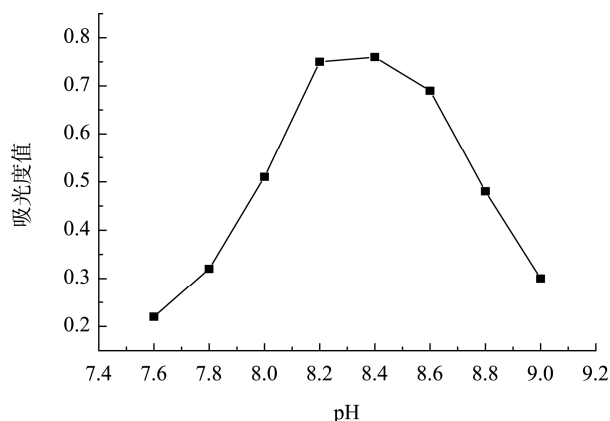


图 5 反应体系 pH 值对酶活性的影响

Fig. 5 Effect of pH on the enzymatic activity

3.5 固定化酶稳定性分析

固定化酶的稳定性对于利用这一体系进行商业化应用非常重要, 已有研究表明: 为了稳定酶活性, 采用在酶溶液中添加一些稳定剂如甘油和蔗糖等。当 PP2A 固定化酶制备过程不添加任何稳定剂, 在 4 °C 储藏, 15 d 情况下, 酶活性显著降低, 第 3 d 天时, 酶活性降低至 52%, 之后持续降低至 24%(15 d)(图 6); 而如果在固定化酶凝胶制备过程中添加 2.5% 的蔗糖, 则在 4 °C 储藏 15 d 能较好保持酶的活性, 15 d 时酶活性为初始酶活性的 91%, 这表明添加蔗糖能起显著地稳定酶活性作用, 能作为储藏固定化 PP2A 酶的有效手段, 为商业化的应用奠定基础。

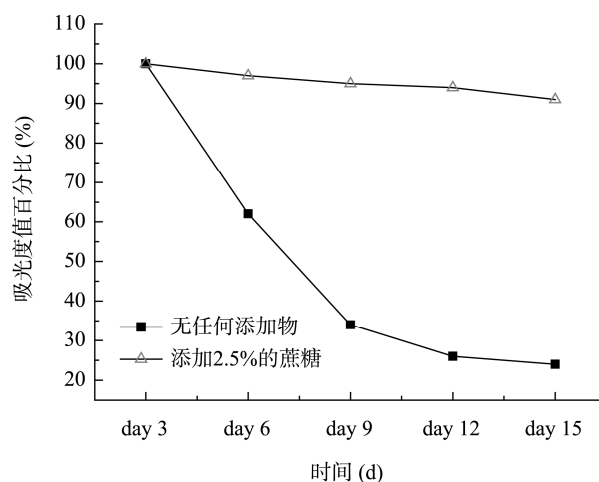


图 6 固定化 PP2A 稳定性分析

Fig. 6 Analysis of storage stability of immobilized PP2A

3.6 酶抑制率法测定大田软海绵酸

利用 OA 对 PP2A 酶活力抑制这一特性, 选择 PNNP 作为底物, 底物酶催化反应后能产生显色产物 PNP, 根据产物产生量来表示酶活力受抑制程度, 进而计算抑制剂 OA 浓度, 可以发展和建立 OA 的蛋白磷酸酶活力抑制测定法(图 1)。

以不同浓度的 OA 标准溶液对 PP2A 活性抑制情况进行分析, 用 origin 8.0 软件采取 4 参数 Logistic 曲线法进行拟合制作标准曲线(图 7), 其拟合公式为 $Y=A_2+(A_1-A_2)/[1+(X/X_0)^P]$, 通过拟合得到曲线参数见表 1, 因此得到标准曲线为: $Y=104.01-100.19/[1+(X/16.35)^{1.74}]$, 曲线的 R^2 值为 0.994, 这说明拟合度较好。以 10% 酶抑制率作为对 OA 的检测限, 求出本研究中 PP2A 酶抑制法检测 OA 的检测限为 3.45 $\mu\text{g/L}$, 其半抑制浓度 IC_{50} 为 15.06 $\mu\text{g/L}$ 。

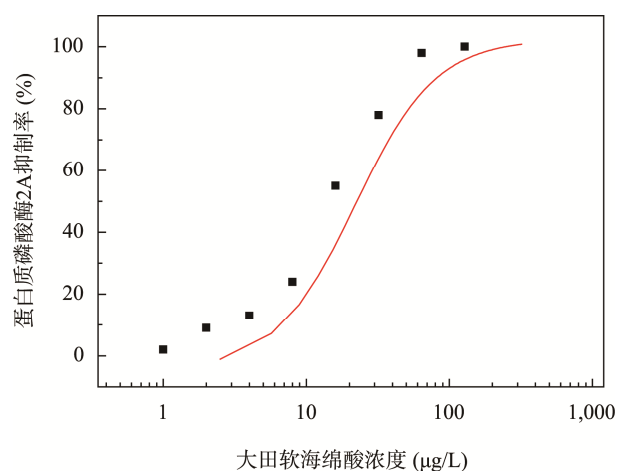


图 7 标准曲线图

Fig. 7 The standard curve of the inhibition of PP2A by OA

表 1 不同浓度大田软海绵酸对蛋白质磷酸酶 2A 抑制率 4 参数 Logistic 曲线拟合参数
Table 1 Different concentration of OA on parameters derived from the sigmoidal logistic four-parameter fitting for the inhibition of PP2A

A_1	A_2	X_0	P	R^2 值	IC_{10} ($\mu\text{g/L}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)
3.82	104.01	16.35	1.74	0.994	3.45	15.06

表 2 贻贝样本中大田软海绵酸的检测结果($n=6$)
Table 2 Analytical results of mussel samples for okadaic acid concentration ($n=6$)

实际样品	添加量($\mu\text{g/L}$)	本法测定值	RSD (%)	本法回收率
1	20.00	18.80	5.78%	94.01%
2	40.00	37.29	4.21%	93.23%
3	60.00	55.47	6.63%	92.45%

3.7 实际样品的检测

采取在实际贻贝样本中添加 20.00、40.00、60.00 $\mu\text{g/L}$ OA 进行检测实验, 结果见表 2, 采取固定化酶抑制率法测定回收率在 92.45%~94.01%之间, RSD 在 4.21~6.63%之间, 结果表明固定化酶抑制率法测定实际样品具有良好的准确性和重复性, 但测定值较实际添加量低, 这可能是由于实际样本中基质本底颜色和基质本底抑制 PP2A 酶活性而影响检测结果, 因此还需进一步对样本的提取制备纯化等前处理方法进行优化, 减小样本基质对检测的影响。尽管如此, 固定化酶抑制率法可以作为一种快速的 OA 筛选方法得以应用。

目前用于 OA 检测常用方法有生物检测法、高效液相色谱-质谱联用等方法和免疫学检测等方法^[13-17]。但是这些方法在快速检测应用方面均存在一些限制因素, 如不便于现场操作、检测的周期较长等。本研究为建立快速、灵敏和可靠的检测 OA 的方法提供理论基础和依据, 这对进一步保证水产品安全, 促进水产品出口等具有重要现实意义。

4 结 论

以分离提取 PP2A 为原料, 根据 OA 抑制蛋白质磷 PP2A 酶活性的原理, 建立固定化 PP2A 酶抑制率法检测 OA 的方法, 并对最佳酶用量和固定化配比等 PP2A 酶固定化参数和酶活性影响因素进行优化; 以固定化 PP2A 酶抑制率法对大田软海绵酸标准溶液进行检测, 采取 4 参数 Logistic 曲线法进行拟合, 曲线的 R^2 值达 0.994, 拟合度较好, 制率法测定 OA 其检测限为 3.45 $\mu\text{g/L}$, 测定实际样品具有良好的准确性

和重复性, 可以作为一种快速检测和初步的 OA 筛选方法得以应用。

参考文献

[1] Vieites JM, Cabado AG. Incidence of marine toxins on industrial activity. in seafood and freshwater toxins [M]// Botana LM, Ed, Pharmacology, physiology and detection: CRC Press (Taylor and Francis Group): Boca Raton, FL, USA, 2008: 899–916.

[2] Burgess V, Shaw G. Pectenotoxins-an issue for public health (A review of their comparative toxicology and metabolism) [J]. Environ Int. 2001, 27: 275–283

[3] Lago J, Santaclara f, Vieites JM, *et al.* Collapse of mitochondrial membrane potential and caspases activation are early events in okadaic acid-treated Caco-2 cells [J]. Toxicon, 2005, 46(5): 579–586.

[4] Valdiglesias V, Laffon B, Pásaro E, *et al.* Okadaic acid induces morphological changes, apoptosis and cell cycle alterations in different human cell types [J]. J Environ Monit, 2011, 13: 1831–1840

[5] Ravindran J, Gupta N, Agrawal M, *et al.* Modulation of ROS/MAPK signaling pathways by okadaic acid leads to cell death via, mitochondrial mediated caspase-dependent mechanism [J]. Apoptosis, 2011, 16(2): 145–161.

[6] Takai A, Mieskes G. Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenyl phosphate phosphatase activity of protein phosphatases [J]. Biochem J, 1991, 275: 233–239.

[7] Ikehara T, Imamura S, Yoshino A, *et al.* PP2A inhibition assay using recombinant enzyme for rapid detection of okadaic acid and its analogs in shellfish [J]. Toxins, 2010, 2:195–204.

[8] 徐立红, 张甬元, 陈国胜, 等. 鱼肝中蛋白磷酸酶的分离纯化 [J]. 水生生物学报, 1995, 19(4): 379–381.

- Xu LH, Zhang YY, Chen GS, *et al.* Isolation and purification of fish protein phosphatase [J]. *Acta Hydrobiol Sinica*, 1995, 19(4): 379–381.
- [9] Xu L H, Lam PKS, Chen JP, *et al.* Use of protein phosphatase inhibition assay to detect microcystins in Donghu Lake and a fish pond in China [J]. *Chemosphere*, 2000, 41(1): 53–58.
- [10] Campas M, Iglesia P, Berre ME, *et al.* Enzymatic recycling-based amperometric immunosensor for the ultrasensitive detection of okadaic acid in shellfish [J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24: 716–722.
- [11] Hayat A, Barthelmebs L, Marty JL. A simple colorimetric enzymatic-assay for okadaic acid detection based on the immobilization of protein phosphatase 2A in sol-gel [J]. *Applied Biochem Biotechnol*, 2012, 166(1): 47–56.
- [12] 寇冬梅. 快速检测重金属离子的酶膜生物传感器及其应用研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- Kou DM. Study on fast detection technique for heavy metals and its application using enzymatic membrane biosensor [D]. Chongqing: Southwest University, 2008
- [13] 孟宪梅, 卢士英, 林超, 等. 大田软海绵酸致病性及检测方法研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(2): 152–156.
- Meng XM, Lu SY, Lin C, *et al.* Progress of pathogenicity and detecting methods of okadaic acid [J]. *China Anim Husb Vet Med*, 2011, 38(2): 152–156.
- [14] GB/T 5009.212-2008 贝类中腹泻性贝类毒素的测定[S].
- GB/T 5009.212-2008 Determination of diarrhetic shellfish poison in shellfish [S].
- [15] Elgarch A, Vale P, Rifai S, *et al.* Detection of diarrhetic shellfish poisoning and azaspiracids toxins in Moroccan mussels: comparison of LC-MS method with the commercial immunoassay kit [J]. *Mar Drugs*, 2008, 6: 587–594.
- [16] Gerssen A, Pol-Hofstad IE, Poelman M, *et al.* Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation [J]. *Toxins*, 2010, 2: 878–904.
- [17] Bradbury SL, Jakoby WB. Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: effects on aldehyde dehydrogenase [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1972, 69: 2373–2376.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



孙海燕, 实验师, 主要研究方向为水产品质量与安全。
E-mail: sunhy@zjou.edu.cn



袁高峰, 博士, 副教授, 主要研究方向为水产品质量与安全。
E-mail: yuangf@zjou.edu.cn