



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110294720 B

(45) 授权公告日 2021.05.07

(21) 申请号 201810247083.2

(22) 申请日 2018.03.23

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110294720 A

(43) 申请公布日 2019.10.01

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院

地址 518057 广东省深圳市南山区高新园
南区粤兴一道18号香港理工大学学
研大楼205室

(72) 发明人 潘雪华

(74) 专利代理机构 深圳中一专利商标事务所

44237

代理人 黄志云

(51) Int. Cl.

C07D 277/66 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104592985 A, 2015.05.06

EP 3034621 A1, 2016.06.22

CN 106480166 A, 2017.03.08

Chung K. Nguyen et

al..Superparamagnetic nanoparticles as a
recyclable catalyst: a new access to
phenol esters via cross dehydrogenative
coupling reactions.《RSC Advances》.2017,第
7卷第55756-55766页.Satyasheel Sharma et al..Cu(II)-
catalyzed oxidative esterification of 2-
carbonyl substituted phenols from the
alcohol oxidation level.《Tetrahedron》
.2013,第69卷第9391-9397页.熊浩等.胆碱酯酶荧光探针的研究进展.《中
国科学:化学》.2017,第47卷(第8期),第933-944
页.

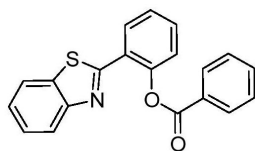
审查员 徐建国

权利要求书1页 说明书9页 附图3页

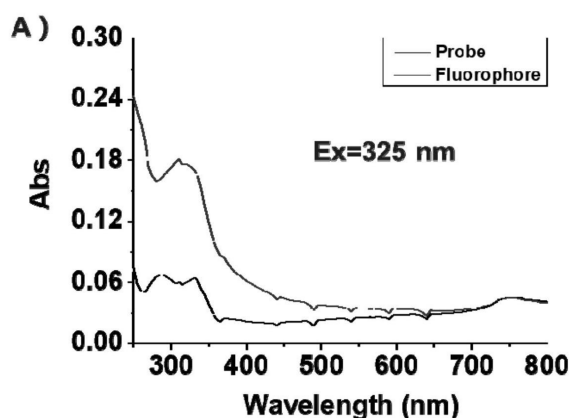
(54) 发明名称

用于检测丁酰胆碱酯酶的荧光探针及其应
用

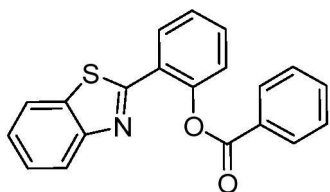
(57) 摘要

本发明提供了一种用于检测丁酰胆碱酯酶
活性的荧光探针,所述荧光探针为非肽类荧光探
针,且所述非肽类荧光探针的结构如下式1所示:

式1。



1. 一种荧光探针在制备检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒中的用途,其特征在于,所述荧光探针为非肽类荧光探针,且所述非肽类荧光探针的结构如下式1所示:



式 1。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述非肽类荧光探针用于检测丁酰胆碱酯酶时,所述非肽类荧光探针的苯甲酰基作为识别基团,与所述丁酰胆碱酯酶结合。

3. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述非肽类荧光探针用于检测丁酰胆碱酯酶时,所述丁酰胆碱酯酶与所述非肽类荧光探针的摩尔用量比为 $1\mu\text{M}:(1-100)\mu\text{M}$ 。

4. 一种检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒,其特征在于,包括如权利要求1-3任一项所述非肽类荧光探针和丁酰胆碱酯酶的标准品。

5. 如权利要求4所述的检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒,其特征在于,还包括浓度为 $50-100\text{mM}$ 的Tris-HCl缓冲溶液。

6. 一种如权利要求4所述的检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

提供丁酰胆碱酯酶标准品、丁酰胆碱酯酶待测样品和非肽类荧光探针;

将所述丁酰胆碱酯酶标准品和所述非肽类荧光探针混合反应,得到荧光团反应产物;检测激发光刺激下的反应产物的荧光强度变化值随时间的变化值,获取丁酰胆碱酯酶-荧光强度变化值标准曲线,得到丁酰胆碱酯酶-荧光强度变化值线性方程;

在与所述丁酰胆碱酯酶标准品相同的检测条件下,将所述丁酰胆碱酯酶待测样品和所述非肽类荧光探针混合反应,得到荧光团反应产物;检测激发光刺激下的反应产物的荧光强度变化值,代入所述丁酰胆碱酯酶-荧光强度变化值线性方程中,计算获得所述丁酰胆碱酯酶待测样品的浓度。

7. 如权利要求6所述的检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述激发光的波长为 325nm ,在所述激发光刺激下的所述荧光团反应产物的荧光的发射波长为 460nm 。

8. 如权利要求6所述的检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述混合反应的条件为:温度为 $25-37^{\circ}\text{C}$,pH值为 $6-8$,时间为 $5-30\text{min}$ 。

9. 如权利要求6所述的检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒的使用方法,其特征在于,将所述丁酰胆碱酯酶标准品或所述丁酰胆碱酯酶待测样品与所述非肽类荧光探针混合反应的步骤,在浓度为 $50-100\text{mM}$ 的Tris-HCl缓冲液中进行。

10. 一种如权利要求1-3任一项所述非肽类荧光探针在丁酰胆碱酯酶检测领域的应用,其特征在于,所述应用包括所述荧光探针用于检测丁酰胆碱酯酶活性,所述荧光探针用于丁酰胆碱酯酶抑制剂或促进剂的动力学表征领域的应用。

用于检测丁酰胆碱酯酶的荧光探针及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,尤其涉及一种用于检测丁酰胆碱酯酶的荧光探针及其应用。

背景技术

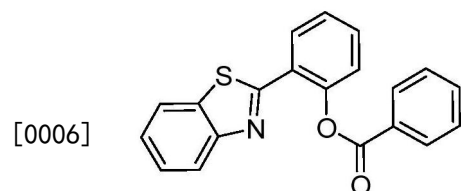
[0002] 丁酰胆碱酯酶(BChE)是存在于生物体内的一种乙酰胆碱同工酶,它是由肝脏合成的一种非特异性酯酶,由于该酶在肝脏中合成后立即释放到血浆中,因此,血清中BChE活性是测定肝细胞蛋白质合成功能的灵敏指标。随着检测技术和临床诊疗水平的不断提高,丁酰胆碱酯酶除了用于评估肝脏储备功能,还扩展到恶性肿瘤、神经系统性疾病、心血管疾病、代谢综合症等众多疾病的检测和诊断领域当中。现有测定丁酰胆碱酯酶活性的方法主要有两种。第一种是毒剂和蛋白质加合物的分析检测,主要是通过质谱分析手段来检测神经性毒剂(GB, GD和VX)与血浆中的丁酰胆碱酯酶结合形成的加合产物来达到检测目的。第二种方法则是氟离子重活化法,主要是神经性毒剂将丁酰胆碱酯酶磷酸化,再与氟离子作用后,神经性毒剂的磷酸基部分可以从胆碱酯酶中释放出来,而再生的有机氟磷酸酯可以用GC、GC-MS等手段进行检测,同时也可以利用大体积进样技术来测定低浓度的再生有机氟磷酸酯。以上两种方法不仅操作过程较为复杂,均需要昂贵的大型仪器与检测费用才能实现,而且只能用于多肽类荧光探针的检测。由于多肽类荧光探针存在稳定性差、储运条件苛刻、原子利用率低、荧光强度弱等缺点,因此,设计开发基于非肽类的荧光探针及其检测方法,显得十分迫切和重要。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种用于检测丁酰胆碱酯酶的荧光探针及其应用,旨在解决本发明的目的在于克服现有技术中丁酰胆碱酯酶的检测方法需要依赖昂贵的大型仪器设备、且检测过程复杂的问题,而多肽类荧光探针存在稳定性差、储运条件苛刻、原子利用率低、荧光强度弱的问题。

[0004] 为实现上述发明目的,本发明采用的技术方案如下:

[0005] 本发明一方面提供一种用于检测丁酰胆碱酯酶活性的荧光探针,所述荧光探针为非肽类荧光探针,且所述非肽类荧光探针的结构如下式1所示:



式 1。

[0007] 本发明另一方面提供一种检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒,包括如上述非肽类荧光探针和丁酰胆碱酯酶的标准品。

[0008] 本发明再一方面提供一种检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒的使用方法,包括以下

步骤:

[0009] 提供丁酰胆碱酯酶标准品、丁酰胆碱酯酶待测样品和非肽类荧光探针;

[0010] 将所述丁酰胆碱酯酶标准品和所述非肽类荧光探针混合反应,得到荧光团反应产物;检测激发光刺激下的反应产物的荧光强度变化值随时间的变化值,获取丁酰胆碱酯酶-荧光强度变化值标准曲线,得到丁酰胆碱酯酶-荧光强度变化值线性方程;

[0011] 在与所述丁酰胆碱酯酶标准品相同的检测条件下,将所述丁酰胆碱酯酶待测样品和所述非肽类荧光探针混合反应,得到荧光团反应产物;检测激发光刺激下的反应产物的荧光强度变化值,代入所述丁酰胆碱酯酶-荧光强度变化值线性方程中,计算获得所述丁酰胆碱酯酶待测样品的浓度。

[0012] 以及,本发明还提供一种非肽类荧光探针在丁酰胆碱酯酶检测领域的应用,所述应用包括所述荧光探针用于检测丁酰胆碱酯酶活性,所述荧光探针用于筛选丁酰胆碱酯酶抑制剂或促进剂,所述荧光探针用于丁酰胆碱酯酶抑制剂或促进剂的动力学表征领域的应用。

[0013] 本发明提供的用于检测丁酰胆碱酯酶活性的荧光探针为非肽类荧光探针,具有稳定性强、原子利用率高、荧光强度高、储运条件灵活的特点。用于检测丁酰胆碱酯酶活性时,丁酰胆碱酯酶待测样品与所述非肽类荧光探针接触后可产生荧光团(Fluorophore),通过检测荧光团在激发光下发出的荧光的强度,实现丁酰胆碱酯酶活性检测的目的。与现有的多肽类底物荧光探针相比,本发明实施例提供的用于检测丁酰胆碱酯酶活性的非肽类荧光探针具有专一性高和荧光强度变化显著的优点,因此,与所述丁酰胆碱酯酶具有更好的亲和力,检测具有更高的灵敏度,从而能够快速简便、有效地检测丁酰胆碱酯酶活性。

[0014] 本发明提供的检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒,由于采用所述非肽类荧光探针作为检测探针,因此,具有使用简单方便,检测灵敏度高的优点。

[0015] 本发明提供的检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒的使用方法,通过丁酰胆碱酯酶标准品获得丁酰胆碱酯酶-荧光强度线性方程后,将检测到的丁酰胆碱酯酶待测样品的荧光强度代入方程中即可获得,方法简单,准确度高。

[0016] 本发明提供的非肽类荧光探针在丁酰胆碱酯酶检测领域的应用,应用领域广泛,且能得到准确度高的检测结果。

附图说明

[0017] 图1是本发明实施例提供的激发光扫描图;

[0018] 图2是本发明实施例提供的荧光团的发射波长扫描图;

[0019] 图3是本发明实施例提供的非肽类荧光探针与氨基酸底物的选择结果示意图;

[0020] 图4是本发明实施例提供的非肽类荧光探针与金属离子底物的选择结果示意图;

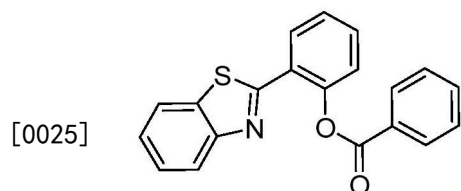
[0021] 图5是本发明实施例提供的非肽类荧光探针与水解底物的选择结果示意图。

具体实施方式

[0022] 为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0023] 在本发明的描述中,需要理解的是,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。在本发明的描述中,“多个”的含义是两个或两个以上,除非另有明确具体的限定。

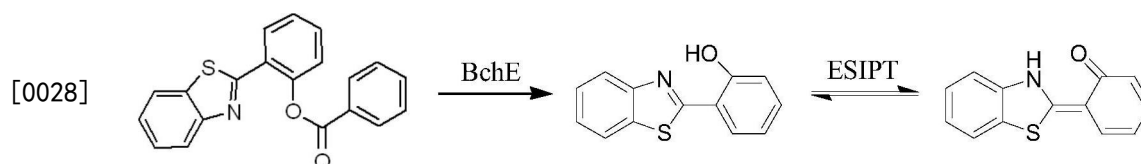
[0024] 本发明实施例提供了一种用于检测丁酰胆碱酯酶活性的荧光探针,所述荧光探针为非肽类荧光探针,且所述非肽类荧光探针的结构如下式1所示:



式 1。

[0026] 本发明实施例提供的用于检测丁酰胆碱酯酶活性的荧光探针为非肽类荧光探针,具有稳定性强、原子利用率高、荧光强度高、储运条件灵活的特点。用于检测丁酰胆碱酯酶活性时,丁酰胆碱酯酶待测样品与所述非肽类荧光探针接触后可产生荧光团,通过检测荧光团在激发光下发出的荧光的强度,实现丁酰胆碱酯酶活性检测的目的。与现有的多肽类底物荧光探针相比,本发明实施例提供的用于检测丁酰胆碱酯酶活性的非肽类荧光探针具有专一性高和荧光强度变化显著的优点,因此,与所述丁酰胆碱酯酶具有更好的亲和力,检测具有更高的灵敏度,从而能够快速简便、有效地检测丁酰胆碱酯酶活性。

[0027] 本发明实施例中,所述非肽类荧光探针用于检测丁酰胆碱酯酶时,所述非肽类荧光探针的苯甲酰基作为识别基团,与所述丁酰胆碱酯酶(BchE)结合。本发明实施例中,所述丁酰胆碱酯酶与所述非肽类荧光探针结合产生荧光团的原理为:所述非肽类荧光探针的苯甲酰基与丁酰胆碱酯酶结合,生成中间态化合物,所述中间态化合物发生激发态分子内质子转移(ESIPT),生成荧光团,进而通过检测荧光团在激发光下的荧光强度,所述荧光强度指示待测样品中丁酰胆碱酯酶的活性,达到检测丁酰胆碱酯酶的目的。其反应方程式如下所示:



[0029] 本发明实施例中,如图1所示,所述激发光的波长为325nm,如图2所示,所述荧光团的发射波长为460nm。其中,Wavelength表示波长,Probe表示非肽类荧光探针,Fluorophore表示荧光团。

[0030] 在相同的条件下,将不同的底物与所述非肽类荧光探针结合后,在相同的激发光和发射波长条件下检测荧光强度,所述非肽类荧光探针与氨基酸底物、金属离子底物、水解底物的选择性分别如图3-5所示,由图可见,本发明实施例所述非肽类荧光探针对于所述丁酰胆碱酯酶具有高度专一性。

[0031] 进一步的,本发明实施例中,用于检测丁酰胆碱酯酶活性的荧光探针的用量与待测丁酰胆碱酯酶样品及此类探针的性质有关。所述非肽类荧光探针的用量需要能够表征丁

酰胆碱酯酶待测样品的活性。优选的,所述非肽类荧光探针用于检测丁酰胆碱酯酶时,相对于待测样品中每 $1\mu\text{M}$ 的丁酰胆碱酯酶,所述荧光探针的用量为 $1\text{--}100\mu\text{M}$,即所述丁酰胆碱酯酶与所述非肽类荧光探针的摩尔用量比为 $1\mu\text{M}:(1\text{--}100)\mu\text{M}$ 。为了达到最佳的检测效果,所述荧光探针的用量优选为 $1\text{--}10\mu\text{M}$,即所述丁酰胆碱酯酶与所述非肽类荧光探针的摩尔用量比为 $1\mu\text{M}:(1\text{--}10)\mu\text{M}$ 。

[0032] 本发明实施例对丁酰胆碱酯酶样品与非肽类荧光探针接触后的荧光团的荧光强度的检测,优选在酶标仪或荧光分光光度计中进行,可以采用时间依赖性检测的方法获得丁酰胆碱酯酶在接触过程中催化荧光素衍生物水解的荧光光谱随时间变化的情况,获得荧光强度随时间变化的增加值。此外,还可以采用多次重复试验和设置若干对照组的方式保证检测的可靠性。

[0033] 本发明实施例提供了一种检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒,包括如上述非肽类荧光探针和丁酰胆碱酯酶的标准品。

[0034] 本发明实施例提供的检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒,由于采用所述非肽类荧光探针作为检测探针,因此,具有使用简单方便,检测灵敏度高的优点。

[0035] 优选的,本发明实施例提供的检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒中,还包括浓度为 $50\text{--}100\text{mM}$ 的Tris-HCl缓冲溶液。浓度为 $50\text{--}100\text{mM}$ 的所述Tris-HCl缓冲溶液,能够给所述丁酰胆碱酯酶提供稳定合适的环境,从而提高检测的准确性。进一步的,所述Tris-HCl缓冲溶液的pH为7.0,且含有浓度 10mM 的 CaCl_2 。

[0036] 具体的,检测丁酰胆碱酯酶活性时,在将所述丁酰胆碱酯酶与所述非肽类荧光探针接触前,先将适量的含丁酰胆碱酯酶的待测样品、 $10\mu\text{M}$ 非肽类荧光探针分别与 $50\text{--}150\mu\text{L}$ 所述Tris-HCl缓冲液混合,从而更好地提高检测的准确性和稳定性。

[0037] 本发明实施例提供了一种检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0038] S01.提供丁酰胆碱酯酶标准品、丁酰胆碱酯酶待测样品和非肽类荧光探针;

[0039] S02.将所述丁酰胆碱酯酶标准品和所述非肽类荧光探针混合反应,得到荧光团反应产物;检测激发光刺激下的反应产物的荧光强度变化值随时间的变化值,获取丁酰胆碱酯酶-荧光强度变化值标准曲线,得到丁酰胆碱酯酶-荧光强度变化值线性方程;

[0040] S03.在与所述丁酰胆碱酯酶标准品相同的检测条件下,将所述丁酰胆碱酯酶待测样品和所述非肽类荧光探针混合反应,得到荧光团反应产物;检测激发光刺激下的反应产物的荧光强度变化值,代入所述丁酰胆碱酯酶-荧光强度变化值线性方程中,计算获得所述丁酰胆碱酯酶待测样品的浓度。

[0041] 本发明实施例提供的检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒在零下 20°C 至 4°C 的条件下保存。

[0042] 本发明实施例提供的检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒的使用方法,通过丁酰胆碱酯酶标准品获得丁酰胆碱酯酶-荧光强度线性方程后,将检测到的丁酰胆碱酯酶待测样品的荧光强度代入方程中即可获得,方法简单,准确度高。

[0043] 具体的,上述步骤S01中,所述非肽类荧光探针的结构、非肽类荧光探针与丁酰胆碱酯酶的作用原理以及非肽类荧光探针与丁酰胆碱酯酶的用量比如上文所述,为了节约篇幅,此处不再赘述。

[0044] 上述步骤S02中,将所述丁酰胆碱酯酶标准品或所述丁酰胆碱酯酶待测样品与所述非肽类荧光探针混合反应的步骤,反应需要在反应缓冲液中进行,进一步优选的,在浓度为50-100mM的Tris-HCl缓冲液中进行,使得所述丁酰胆碱酯酶标准品或所述丁酰胆碱酯酶待测样品与所述非肽类荧光探针稳定均匀地反应,提高检测准确度。

[0045] 为了保证检测过程中丁酰胆碱酯酶标准品、丁酰胆碱酯酶待测样品的活性,所述混合反应的条件为:温度为25-37℃,pH值为6-8,时间为5-30min。进一步优选的,所述混合反应的条件为:温度为25-30℃,pH值为6.5-8.0,时间为10-25min。

[0046] 应当理解的是,本发明实施例所述混合反应在避光条件下进行,并对混合反应的容器进行预热,以保持待测样品的生物活性。优选的,所述混合反应的容器为黑色平底孔板、比色杯或酶标板,并且在接触前将参加混合反应各组份及反应容器预热至适宜的反应温度,预热所要达到的温度优选为25-37℃。

[0047] 本发明实施例中,所述激发光的波长为325nm,在所述激发光刺激下的所述荧光团反应产物的荧光的发射波长为460nm。

[0048] 上述步骤S03中,在与所述丁酰胆碱酯酶标准品相同的检测条件下,将所述丁酰胆碱酯酶待测样品和所述非肽类荧光探针混合反应,得到荧光团反应产物;检测激发光刺激下的反应产物的荧光强度变化值,代入所述丁酰胆碱酯酶-荧光强度变化值线性方程中,计算获得所述丁酰胆碱酯酶待测样品的浓度。

[0049] 作为一个具体优选实施例,所述检测丁酰胆碱酯酶活性的试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0050] 配置10mM非肽类荧光探针的DMSO溶液,并且在零下20℃至4℃下避光保存。将丁酰胆碱酯酶标准品用0.1M的Tris-HCl(含有10mM CaCl₂,pH=7.0)缓冲液溶解,配制成100U/ml的丁酰胆碱酯酶标准品溶液,并以10倍的稀释度进行梯度稀释。将含有丁酰胆碱酯酶的待测样品用100μL的100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl₂,pH=7.0)缓冲液溶解。

[0051] 分别将0.2mL的Tris-HCl(含有10mM CaCl₂,pH=7.0)缓冲液,用于检测丁酰胆碱酯酶的基于ESIPT机理的非肽类荧光探针、待测的丁酰胆碱酯酶样品和丁酰胆碱酯酶标准品加入于黑色酶标板中。利用本发明实施例所述的检测丁酰胆碱酯酶活性的方法检测待测样品和丁酰胆碱酯酶标准品中丁酰胆碱酯酶的活性。

[0052] 以检测到的梯度稀释的丁酰胆碱酯酶标准品的荧光强度变化值绘制标准曲线,通过比对确定被检测的样品中丁酰胆碱酯酶的活性。

[0053] 以及,本发明实施例提供了一种非肽类荧光探针在丁酰胆碱酯酶检测领域的应用,所述应用包括所述荧光探针用于检测丁酰胆碱酯酶活性,所述荧光探针用于筛选丁酰胆碱酯酶抑制剂或促进剂,所述荧光探针用于丁酰胆碱酯酶抑制剂或促进剂的动力学表征领域的应用。

[0054] 本发明实施例提供的非肽类荧光探针在丁酰胆碱酯酶检测领域的应用,应用领域广泛,且能得到准确度高的检测结果。

[0055] 作为一种具体实施方式,采用所述荧光探针用于检测丁酰胆碱酯酶活性。具体的,包括采用所述荧光探针用于检测丁酰胆碱酯酶活性对单独的丁酰胆碱酯酶活性进行检测,也包括对含有丁酰胆碱酯酶活性的酶体系进行检测。本发明实施例中,所述非多肽荧光探针还可以用于弹性蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和羧肽酶中的一种或多种的酶活性的

测定。其中,当待测样品中含有弹性蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和羧肽酶中确定的一种时,本发明实施例所提供的所述非多肽荧光探针分子可以用于测定样品中含有的已知种类的丁酰胆碱酯酶的活性(即根据探针与靶标的作用情况来比较其选择性大小,判断待测酶是否为BChE);当待测样品中含有弹性蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和羧肽酶中的一种但不能确定具体为哪一种时,采用所述非多肽荧光探针还进行检测,获得未知种类的丁酰胆碱酯酶催化所述非多肽荧光探针还水解的米氏常数,从而判断样品中所含有的丁酰胆碱酯酶的种类(通过获得的米氏常数,与标准品相对照得知其种类);此外,本发明实施例提供的所述非多肽荧光探针还可以应用于同时检测样品中含有的多种丁酰胆碱酯酶的总的活性,从而对被测样品中含有丁酰胆碱酯酶的总的活性进行分析。

[0056] 作为另一种实施方式,所述荧光探针用于筛选丁酰胆碱酯酶抑制剂或促进剂。作为一个具体实施例,分别将含有特定浓度的丁酰胆碱酯酶、一定浓度的丁酰胆碱酯酶抑制剂或有机化合物溶液以及50-100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl₂, pH=7.0)置于30℃恒温水槽中预热;同时,将黑色平底96孔板置于30℃孵育箱中预热。随后,使适量的已经预热的Tris-HCl(含有10mM CaCl₂, pH=7.0)缓冲溶液、相同体积的各种丁酰胆碱酯酶抑制剂和适量的荧光探针与丁酰胆碱酯酶接触。并用酶标仪或者全功能的荧光分光光度计对样品的荧光强度进行时间依赖性的监测,观察其荧光强度值,再用软件(ORIGINLAB)绘制标准曲线计算IC₅₀等相关数值。

[0057] 值得注意的是,当本发明实施例的试剂盒用于丁酰胆碱酯酶抑制剂或促进剂的筛选时,由于反应体系中的胆碱酯酶活性在加了未知抑制剂后都会有变化,如果抑制剂一直有效果,那么体系中的底物被水解的少,因此,可以将所述丁酰胆碱酯酶抑制剂在检测前以适当比例或粘度添加于反应混合液中。随后加入适量的丁酰胆碱酯酶标准品启动反应,反应的条件为25-37℃,时间为5-30min。

[0058] 下面结合具体实施例进行说明。

[0059] 本发明以下实施例中所使用的大豆胰蛋白酶抑制剂购自玛雅公司编号为10063,硅胶层析柱为欣维尔公司产品。酶标仪购自Molecular Devices公司,型号SpectraMax M5。式(1)所示结构中荧光团部分按照文献(Journal of Organic Chemistry, 78(22), 11184-11193; 2013)中记载的方法制备得到。

[0060] 以下实施例中所使用的酶的来源及参数如下:

[0061] 乙酰胆碱酯酶购自a-Aldrich(C1682)比活力 $\geq 1,500\text{U/mg}$

[0062] 丁酰胆碱酯酶购自Sigma-Aldrich(C1057)比活力 $\geq 900\text{U/mg}$

[0063] 牛血清蛋白购自百灵威科技公司(109636)纯度为98%

[0064] 猪胰弹性蛋白酶购自玛雅公司(10095)比活力 $\geq 30\text{U/mg}$

[0065] 胰蛋白酶购自玛雅公司(10020)比活力 $\geq 250\text{U/mg}$

[0066] 人中性粒细胞弹性蛋白酶购自玛雅公司(E8140)比活力 $\geq 50\text{U/mg}$

[0067] 丁酰胆碱酯酶购自玛雅公司(10001)比活力 $\geq 1500\text{U/mg}$

[0068] 羧肽酶购自Worthington(CLS005304)比活力 $\geq 170\text{U/mg}$

[0069] 以下实施例中荧光强度变化率($\Delta F/\Delta t$)按照以下公式计算:

[0070]
$$\frac{\Delta F}{\Delta t} = \frac{F_2 - F_1}{t_2 - t_1}$$

[0071] 其中, F_2 表示 t_2 时刻样品的荧光强度, F_1 表示 t_1 时刻样品的荧光强度。

[0072] 紫外可见吸收值的变化率($\Delta A / \Delta t$)按照以下公式计算:

$$[0073] \quad \frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{A_2 - A_1}{t_2 - t_1}$$

[0074] 其中, A_2 表示 t_2 时刻样品在325nm处的紫外可见吸收值, A_1 表示 t_1 时刻样品在325nm处的紫外可见吸收值。

[0075] 实施例1

[0076] 本实施例用于说明本发明提供的式(1)所示化合物对丁酰胆碱酯酶活性进行检测的方法。

[0077] 将1mg丁酰胆碱酯酶样品溶解于100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl_2 , pH=7.0)缓冲液中并进行梯度稀释,按表1中给出的浓度配制不同浓度的丁酰胆碱酯酶标准品溶液,将配置获得的丁酰胆碱酯酶标准品溶液置于30℃恒温水槽中预热;同时将黑色平底96孔板置于30℃孵育箱中预热。随后,各取40 μ L已预热的丁酰胆碱酯酶标准品溶液于预热的黑色平底96孔板中,再加入120 μ L 100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl_2 , pH=7.0)缓冲液,并设置阴性对照组(只加160 μ L的缓冲液),在避光条件下,将40 μ L式(1)所示结构的非肽类探针分别与丁酰胆碱酯酶标准品及对照组缓冲液接触,用酶标仪对各丁酰胆碱酯酶标准品溶液及对照组溶液在325nm的激发光下的接触后荧光强度进行动力学扫描,获得第5-10分钟内的荧光强度的变化率,结果列于表1。

[0078] 表1

[0079]	实 施 例 1	丁酰胆碱酯酶标准品 (mg/L)	荧光强度变化率 ($\Delta F / \Delta t$)
		0	0
		0.001	4.7558
		0.002	10.4438
		0.005	23.463
		0.01	47.46636
		0.02	94.26912

[0080] 通过实施例1的结果可以看出,利用本发明实施例所述非多肽荧光探针检测丁酰胆碱酯酶活性,可以对样品中的丁酰胆碱酯酶的活性进行简单灵敏的检测,提高检测灵敏度和亲和力。

[0081] 实施例2

[0082] 本实施例用于说明利用式(1)所示的非肽类荧光探针对弹性蛋白酶、丁酰胆碱酯酶、胰蛋白酶、羧肽酶活性进行测定的方法。



[0084] 分别将各丁酰胆碱酯酶样品溶解于100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl_2 , pH=7.0)缓冲液中并进行稀释,配成浓度为0.01mg/L的酶溶液;同时将黑色平底96孔板置于30℃孵

育箱中预热。随后,各取40 μ L已预热的酶溶液于预热的黑色平底96孔板中,再加入120 μ L 100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl₂,pH=7.0)缓冲液,并设置阴性对照组(只加160 μ L的缓冲液),在避光条件下,将40 μ L式(1)所示结构的探针分别与酶溶液及对照组接触,用酶标仪对酶标准品溶液及对照组溶液在325nm的激发光下的接触后荧光强度进行动力学扫描,获得第5-10分钟内的荧光强度的变化率,结果列于表2。

[0085] 表2

[0086]	实施例 2	酶样 (0.01 mg/L)	信号强度变化率 ($\Delta F/\Delta t$)
		弹性蛋白酶	53.04
		丁酰胆碱酯酶	209.03
		胰蛋白酶	26.67
		羧肽酶	8.94
		—	1.74

[0087] 通过实施例2的结果可以看出,本发明实施例所提供的方法中能够对多种丁酰胆碱酯酶进行有效、快速和简便的活性测试,本发明所提供的采用非肽类荧光探针进行检测的方法,荧光强度变化明显,检测的灵敏度和亲和力高,作为荧光探针时荧光强度的变化更明显,检测的灵敏度更高。

[0088] 测试例1

[0089] 本测试例用于说明本发明提供的丁酰胆碱酯酶活性检测方法的专一性。

[0090] 分别将1mg待测样品(乙酰胆碱酯酶、丁酰胆碱酯酶、牛血清白蛋白、弹性蛋白酶、糜蛋白酶、胰蛋白酶和羧肽酶)溶解于100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl₂,pH=7.0)缓冲液中配置浓度为0.01mg/L的待测样品的溶液并置于30℃恒温水槽中预热;同时将黑色平底96孔板置于30℃孵育箱中预热。随后,各取40 μ L已预热的待测样品的溶液于预热的黑色平底96孔板中,再加入120 μ L 100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl₂,pH=7.0)缓冲液,在避光条件下,将10 μ L式(1)所示结构的非肽类探针分别与各个待测样品接触,同时设置未加待测样品的对照组,用酶标仪在325nm的激发光下检测10分钟内各种待测样品催化10 μ L式(1)所示非肽类荧光探针水解的相对速率,结果如图5所示,可见,所述非肽类荧光探针水解能力明显的高于其他种类的酶,因此,基于ESIPT机理的非肽类荧光探针对丁酰胆碱酯酶有高度的专一性。

[0091] 实施例3

[0092] 本实施例用于说明根据本发明的丁酰胆碱酯酶抑制剂的筛选方法。

[0093] 将1mg丁酰胆碱酯酶样品溶解于100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl₂,pH=7.0)缓冲液中配置丁酰胆碱酯酶浓度为0.05mg/mL的待测丁酰胆碱酯酶标准品溶液,将丁酰胆碱酯酶抑制剂塔克林溶解于1mL 100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl₂,pH=7.0)缓冲液中配置成浓度梯度为0.1、1、4、7、10、20 μ M的抑制剂溶液,将0.01mmol式(1)所示结构的荧光探针溶解于10mL 100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl₂,pH=7.0)缓冲液中配置成浓度为1mM的荧光探针溶液,分别将配置获得的丁酰胆碱酯酶标准品溶液、丁酰胆碱酯酶抑制剂塔克林溶液和荧光探针溶液置于30℃恒温水槽中预热;同时将黑色平底96孔板置于30℃孵育箱中预热。随后,分别将40 μ L各浓度梯度的丁酰胆碱酯酶抑制剂塔克林溶液、100 μ L 100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl₂,pH=7.0)缓冲液和40 μ L荧光探针(终浓度为5 μ M)溶液加入到黑色平底96

孔板中混合为实验组,并设立140 μ L 100mM Tris-HCl(含有10mM CaCl₂,pH=7.0)缓冲液和40 μ L荧光探针溶液混合的对照组,在避光条件下,分别在实验组和对照组中用排枪迅速加入20 μ L丁酰胆碱酯酶标准品溶液启动反应。最后用酶标仪分别对实验组和对照组荧光强度的变化和紫外可见吸收值的变化进行检测,结果列于表3。

[0094] 表3

[0095]	实施例 3	抑制剂浓度 (μ mol/L)	信号强度变化率 ($\Delta F/\Delta t$)
		0	92.34
[0096]		0.1	60.96
		1	50.14
		4	31.26
		7	17.36
		10	12.89
		20	8.54

[0097] 通过实施例3的结果可以看出本发明所提供的非肽类荧光探针能够用于丁酰胆碱酯酶抑制剂的筛选。并且,值得一提的是,本发明实施例提供的丁酰胆碱酯酶抑制剂的筛选方法,其荧光信号的变化范围较大易于检测的进行,而多肽类底物荧光探针的紫外可见吸收值的变化率小(需精确至小数点后两位数字)不易于检测的进行,本发明实施例所提供的基于ESIPT机理的非肽类荧光探针具有更高的原子经济性。

[0098] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

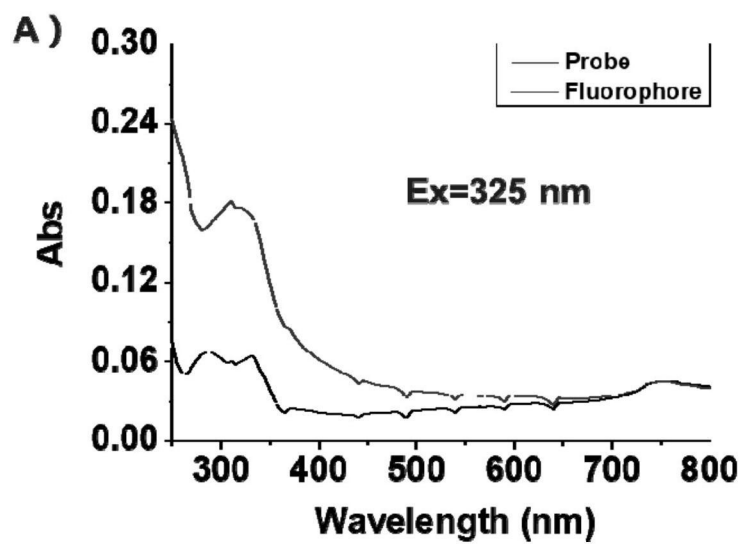


图1

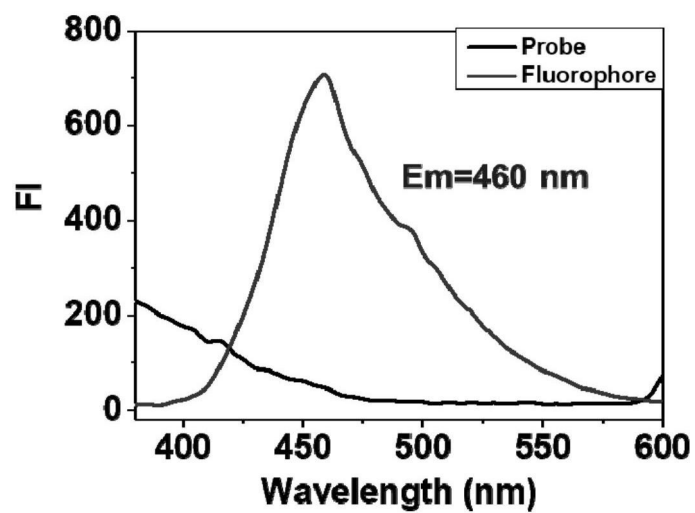


图2

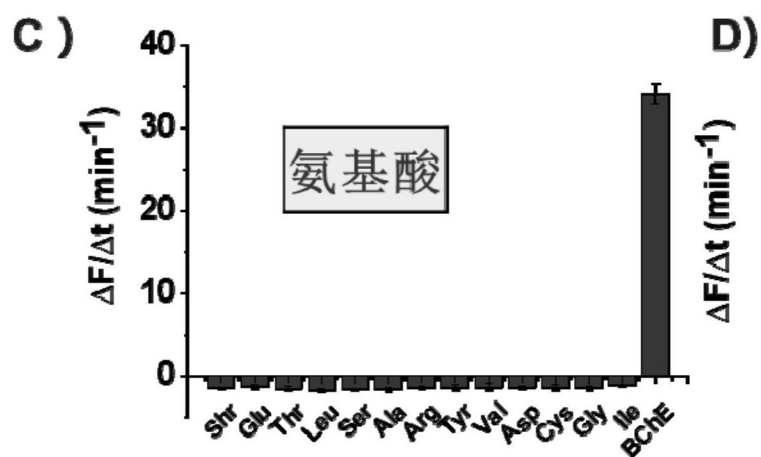


图3

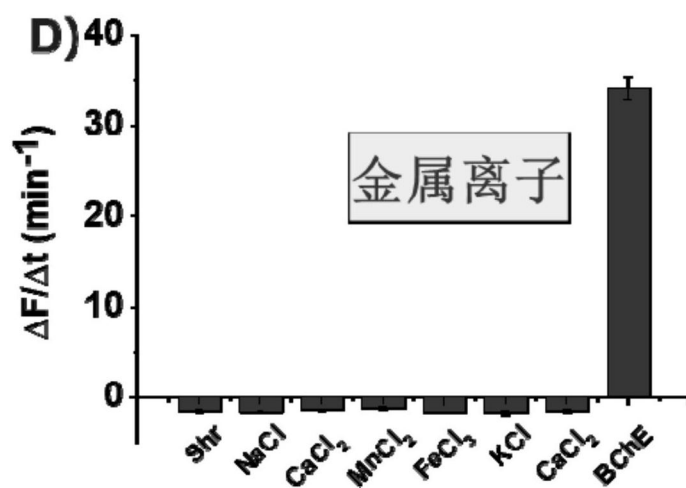


图4

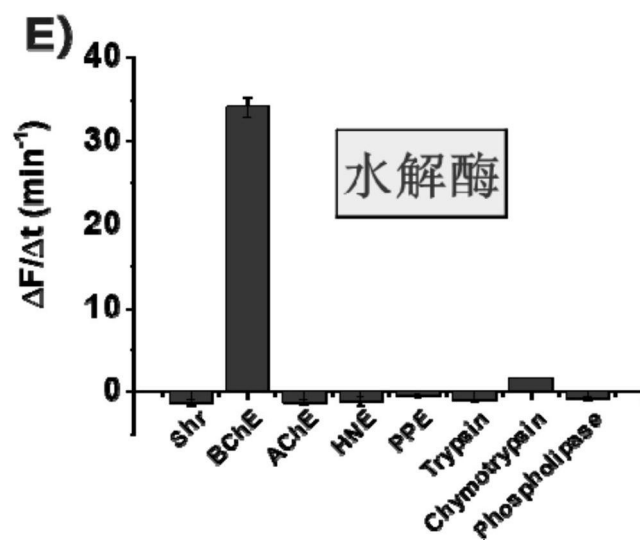


图5