

番茄蛋白酶类劣变因子荧光传感器阵列检测技术研究

李梦瑶^{1,2}, 王书雅¹, 谢云峰¹, 刘云国^{3*}, 翟晨^{1*}

1. 中粮营养健康研究院营养健康与食品安全北京市重点实验室, 北京 102209
2. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830002
3. 临沂大学生命科学学院, 山东 临沂 276000

摘要 基于荧光光谱法原理, 结合免疫荧光法和荧光探针法, 建立了番茄蛋白酶类劣变因子荧光传感器阵列检测技术。该研究合成了能被果胶酶、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶抗体识别的量子点荧光探针, 基于抗原抗体特异性识别原理建立了果胶酶、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的免疫荧光光谱分析法, 并对其反应参数进行了优化, 在最优条件下, 通过研究其相应的荧光光谱变化规律, 发现果胶酶、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的活性检测范围分别为 $0.05\sim 500$, $0.02\sim 800$ 和 $0.5\sim 900\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 且其免疫荧光强度与果胶酶、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的活性呈线性关系, 相关系数分别为 $0.989\ 4$, $0.993\ 8$ 和 $0.981\ 9$, 最低检测限分别为 5.0×10^{-3} , 2.0×10^{-3} 和 $5.0\times 10^{-2}\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 与现有的分析法相比, 该方法操作简单, 线性范围宽, 检测限低。针对多酚氧化酶和羧酸酯酶的活性检测, 合成了能被羧酸酯酶和多酚氧化酶特异性识别的水溶性荧光探针, 并对其响应机制和反应参数进行探究。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pH 7.4 条件下通过研究其相应的荧光光谱变化规律, 发现羧酸酯酶和多酚氧化酶的存在可催化荧光团与探针中识别部分的价键裂解, 释放出近红外荧光团, 且荧光基团的释放量与羧酸酯酶($0.01\sim 0.3\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)及多酚氧化酶($10\sim 70\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)的活性呈线性相关, 其相关系数分别为 $0.991\ 0$ 和 $0.997\ 2$, 最低检测限分别为 3.4×10^{-3} 和 $1.1\times 10^{-2}\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。与现有的近红外荧光探针法相比, 合成的近红外荧光探针具有较好的水溶性, 且特异性较高。基于荧光光谱法原理, 利用荧光免疫法和荧光探针法相结合的荧光分析方法, 通过荧光酶标仪可针对不同荧光物质设置相应的激发波长和发射波长, 实现多个样品中多种酶活性的同时可视化阵列检测。通过样品加标回收实验, 结果表明回收率在 $90.0\%\sim 102.3\%$ 范围内, 变异系数 $< 15\%$, 且具有较好的特异性, 说明所建方法准确度好, 可应用于实际样品的检测。

关键词 蛋白酶; 荧光光谱; 荧光传感器; 荧光探针; 番茄

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)11-3477-06

引言

过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)、果胶酶(pectinases, PE)和羧酸酯酶(carboxylesterase, CXE)等蛋白酶类的活性的变化是评判果蔬等农副产品劣变程度的一个重要指标。CAT和SOD可以消除过氧化氢、活性氧等细胞代谢的有害物质, PPO催化多酚物质形成醌类化合物形成, 具有提高植物光合作用、增强植物防御能力和延缓衰老等作用^[1-2]。PE分解果胶质, 其主要与果蔬的后

熟、果肉软化、质地、色泽及果汁的含量有关, 有研究表明果胶酶与果蔬贮藏期间劣变程度呈负相关, 其活性的高低可以间接反映农副产品新鲜程度。CXE是一类广泛存在于动植物及微生物中具有 α/β 折叠结构域的水解酶类, 能有效地催化酯类和酰胺类化合物水解, 与多种药物、环境毒物及致癌物的解毒和代谢有关, 并参与脂质运输和代谢^[3-4]。目前, 对CAT, SOD, PPO, PE和CXE等相关蛋白酶类的检测方法有很多, 如色谱法、化学发光法、比色法、电化学分析法等^[5-8]。通过实际应用, 发现其操作繁琐、费时费力较难实现多酶同时检测。

免疫荧光法和荧光探针法因其具有简便性和较高的灵敏

收稿日期: 2019-10-29, 修订日期: 2020-02-14

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划项目(2016YFD0401204)资助

作者简介: 李梦瑶, 女, 1995年生, 中粮营养健康研究院营养健康与食品安全北京市重点实验室硕士研究生 e-mail: Mengyaolik@163.com

* 通讯联系人 e-mail: zhaichen@cofco.com

度等特点而得到了广泛的应用^[9, 11]。Zhou 等^[9]报道了一种新型溶酶体靶向荧光探针,其发射波长为 575 nm,用于检测活细胞、血清和组织中羧酸酯酶;Jin 等^[10]制备了一种新的近红外荧光探针,用于检测活细胞和小鼠内源性羧酸酯酶;免疫荧光分析技术已广泛地应用于微生物、农兽药残留、蛋白类毒素、重金属残留等方面的检测^[12-14]。目前,基于荧光光谱法,结合荧光免疫法和荧光探针法以实现多种酶活性同时检测的研究较少。本研究基于荧光光谱的检测原理,针对不同酶类的特性,合成了具有定向识别特异性的荧光探针,结合荧光免疫法和荧光探针法,开发了多酶同时检测荧光传感器阵列,实现多个样品中多种酶活性的一次性、可视化检测。

实验根据以荧光光谱信号的变化,对不同类型的探针合成条件和检测条件进行了优化。基于荧光光谱法,结合免疫荧光法和荧光探针,建立了番茄蛋白酶类劣变因子荧光传感器阵列检测技术,实现了对多个样品中多种酶活性的同时快速检测。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

IR-783 碘化物、间苯二酚、4-(氯甲基)苯基乙酸酯、CAT、SOD、PE、PPO、CXE 购自 Sigma-Aldrich 公司;抗体购自 Agrisera 公司;量子点(CdSe/ZnS)购自上海昆道生物科技有限公司;黑色 96 孔酶标板购自美国 Corning 公司。实验中使用的水为 Milli-Q 超纯水,0.05% PBS-T(pH 7.4 PBS 添加 0.05% Tween-20),其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

紫外分光光度计,日本 Hitachi 公司;荧光分光光度计,日本 Hitachi 公司;Synergy Mx 荧光酶标仪,美国 Bio-Tek 公司。

1.3 荧光免疫分析法

1.3.1 果胶酶、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶荧光探针的合成

量取 100 μL 量子点至 700 μL 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6.0 PBS 缓冲液中,加入 100 μL 3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NHS 和 100 μL 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ EDC 溶液,超声分散均匀,置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温培养箱中反应 30 min,于 8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的离心机中常温离心 10 min,去掉上清液。加入 1 mL 500 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 果胶酶(800 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 过氧化氢酶、900 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 超氧化物歧化酶)溶液复溶,超声分散均匀,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温培养箱中反应 1.5 h,离心 10 min,去掉上清液。加入 1 mL pH 7.4 的 PBS-T 溶液,超声分散均匀,在 250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床震荡 1 h,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用^[14]。

1.3.2 荧光免疫检测方法的建立

用 pH 7.4, PBS 缓冲液对果胶酶(过氧化氢酶/超氧化物歧化酶)抗体进行稀释,100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 添加至酶标板微孔中,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜;用 0.05% PBS-T 洗板三次除去多余的抗体;添加封闭液 1% BSA 250 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下封闭空白位点 1.5 h,用 0.05% PBS-T 洗涤三次;每孔加

入 50 μL 不同浓度的标准溶液(或样品溶液)和 50 μL 荧光探针溶液(PBS 稀释),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下持续反应 1 h。用 PBS-T 洗涤三次后每孔加入 100 μL PBS 缓冲液,用酶标仪测定其荧光光谱信号,设定激发波长为 375 nm,测定 570 nm(524 nm/622 nm)处的荧光光谱信号,绘制不同活性的果胶酶(过氧化氢酶/超氧化物歧化酶)标准品溶液的发射光谱。

1.4 近红外荧光探针法

1.4.1 羧酸酯酶和多酚氧化酶荧光探针的合成

羧酸酯酶荧光探针:将间苯二酚(110.0 mg, 1 mmol)和碳酸钾(138 mg, 1 mmol)溶解于乙腈(20 mL)中,在室温及氮气保护下搅拌 10 min,然后将溶解于乙腈(1 mL)中的 IR-783 碘化物(374.5 mg, 0.5 mmol)加入到体系中。将反应混合物在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 h,反应完毕,减压蒸除溶剂,得粗产品。用硅胶柱层析纯化粗产品,以二氯甲烷/甲醇(20:1, V/V)作洗脱剂,得到产物为蓝绿色粉末。

将上述合成的蓝绿色粉末(375 mg, 0.5 mmol)和碳酸钾(103.5 mg, 0.75 mmol)溶解于乙腈(4 mL)中,在室温及氮气保护下搅拌 10 min,然后将溶解于乙腈(1 mL)中的 4-(氯甲基)苯基乙酸(180 mg, 1.0 mmol)加入到混合溶液中,将反应混合物在 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 h。反应完毕,真空干燥除溶剂,得粗产品。用硅胶柱层析提纯粗产品,二氯甲烷/甲醇=10:1,得到产物为深蓝色固体,即为羧酸酯酶荧光探针。

多酚氧化酶荧光探针:合成步骤参考 Zhang 等^[15]的研究。

1.4.2 近红外荧光探针检测方法的建立

首先,配置探针储备液 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,在离心管中称取 3.27 mg 羧酸酯酶探针(3.06 mg 多酚氧化酶探针),加入 5 mL 二甲基亚砜(DMSO)。其次,在 5 mL 的具刻度管里,加入 4 mL 的 PBS 缓冲溶液(10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4)以及 50 μL 的探针的储备溶液,混合均匀后加入不同浓度的羧酸酯酶(多酚氧化酶)标准溶液,用 PBS 将溶液定容至 5 mL,混合均匀。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min(3 h)后,将 0.1 mL 反应溶液转移到酶标板中,在光谱仪上测量荧光强度 F 。设定激发波长为 670 nm,测定 705 nm(708 nm)处的荧光强度,绘制不同活性的羧酸酯酶(多酚氧化酶)标准品溶液的发射光谱。

1.5 方法学评价与应用

1.5.1 特异性实验

果蔬等样品的粗提液基质较为复杂,为了研究在最佳条件下其他物质是否会干扰酶的检测。本实验通过在相同条件下,对样本中各种可能存在的干扰物质,例如 NaCl、KCl、CaCl₂、抗坏血酸钠、葡萄糖、氨基酸(丝氨酸,苏氨酸)进行了探究。

1.5.2 样品预处理和加标回收实验

取新鲜的番茄,洗净晾干,于搅拌机中打碎 10 min,在冰浴状态下用研钵研磨至泥状。料液比按 1:2 的比例称取一定量的番茄泥,加入样品提取液(0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心机中以 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速进行离心 30 min,取上清液作为样本溶液。进行超高温加热处理,致使样本溶液中的酶失活,待其冷却至室温。添加一定量的标准品于样本溶液中,采用建立的方法对样本溶液进行分析。

2 结果与讨论

2.1 原理

2.1.1 荧光免疫检测方法原理

如图 1(a)所示,通过 1.3.1 制备量子点荧光探针。将抗体直接固定在酶标板的微孔中,向微孔中同时加入荧光探针和不同浓度的标准酶溶液。在此步骤中,标准溶液中的酶将与荧光探针竞争结合包被在酶标板上的固相抗体,形成荧光免疫复合物,用荧光酶标仪激发并检测所形成的荧光免疫复合物的荧光光谱信号,因此可将此性质用于果胶酶(过氧化

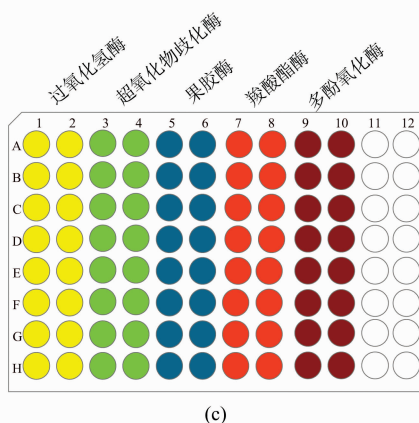
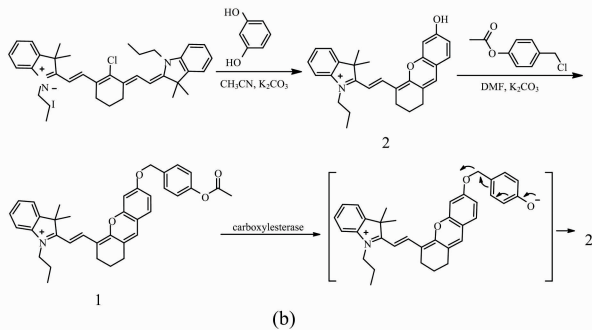
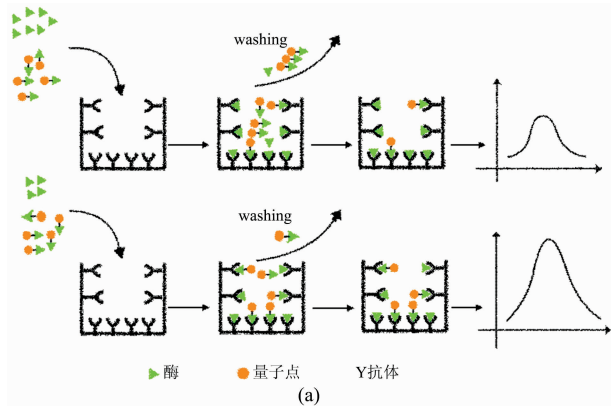


图 1 (a) 荧光免疫分析法检测原理; (b) 近红外荧光探针合成及其与羧酸酯酶的反应; (c) 多酶同时检测示意图

Fig. 1 (a) Principle of fluorescence immunoassay; (b) Synthesis of probe and its reaction with carboxylesterase; (c) Schematic of simultaneous detection of multiple enzymes

氢酶、超氧化物歧化酶)的活性检测; 荧光光谱信号的变化与酶的活性呈反比, 通过测定相关荧光光谱信号的变化可测定酶的活性。

2.1.2 近红外荧光探针法原理

如图 1(b)所示, 通过引入羧酸酯酶特异性识别基团 4-乙酰氧基苄, 合成了荧光探针即化合物 1, 其本身的荧光强度较低, 羧酸酯酶可导致化合物 1 中的高水溶性苯基乙酸酯水解、电子发生重排, 最终重新释放具有强荧光团的化合物 2, 该化合物在 706 nm 处具有较强荧光信号, 因此可将此性质用于羧酸酯酶检测; 荧光光谱信号的变化与羧酸酯酶的活性呈正比, 通过测定相关荧光信号的变化可测定羧酸酯酶的活性。基于此原理, 通过引入多酚氧化酶特异性识别基团 3-羟基苄氧基, 合成了特异强、检测限低的多酚氧化酶的识别近红外荧光探针。

2.1.3 同时检测原理

本研究基于荧光光谱阵列分析法的检测原理, 针对番茄中特征劣变蛋白酶的特性, 合成了具有定向特异性的荧光探针, 结合荧光免疫法和荧光探针法, 开发了多酶同时检测的荧光传感器阵列, 利用荧光酶标仪可针对不通荧光物质设置相应的激发波长和发射波长特点, 以及可以同时独立的检测多个样品的特性, 可实现多个样品中多种酶活性的同时快速可视化检测[图 1(c)]。

2.2 免疫荧光检测方法的建立

以果胶酶检测模型建立为例, 在最佳反应条件下 (pH 7.4 PBS 中 37 °C 反应 60 min), 考察了探针对不同浓度的果胶酶 (0, 0.05, 1, 50, 100, 200, 300, 400 和 500 U · mL⁻¹) 的荧光光谱信号的变化。由图 2(a)可知, 果胶酶的活性在 0.05~500 U · mL⁻¹ 范围内, 探针的荧光光谱信号呈现良好的线性关系, 线性回归方程 $\Delta F = 1.6964c(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) + 351.57$ ($R^2 = 0.9894$), 其中 ΔF 是探针在有果胶酶存在的条件下其荧光光谱信号的变化, 其最低检测限为 $5.0 \times 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

基于相同原理和方法, 建立过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的活性检测模型, 其中, 过氧化氢酶的线性范围为 0.02~800 U · mL⁻¹, 相关系数为 0.9938, 检测限 $2.0 \times 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; 超氧化物歧化酶的线性范围为 0.5~900 U · mL⁻¹, 相关系数为 0.9819, 检测限 $5.0 \times 10^{-2} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 羧酸酯酶荧光探针检测方法的建立

在最佳反应条件下 (pH 7.4 PBS 中 37 °C 反应 30 min), 考察了探针对不同浓度的羧酸酯酶 (0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6 和 1 U · mL⁻¹) 的荧光光谱信号的变化。由图 2(b)可知, 羧酸酯酶的活性在 0.01~0.3 U · mL⁻¹ 范围内, 探针的荧光光谱信号呈现良好的线性关系, 线性回归方程 $\Delta F = 1985.9c(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) + 160.7$ ($R^2 = 0.9910$), 其中 ΔF 是探针在有羧酸酯酶存在的条件下其荧光信号的变化。其最低检测限为 $3.4 \times 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。基于相同原理和方法, 建立了多酚氧化酶的活性检测模型, 线性范围为 10~70 U · mL⁻¹, 相关系数为 0.9972, 检测限 $1.1 \times 10^{-2} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

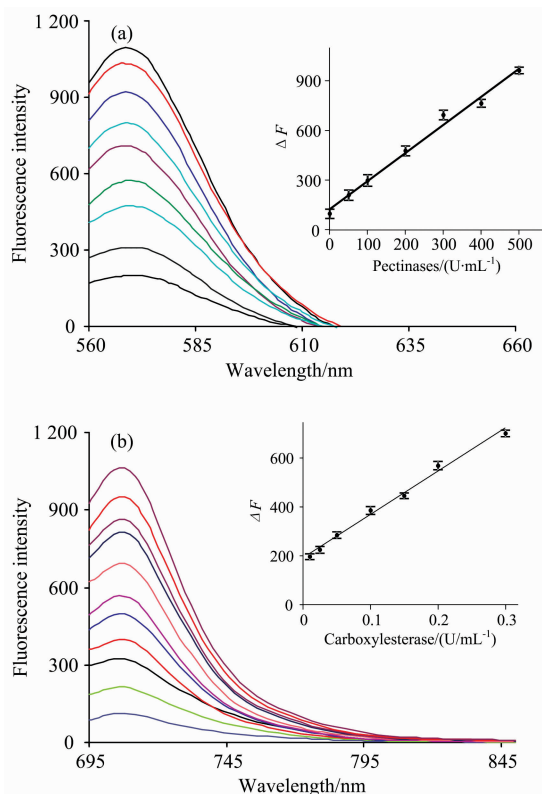


图 2 (a)果胶酶的荧光光谱图和线性关系图; (b) 探针 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与羧酸酯酶反应的荧光光谱和线性关系图

Fig. 2 (a) Fluorescence spectra and linear fitting curve of pectinases at different concentrations; (b) Fluorescence spectra of probe ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) reacting with carboxylesterase at different concentrations

2.4 特异性试验

以果胶酶荧光探针的特异性试验为例。本实验空白对照孔 ($50 \mu\text{L}$ PBS) 荧光强度 F_0 ，含有不同种类干扰物质 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 、 CaCl_2 、 NaCl 、 $15 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的抗坏血酸钠、葡萄糖、丝氨酸、苏氨酸) 和 $100 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 果胶酶标准品

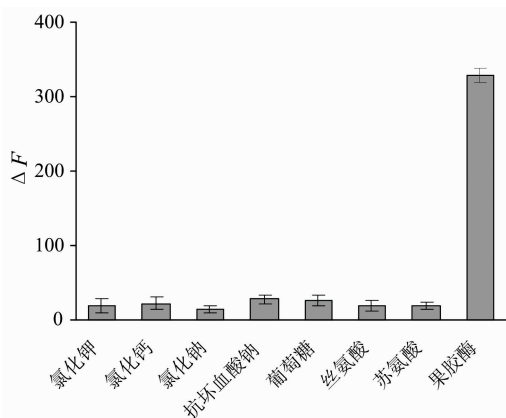


图 3 免疫荧光探针与其他干扰物的荧光响应信号
Fig. 3 Fluorescence responses of immune-fluorescent probes with other interferences

溶液的荧光强度 F ，以相对荧光强度 $\Delta F (\Delta F = F_0 - F)$ 考察不同抗原对免疫检测荧光信号的影响。如图 3 所示，和其他干扰物的荧光信号值相比，含有果胶酶的荧光响应信号值较高，这表明该探针对于果胶酶具有较好的选择性，且在复杂的样本生物环境中具有很高的特异性。基于相同的方法原理，对其他 4 种酶的荧光探针的特异性进行了研究，均表现出较好的选择性。

2.5 样品加标回收试验

该实验按照 1.5.2 步骤制备番茄样品提取液，并对五种酶进行三个梯度的加标回收，分别对每种酶进行五组平行试验，基于所开发的方法，对 72 个样品进行同时检测。实验结果如表 1 所示，应用该方法检测得到的回收率在 $90.0\% \sim 102.3\%$ 之间，变异系数 $< 15\%$ ，说明所建立方法准确度高，可应用于实际样品的检测。

表 1 番茄样品添加回收实验 ($n=5$)
Table 1 Addition and recycling experiment of sample ($n=5$)

酶种类	加标量/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测平均值/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	标准 偏差	回收率 /%	变异系 数/%
PE	0.1	0.09	0.006	90.0	6.7
	100.0	92.1	10.4	92.1	11.3
	300.0	277.6	23.1	92.5	8.3
CAT	0.2	0.18	0.008	90.0	4.4
	400.0	376.0	22.9	94.0	6.1
	600.0	568.0	45.7	94.7	8.1
SOD	1.0	0.95	0.1	95.0	10.5
	500.0	483.0	41.5	96.6	8.6
	600.0	572.0	47.9	95.3	8.4
PPO	20.0	20.2	2.7	101.1	13.4
	30.0	30.6	3.1	102.3	10.1
	50.0	49.8	3.9	99.7	7.8
CXE	0.15	0.14	0.012	93.3	8.6
	0.2	0.18	0.017	98.0	9.1
	0.3	0.28	0.023	93.0	8.0

3 结 论

基于荧光光谱法，结合免疫荧光法和荧光探针，建立了番茄蛋白酶类劣变因子荧光传感器阵列检测技术。实验以荧光信号的变化为指标，对荧光探针合成条件、检测时间及免疫荧光分析检测条件等参数进行优化。在最优条件下，分别建立果胶酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、羧酸酯酶和多酚氧化酶 5 种酶的检测模型，其相关系数分别为 0.989 4, 0.993 8, 0.981 9, 0.991 0 和 0.997 2，最低检测限分别为 5.0×10^{-3} , 2.0×10^{-3} , 5.0×10^{-2} , 3.4×10^{-3} 和 $1.1 \times 10^{-2} \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。基于多功能荧光酶标仪可针对不同荧光物质设置相应的激发波长和发射波长，通过一次扫描检测实现 5 种酶的同时可视化阵列检测技术，并对番茄样品进行加标回收试验，结果表明该方法回收率高，且具有较好的稳定性和特异性。所建立的方法可以实现样品中多种酶的同时、快速检测，为实际检测节省了大量时间，具有良好的应用前景。

References

- [1] DENG Hong-jun, MAO Lin-chun(邓红军, 茅林春). *Journal of Food Safety & Quality(食品安全质量检测学报)*, 2018, 9(11): 2744.
- [2] Gisela P O, Norma A M H, Ileana T, et al. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(3): 12770.
- [3] Park S J, Kim Y J, Kang J S, et al. *Analytical Chemistry*, 2018, 90: 9465.
- [4] Kodani S D, Barthelemy M, Kamita S G, et al. *Analytical Biochemistry*, 2017, 539: 81.
- [5] Hadwan M H. *BMC Biochemistry*, 2018, 19(1): 7.
- [6] Chiaki M, Satoru M, Sayaka K, et al. *Analytical Biochemistry*, 2017, 526: 43.
- [7] Levine S R, Beatty K E. *Chem. Commun.*, 2016, 52: 1835.
- [8] Zhao M J, Zhang T P, Yu F J, et al. *Biochem, Pharmacology*, 2018, 152: 293.
- [9] Zhou H, Tang J, Zhang J, et al. *J. Mater. Chem. B*, 2019, 7: 2989.
- [10] Jin Q, Feng L, Wang D D, et al. *Biosens. and Bioelectronics*, 2016, 83: 193.
- [11] LI Yan-dong, HAN Xue, WU Yu-yang, et al(李研东, 韩雪, 吴雨洋, 等). *Quality and Safety of Agro-Products(农产品质量与安全)*, 2017, (5): 83.
- [12] Liu Z, Liu S. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(17): 4145.
- [13] Ouyang S Y, Zhang Z W, He T, et al. *Toxins*, 2017, 9(4): 137.
- [14] Zhao L N, Hu S M, Meng Q W, et al. *Journal of Molecular Recognition*, 2018, 31(8): 2712.
- [15] Zhang J H, Li Z, Tian X W, et al. *Chem. Commun.*, 2019, 55: 9463.

Detection of Protease Deterioration Factor in Tomato by Fluorescence Sensor Array

LI Meng-yao^{1,2}, WANG Shu-ya¹, XIE Yun-feng¹, LIU Yun-guo^{3*}, ZHAI Chen^{1*}

1. Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing Key Laboratory of Nutrition & Health and Food Safety, Beijing 102209, China
2. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830002, China
3. College of Life Sciences, Linyi University, Linyi 276000, China

Abstract Based on fluorescence spectroscopy, combined with immunofluorescence and fluorescence probe, a fluorescence sensor array detection technology of tomato protease deterioration factor was established. In this study, a quantum dot fluorescent probe capable of being recognized by pectinase, catalase and superoxide dismutase antibodies was synthesized by carbodiimide method. Immunofluorescence analysis of pectinase, catalase and superoxide dismutase was established based on the principle of antigen-antibody specific recognition, and the influence of its reaction parameters was investigated. Under the optimized reaction conditions (60-min reaction time at 37 °C), the immunofluorescence intensity presented excellent linearity with the activities of pectinase, catalase and superoxide dismutase by studying the corresponding fluorescence spectrum changes. The detection range of activity was 0.05 ~ 500, 0.02 ~ 800 and 0.5 ~ 900 U · mL⁻¹, respectively. The correlation coefficients were 0.989 4, 0.993 8, 0.981 9, and the detection limits were 5.0 × 10⁻³, 2.0 × 10⁻³, 5.0 × 10⁻² U · mL⁻¹, respectively. Compared with the existing analysis method, the method is simple in operation, low detection line and linear range. Based on the near-infrared fluorescent probe method, a novel hydrosoluble near-Infrared fluorescence off-on probe has been developed for detecting carboxylesterase and polyphenol oxidase activities. The probe was designed by introducing (4-acetoxybenzyl)oxy and 3-hydroxybenzyloxy respectively as quenching and recognizing moiety to the decomposed product of IR-783, which exhibits excellent near-infrared fluorescence feature and good water solubility. The responding mechanism of the novel probe to carboxylesterase and polyphenol oxidase was investigated. By studying the corresponding fluorescence spectrum changes at 37 °C pH 7.4, it was found that the presence of carboxylesterase and polyphenol oxidase will cut off the bonds that connect the fluorophore with a recognition moiety in the probe, resulting in the release of the fluorophore, which achieves the purpose of detecting carboxylesterase and polyphenol oxidase. Moreover, the release amount of the fluorophore is linearly related to the activity of carboxylesterase (0.01 ~ 0.3 U · mL⁻¹) and polyphenol oxidase (10 ~ 70 U · mL⁻¹). This behaviour leads to the development of a simple and sensitive fluorescent method for assaying carboxylesterase and polyphenol oxidase activity, with detection limits of 3.4 × 10⁻³ and 1.1 × 10⁻² U · mL⁻¹, respectively. The correlation coefficients were 0.997 2 and 0.991 0, respectively. Compared

with the existing near-infrared fluorescent probe method, the near-infrared fluorescent probe synthesized in this study has better water solubility and higher specificity. The research realized the one-time and visual array detection of various enzyme activities in the sample, which is based on the multi-function fluorescent microplate reader to set the corresponding excitation wavelength and emission wavelength for different fluorescent substances. Through the sample spike recovery experiment, it is found that the recovery rate of the method is within the range of 90.0%~102.3%, the coefficient of variation is <15%, and it has good specificity, which indicated that the method established in this study has good accuracy and is expected to be applied.

Keywords Protease; Fluorescence spectrum; Fluorescent sensor; Fluorescent probe; Tomato

(Received Oct. 29, 2019; accepted Feb. 14, 2020)

* Corresponding authors

《光谱学与光谱分析》对来稿英文摘要的要求

来稿英文摘要不符合下列要求者，本刊要求作者重写，这可能要推迟论文发表的时间。

1. 请用符合语法的英文，要求言简意明、确切地论述文章的主要内容，**突出创新之处**。
2. 应拥有与论文同等量的主要信息，包括四个要素，即研究目的、方法、结果、结论。其中后两个要素最重要。有时一个句子即可包含前两个要素，例如“用某种改进的 ICP-AES 测量了鱼池水样的痕量铅”。但有些情况下，英文摘要可包括研究工作的主要对象和范围，以及具有情报价值的其他重要信息。在结果部分最好有定量数据，如检测限、相对标准偏差等；结论部分最好指出方法或结果的优点和意义。
3. 句型力求简单，尽量采用被动式，建议经专业英语翻译机构润色，与中文摘要相对应。用 A4 复印纸单面打印。
4. 摘要不应有引言中出现的内容，换言之，摘要中必须写进的内容应尽量避免在引言中出现。摘要也不要对论文内容作解释和评论，不得简单重复题名中已有的信息；不用非公知公用的符号和术语；不用引文，除非该论文证实或否定了他人已发表的论文。缩略语、略称、代号，除相邻专业的读者也能清楚地理解外，在首次出现时必须加以说明，例如用括号写出全称。