

唾液中富组氨酸多肽的免标记快速检测

肖赛金¹, 左 军¹, 董晓峰², 赵晓静¹, 张 立^{3*}

1. 东华理工大学江西省质谱科学与仪器重点实验室, 江西 南昌 330013
2. 东华理工大学, 机械与电子工程学院, 江西 南昌 330013
3. 南昌大学化学学院, 江西 南昌 330033

摘 要 唾液中含有一种多种生物活性成分, 包含部分可用于疾病诊断的生物标志物。相比于血液和尿液, 唾液的收集过程更为简便且其收集过程具有完全无创的优点。唾液代替血液、尿液在无创疾病诊断中的作用已日益显现。富组氨酸多肽是由唾液腺分泌的一类富含组氨酸的小分子阳离子多肽, 与口腔健康密切相关。近年研究更表明, 唾液富组氨酸多肽的浓度与 HIV-1、艾滋病等疾病相关。因此, 富组氨酸多肽的检测对于口腔健康监控、疾病诊断等具有重大的意义。根据叠氮基与富组氨酸结构域发生较强的氢键作用后给电子能力减弱的原理, 建立了富组氨酸多肽的免标记、快速检测方法。实验结果表明, 富组氨酸多肽——Histatin 5 与 3-叠氮基香豆素相互作用后, 荧光强度显著增加, 当 Histatin 5 浓度为 $0.23 \sim 31.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 荧光增加值与浓度呈现很好的线性关系, 线性相关系数 $r=0.994$, 检出限为 $72 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} (3\sigma/k)$ 。唾液中常见的游离氨基酸和蛋白质不干扰 Histatins 5 的测定。本方法已成功地测定了唾液中的富组氨酸多肽, 加标回收率在 $96.7\% \sim 111.6\%$ 之间, 表明本方法具有很好的准确性。与现有的唾液分析方法相比, 本方法具有简单快速、成本低的优点, 并有望为基于唾液的无创、非侵入性诊断提供新方法。

关键词 富组氨酸多肽; 唾液; Histatin 5; 3-叠氮基香豆素

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2016)09-2906-05

引 言

随着医疗技术的不断发展及人们对无创、非侵入性诊断的需求, 科学家越来越关注体液包括汗液、唾液、尿液等在疾病诊断中的应用价值。作为一种易收集的体液, 唾液在无创、非侵入性疾病诊断中的作用已日益显现^[1-2]。例如, Ramseier 等^[3]在唾液中发现了牙周病的疾病标志物 MMP-8 和 MMP-9 骨保护素, Blicharz^[4]及其同事在哮喘发作时发现唾液腺中的炎症性细胞因子增殖, Liu 等^[5]利用唾液诊断 HIV-1, Zhang 等^[6-7]研究发现唾液转录组标志物 KRAS, BMD3L2, ACRV1 等与胰腺癌密切相关等等。唾液富组氨酸多肽(Histatins)是由唾液腺分泌的一类富含组氨酸的小分子阳离子多肽的总称, 包括 Histatins 1-12^[8]。HRPs 与口腔健康密切相关, 对口腔真菌及龋病、牙周炎、粘膜病等相关细菌均具有抗菌活性^[9-11]。Histatins 5 是 Histatins 1 和 3 等的

降解产物, 在唾液中稳定存在。已有的研究表明, 唾液富组氨酸多肽具有抗白色念珠菌、变形链球菌等真菌的活性, 且其浓度与 HIV-1、艾滋病等疾病具有相关性^[12-14]。因此, 唾液中富组氨酸多肽的检测, 尤其是 Histatins 5 的检测对于口腔健康监控、疾病诊断等具有重要的意义。本研究以 Histatins 5 为富组氨酸多肽的代表, 建立了一种快速、简单、经济的唾液中富组氨酸多肽的荧光检测方法。因含有富电子基团, 3-叠氮基香豆素的荧光被猝灭^[15-16]。当其与 Histatins 5 相互作用时, 叠氮基可与 Histatins 5 的组氨酸结构域相互作用, 降低叠氮基的供电子能力, 从而 3-叠氮基香豆素的荧光逐渐恢复。基于此, 建立了一种新型的免标记的 Histatin 5 的检测方法, 当 Histatin5 浓度为 $0.23 \sim 31.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 3-叠氮基香豆素的荧光增加值与 Histatin 5 的浓度呈现很好的线性关系, 线性相关系数为 0.994 , 检测限为 $72 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} (3\sigma/k)$ 。唾液中常见的游离氨基酸和蛋白质不干扰 Histatins 5 的测定, 本方法已成功地测定了唾液中的富组

收稿日期: 2015-03-24, 修订日期: 2015-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(21205011, 21465003), 东华理工大学博士启动金项目(DHBK1006)和江西省重大科技创新研究项目(20124ACB00700)资助

作者简介: 肖赛金, 女, 1983年生, 东华理工大学江西省质谱科学与仪器重点实验室讲师 e-mail: xiaosj66@126.com

* 通讯联系人 e-mail: zhangli8@neu.edu.cn

氨酸多肽,回收率在96.7%~111.6%之间,表明本方法具有很好的准确性,并有望为唾液的无创、非侵入性诊断提供新思路和新方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

海洋光学 USB4000FL(海洋光学有限公司), SP-1900 紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司), H165OR 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), 雷磁 pH 计(上海精研有限公司)。

3-叠氮基香豆素(上海波以尔化工有限公司), Histatin 5(上海吉尔生化有限公司), 醋酸铵(广东汕头西陇化工厂), 醋酸和甲醇(ROE Scientific Inc. USA)实验所用试剂均为分析纯,实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 方法

1.2.1 Histatin 5 与 3-叠氮基香豆素的相互作用

将 3-叠氮基香豆素($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与不同浓度的 Histatin 5 加入到 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸-醋酸铵(pH 6.0)缓冲溶液中,混匀后在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 10 min,测定荧光。

1.2.2 甲醇对 Histatin 5 与 3-叠氮基香豆素相互作用的影响

将 $62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Histatin 5 加入到不同比例的甲醇溶液(0%~50%), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 1 h 后,加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸-醋酸铵缓冲溶液和 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3-叠氮基香豆素,混匀后在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 10 min,测定荧光。

1.2.3 唾液中富组氨酸多肽的检测

唾液的收集参考文献^[18]并有所修改,志愿者被要求咀嚼小片柠檬以刺激唾液的产生。分泌出的唾液用玻璃管收集,在水中煮沸 30 min 后,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $14\ 000 \text{ g}$ 离心 10 min,收集的唾液上清液于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用。为了测定唾液中的富组氨酸多肽,将 $100 \mu\text{L}$ 唾液上清液和 $100 \mu\text{L}$ $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3-叠氮基香豆素加入到 $300 \mu\text{L}$ $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸-醋酸铵缓冲溶液(pH 6.0)中,漩涡混匀后于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 10 min,测定荧光。

2 结果与讨论

2.1 3-叠氮基香豆素与 Histatin 5 的相互作用研究

因含有富电子的 $\alpha\text{-N}$ 原子,3-叠氮基香豆素的荧光被猝灭。当叠氮基的给电子能力减弱时,3-叠氮基香豆素的荧光将得到恢复^[16]。已有研究表明,3-叠氮基香豆素可通过氢键与漆酶富组氨酸的铜离子结合域相互作用,减弱叠氮基的给电子能力,从而 3-叠氮基香豆素的荧光得到恢复^[18]。从文献^[18]可以看到,富组氨酸结构域是 3-叠氮基香豆素荧光恢复的关键,据此推测富组氨酸的多肽和蛋白质均可能与 3-叠氮基香豆素形成氢键,从而使其荧光得到恢复。为了验证我们的猜想,选择唾液中的富组氨酸阳离子多肽——Histatin 为模型,研究其与 3-叠氮基香豆素的相互作用。Histatin 5 是唾液腺分泌的富组氨酸多肽,由 24 个氨基酸残基组成,其中

组氨酸残基数目为 7。因富含组氨酸残基为 α 螺旋构象, Histatin 5 可形成富组氨酸的结构域,并与叠氮基发生较强的氢键相互作用,从而使 3-叠氮基香豆素的荧光得到恢复。图 1(a)表示的是 3-叠氮基香豆素与 Histatin 5 相互作用的荧光光谱。单独的 3-叠氮基香豆素和 Histatin 5 的荧光强度都很弱(曲线 a 和 b)。当二者共存时,溶液的荧光强度显著增强(曲线 c),说明 Histatin 5 与叠氮基发生了相互作用,从而使其给电子能力减弱,最终导致 3-叠氮基香豆素的荧光恢复。同时考察了二者相互作用的吸收光谱,如图 1(b)所示。3-叠氮基香豆素在 345 nm 有一个较强的吸收峰, Histatin 5 则在 286 nm 具有较强的吸收,二者相互作用后,在 275 nm 出现了一个新的吸收峰,表明 3-叠氮基香豆素与 Histatin 5 相互作用生成了新的物质。

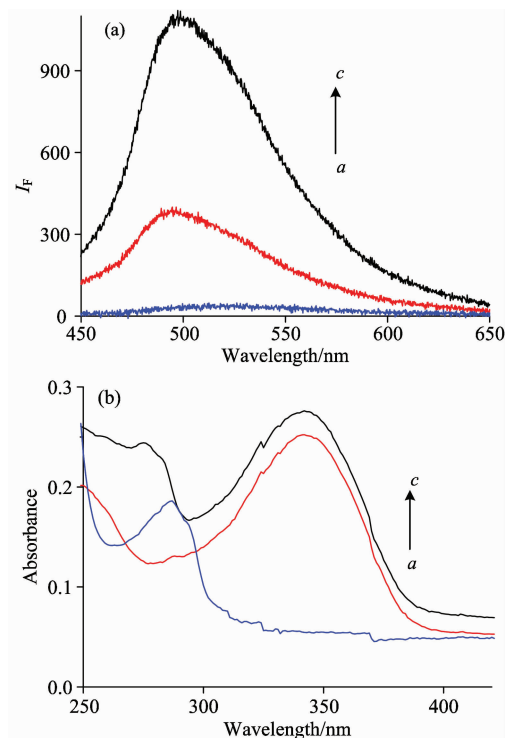


图 1 反应体系在不同溶液中的荧光发射光谱(a)和紫外-可见吸收光谱(b)

a: Histatin 5; b: 3-叠氮基香豆素;

c: 3-叠氮基香豆素与 Histatin 5 的混合物

$[\text{3-叠氮基香豆素}] = 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{Histatin 5}] = 62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 1 Fluorescence spectra (a) and UV-vis spectra (b) of the sensing system in different solutions

a: Histatin 5; b: 3-azidocoumarin;

c: The mixture of 3-azidocoumarin and Histatin 5

$[\text{3-azidocoumarin}] = 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{Histatin 5}] = 62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.2 3-叠氮基香豆素与 Histatin 5 相互作用的机理研究

据文献报道,漆酶铜离子结构域中的组氨酸可与叠氮基形成氢键相互作用,减弱叠氮的给电子能力,使 3-叠氮基香豆素的荧光恢复^[18]。为了说明组氨酸在 3-叠氮基香豆素荧光恢复中可能发挥的作用,考察了组氨酸与 3-叠氮基香豆素的相互作用。当组氨酸与 3-叠氮基香豆素相互作用后,3-叠

氨基香豆素的荧光略有恢复[图 2(a)], 但荧光恢复程度显著低于 Histatin 5, 表明组氨酸虽可部分减弱叠氮基的给电子能力, 但并不是引起 3-叠氮基香豆素荧光恢复的主要原因。据此, 可推测 Histatin 5 的富组氨酸结构域可能是导致 3-叠氮基香豆素荧光恢复的主要原因。为了验证上述猜想, 研究了不同浓度甲醇存在下, Histatin 5 与 3-叠氮基香豆素的荧光光谱[图 2(b)]。甲醇通过提供自己羟基上的氢形成氢键, 从而破坏了蛋白质中原有的氢键, 使蛋白质变性。从图 2(b) 可以看到, 当没有甲醇时, Histatin 5 与 3-叠氮基香豆素相互作用, 荧光显著增强。当甲醇浓度逐步增加时, Histatin 5 的构象逐渐被破坏, 与 3-叠氮基香豆素的氢键结合能力减弱, 从而荧光恢复程度降低。上述结果表明, 3-叠氮基香豆素的荧光恢复与 Histatin 5 的二维结构密切相关。

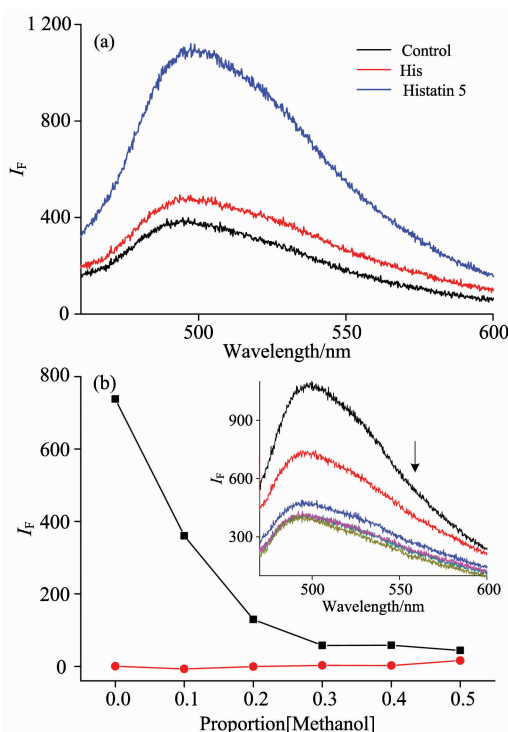


图 2 3-叠氮基香豆素与 Histatin 5 反应的机理研究

(a): 组氨酸和 Histatin 5 分别与 3-叠氮基香豆素反应的荧光发射光谱; (b): 甲醇影响

[3-叠氮基香豆素] = $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [Histatin 5] = $62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [组氨酸] = $62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 2 Mechanism study of the interaction between 3-azidocoumarin and Histatin 5

(a): The fluorescence spectra of Histidine and Histatin 5;
(b): The influence of methanol

[3-azidocoumarin] = $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [Histatin 5] = $62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [His] = $62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3 灵敏度和选择性

当不同浓度的 Histatin 5 与 3-叠氮基香豆素相互作用后, 溶液的荧光强度随着 Histatin 5 浓度的增加而逐步增强[图 3(a)]. 当 Histatin 5 浓度为 $0.23 \sim 31.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 3-叠氮基香豆素的荧光强度增加值与其浓度呈现很好的线性

关系, 线性方程为: $\Delta I_F = 6.49 + 13.47c \text{ Histatin 5}$, 线性相关系数 r 为 0.994, 检测限为 $72 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($3\sigma/k$). 进一步考察了唾液中常见的氨基酸和蛋白质对 Histatin 5 与 3-叠氮基香豆素相互作用的影响, 如图 3(b) 所示。只有 Histatin 5 可引起 3-叠氮基香豆素荧光的增强, 唾液中常见的氨基酸和蛋白质, 如苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、溶菌酶等等都不会引起 3-叠氮基香豆素荧光的显著增强, 表明本方法具有检测唾液中富组氨酸多肽的潜能。

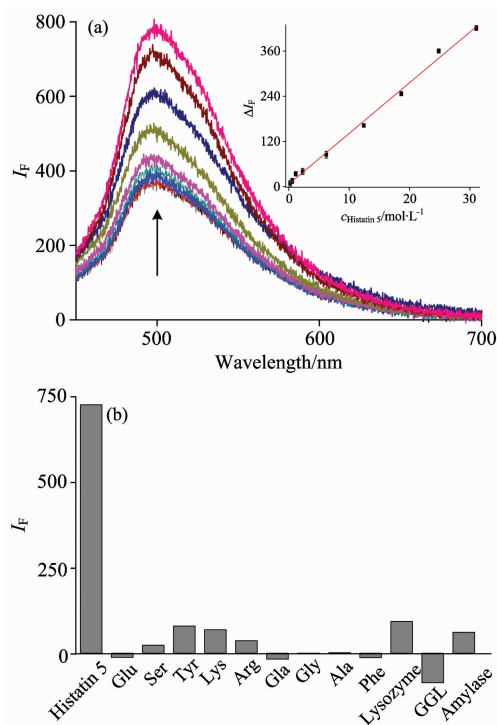


图 3 (a) 不同浓度 Histatin 5 与 3-叠氮基香豆素反应的荧光发射光谱; (b) 检测系统对 Histatin 5 检测的特异性

(a): [3-叠氮基香豆素] = $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Histatin 5 的浓度从下到上分别为: 0.23, 0.56, 1.15, 2.30, 6.21, 12.42, 18.63, 24.84, $31.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (b): [3-叠氮基香豆素] = $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [Histatin 5] = $62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [其他] = $62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 3 (a) fluorescence emission spectra in the presence of various concentrations of Histatin 5; (b) specificity of the sensing system for Histatin 5 over other potential interferences

(a): [3-azidocoumarin] = $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; The concentrations of Histatin 5 from down to top are 0.23, 0.56, 1.15, 2.30, 6.21, 12.42, 18.63, 24.84, $31.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (b): [3-azidocoumarin] = $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [Histatin 5] = $62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [Others] = $62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.4 唾液中富组氨酸多肽的检测

为了验证本方法是否可应用于唾液中富组氨酸多肽的分析, 通过加标回收法考察了方法的实用性和准确性。唾液的收集方法参考文献[1]并有所修改, 表 1 为唾液上清液与 3-叠氮基香豆素相互作用的结果, 从表中可以看到, 唾液中的富组氨酸浓度为 $0.54 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与文献报道的值较接

近^[19]。而后,通过加入一定浓度的 Histatin 5 标准溶液,进一步验证了本方法的准确性。从结果可以看出,本方法的加标回收率在 96.7%~111.6%之间,表明本方法具有很好的准确性,并有望为基于唾液的无创、非侵入性诊断提供新思路和新方法。

表 1 唾液中富组氨酸多肽的检测

Table 1 Detection of histidine-rich peptides in saliva

样品 编号	样品本底值 ^a /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	加标量 /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	加标后测定值 /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率 /%	RSD /%
1	0.54	2.30	2.85	100.4	1.09
2	0.54	6.21	7.47	111.6	0.48
3	0.54	12.42	13.34	103.3	2.05

a: The results were obtained from five pararell samples

3 结 论

作为一种易收集的体液,唾液在无创、非侵入性疾病诊

断中的作用已日益显现。唾液富组氨酸多肽是由唾液腺分泌的一类富含组氨酸的小分子阳离子多肽的总称,与口腔健康密切相关,且其浓度与 HIV-1、艾滋病等疾病具有相关性。因此,唾液中富组氨酸多肽的检测对于口腔健康监控、疾病诊断等具有重要的意义。以 Histatins 5 为富组氨酸多肽的代表,基于 3-叠氮基香豆素与 Histatin 5 富组氨酸结构域的特异性相互作用,建立了一种新型的免标记的 Histatin 5 的荧光检测方法。当 Histatin 5 浓度为 0.23~31.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,3-叠氮基香豆素的荧光增加值与 Histatin 5 的浓度呈现很好的线性关系,线性相关系数为 0.994,检测限为 72 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($3\sigma/k$)。唾液中常见的游离氨基酸和蛋白质不干扰 Histatins 5 的测定,本方法已成功地测定了唾液中的富组氨酸多肽,加标回收率在 96.7%~111.6%之间,表明本方法具有很好的准确性,并有望为基于唾液的无创、非侵入性诊断提供新思路和新方法。

References

- [1] Thomadaki K, Helmerhorst E J, Tian N, et al. J. Dent. Res., 2011, 90: 1325.
- [2] Davidopoulou S, Theodoridis H, Nazer K, et al. J. Oral. Microbiol., 2014, 6: 26156.
- [3] Ramseier C A, Kinney J S, Herr A E, et al. J. Periodontol., 2009, 80: 436.
- [4] Blicharz T M, Siqueira W L, Helmerhorst E J, et al. Anal. Chem., 2009, 81: 2106.
- [5] Liu C, Geva E, Mauk M, et al. Analyst, 2011, 136: 2069.
- [6] Zhang L, Farrell J J, Zhou H, et al. Gastroenterology, 2010, 138: 949.
- [7] Floriano P N, Christodoulides N, Miller C S, et al. Clin. Chem., 2009 55: 1530.
- [8] MIAO Yan, HAO Yu-qing(苗 燕,郝玉庆) Int. J. Stomatol.(国际口腔医学杂志), 2007, 34: 271.
- [9] Sun X, Salih E, Oppenheim F G, et al. FASEB J., 2009, 23: 2691.
- [10] Borgwardt D S, Martin A D, Van Hemert J R, et al. Sci. Rep., 2014, 4: 3904.
- [11] Oppenheim F G, Helmerhorst E J, Lendenmann U, et al. PLoS One, 2012, 7: e51479.
- [12] Thomadaki K, Bosch J A, Oppenheim F G, et al. J. Oral. Dis., 2013, 19: 781.
- [13] Khan S A, Jr P L F, Thunayyan A A, et al. J. AIDS Clin. Res., 2013, 4: 1000193.
- [14] Peters B M, Zhu J, Jr P L F, et al. FEMS Yeast Res., 2010, 10: 597.
- [15] Qiu S, Miao M, Wang T, et al. Biosens. Bioelectron., 2013, 42: 332.
- [16] Sivakumar K, Xie F, Cash B M, et al. Org. Lett., 2004, 6: 4603.
- [17] Thomadaki K, Helmerhorst E J, Tian N, et al. J. Dent. Res., 2011, 90: 1325.
- [18] Qiu S, Lin Z, Zhou Y, et al. Anal. Chem., 2013, 85: 11041.
- [19] Campese M, Sun X, Bosch J A, et al. J. Arch. Oral. Biol., 2009, 54: 345.

Label-Free and Rapid Detection of Histidine-Rich Peptides in Saliva

XIAO Sai-jin¹, ZUO Jun¹, DONG Xiao-feng², ZHAO Xiao-jing¹, ZHANG Li^{3*}

1. East China Institute of Technology, Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, Nanchang 330013, China

2. School of Mechanical and Electronic Engineering, East China Institute of Technology, Nanchang 330013, China

3. School of Chemistry, Nanchang University, Nanchang 330033, China

Abstract Saliva as a kind of biomarker containing a variety of bioactive components can be used to help disease diagnosis. Compared with the urine and blood, the collection of saliva is more simple and convenient while the collection process is completely non-invasive. Therefore, saliva detection attracts more and more attention in non-invasive disease diagnosis. Histatins are a family of small, cationic, histidine-rich peptides, which secreted by salivary bringing innate defense of the oral cavity. It has been reported that histatins are related to many other diseases, such as HIV and AIDs. Thus the detection of histatins in saliva is significantly important for oral healthy monitoring and disease diagnosis. In this paper, a new label free method for rapid detection of histidine-rich peptides was developed based on the fact that histidine-rich peptides can interact with 3-azidocoumarin through hydrogen bonds which decreases the electron-donating ability of the azido group and results in fluorescence enhancement of the system. The results showed that the fluorescence intensities were dramatically increased when histatin 5 were incubation with 3-azidocoumarin. There is a good relationship with the linear r of 0.994 between the enhanced fluorescence and histatin 5 concentration ranging from 0.23 to 31.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the limit of detection is 72 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($3\sigma/k$). Moreover, the detection of histidine-rich peptides in saliva was successfully achieved by the new developed label free method since amino acids and proteins in saliva will not be interfered with the detection with the recoveries between 96.7%~111.6%. Compared with the existing saliva analysis methods, this method has the advantage of simple, fast and low cost. It might be applied in non-invasive disease diagnosis.

Keywords Histidine-rich peptides; Saliva; Histatin 5; 3-Azidocoumarin

(Received Mar. 24, 2015; accepted Jul. 22, 2015)

* Corresponding author