

基于多肽微阵列芯片的荧光和 共振光散射法筛选凝血酶抑制剂

苏敏^{1,2} 李桃^{*1} 刘殿骏¹ 王振新^{*1}

¹(中国科学院长春应用化学研究所,电分析化学国家重点实验室,长春 130022)

²(中国科学院大学,北京 100049)

摘要 研制了一种基于多肽微阵列芯片的荧光和共振光散射双通路检测方法,对血液样品中的凝血酶抑制剂进行检测。以生物素化的多肽微阵列芯片为反应平台,加入凝血酶水解多肽上的特异位点使其 C 末端的生物素解离,通过亲和素和生物素之间的特异性结合,用荧光探针和 30 nm 金纳米粒子探针标记此反应过程。凝血酶抑制剂阻止凝血酶对底物多肽的水解反应,通过荧光和共振光散射信号强度的变化检测抑制剂的抑制能力。酶溶液和加标人血清中测定的半抑制浓度(IC_{50})值:阿加曲班 < 抗凝血酶 III < 4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐酸盐, IC_{50} 差的绝对值随抑制剂特异性的减弱而增大。当抑制剂浓度为 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,血浆中 5 种化合物的抑制能力:阿加曲班 > 抗凝血酶 III > 胰蛋白酶抑制剂 > N-(反式-环氧丁二酰基)-L-亮氨酸-4-胍基丁基酰胺 > 4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐酸盐。在血浆中考察了阿加曲班和抗凝血酶 III 的可逆性。对比荧光法和共振光散射法在血液样品中的检测结果,用 30 nm 金纳米粒子标记的共振光散射法更适用于复杂血液样品中抑制剂的检测

关键词 多肽微阵列; 金纳米粒子探针; 共振光散射; 半抑制浓度; 凝血酶抑制剂

1 引言

蛋白酶是水解蛋白质肽键的一类酶的总称,凝血酶是一种重要的蛋白酶,主要参与血液凝结核联反应,使血液凝结核成块阻止血液流失^[1]。凝血酶与血栓栓塞性疾病的诊断和治疗密切相关^[2],以凝血酶为靶点的抗凝血药物是临床用于治疗血栓的主要药物^[3],开发高效、价格低廉的抗凝血药物是目前药理学研究热点^[4,5]。

微阵列生物芯片技术可以在一张芯片上集成多种生物化学反应,能够实现对生物活性物质高效快速地测试和分析^[6,7]。固定蛋白酶或蛋白酶特异底物的微阵列芯片可以同时分析多种抑制剂与蛋白酶之间的作用机理和作用效率^[8,9]。Uttamchandani 等用蛋白微阵列芯片同时检测了 3 种化合物对 4 种半胱氨酸蛋白酶的抑制效率^[10]; Neumann 等用小分子微阵列芯片从近 10 万个有机小分子中筛选出了 6 种能与凝血酶活性位点结合的化合物^[11]。迄今为止,仍鲜有使用多肽微阵列芯片在血液样品中筛选凝血酶抑制剂的报道。

本研究利用多肽微阵列芯片反应平台,荧光(Fluorescence)和共振光散射(Resonance Light Scattering, RLS)双检测手段,在血液样品中检测凝血酶抑制剂的抑制效率。双通路检测手段提高了检测结果的准确性,在加标血清和血浆中检测并比较了 5 种化合物对凝血酶的抑制能力,并研究了在血浆中两种抑制剂对凝血酶抑制作用的可逆性。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

晶芯[®] SmartArrayer[™]136 微阵列芯片点样系统和晶芯[®] LuxScan10K 微阵列芯片扫描仪(北京博奥生物技术有限公司); PMC082 芯片离心机(美国 ChipMate 公司); SpotWare[™] 芯片扫描系统(美国 Arrayit

2014-06-23 收稿; 2014-09-18 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 21075118, 21205113)资助

* E-mail: wangzx@ciac.ac.cn, litao@ciac.ac.cn

公司)。

人血液样品从长春市中心血站暨吉林省血液中心获得; 荧光素标记的亲合素(FITC-Avidin)、凝血酶(Thrombin)、阿加曲班(Argatroban)、4-(2-氨基)苯磺酰氟盐(AEBSF)、胰蛋白酶抑制剂(Trypsin inhibitor) 和 N-(反式-环氧丁二酰基)-L-亮氨酸-4-胍基丁基酰胺(E-64) (美国 Sigma-Aldrich 公司); 光学级三维高分子 D 基片(北京博奥生物有限公司); 多肽: CALNN, CALNNGK(biotin) G 和 CAEGGF-PRSFVVK(biotin) (上海强耀生物科技有限公司); 抗凝血酶 III (Human Antithrombin-III, HAT-III, 美国 HTI 公司); 其它试剂均为国产分析纯, 实验用水为 Milli-Q 超纯水(18.2 MΩ cm)。

2.2 实验方法

2.2.1 血液样品制备 血液采集后 6 h 内离心分离血浆, 并速冻制成新鲜冰冻血浆, -80 °C 保存。

用血浆稀释缓冲液(pH 7.35, 20 mmol/L HEPES, 21.7 mmol/L 柠檬酸钠, 60 g/L BSA) 将 40 μL 血浆稀释 1 倍, 加入 20 μL 的激活剂(30 pmol/L 重组人组织因子和 24 μmol/L 磷脂混合物(磷脂酰丝氨酸: 磷脂酰乙醇胺: 磷脂酰胆碱 = 1: 1: 3, 摩尔比)), 37 °C 孵育 5 min。加入 20 μL HEPES 缓冲液(pH 7.35, 20 mmol/L HEPES, 60 g/L BSA, 0.1 mol/L CaCl₂) 制成活化的血浆。

将活化血浆 1300 g 离心 10 min, 分离得到血清。

2.2.2 金纳米粒子探针制备 100 mL 超纯水中加入 2 mL 1% 氯金酸溶液, 加热至沸; 加入 2 mL 2% 柠檬酸钠溶液继续加热搅拌 30 min, 合成 30 nm 粒径的金纳米粒子^[12,13]。取 120 μL 1 g/L CALNN-CALNNGK(biotin) G 混合液(9: 1, V/V), 加入 10 mL 4 nmol/L 金纳米粒子溶液中, 室温静置 1 h; 离心除去上清液, 重悬于探针缓冲液(pH 7.5, 50 mmol/L 磷酸盐溶液, 0.15 mol/L NaCl, 0.1% (V/V) 吐温-20, 1% (w/V) BSA), 4 °C 储存^[14]。

2.2.3 多肽微阵列芯片制备和酶水解过程 用点样缓冲液(pH 8.5, 0.3 mol/L 磷酸盐, 0.2 mol/L NaCl, 35% (V/V) 甘油, 0.002% (w/V) BSA) 配制 0.5 g/L 多肽(CAEGGFPRSFVVK(biotin)) 溶液, 使用晶芯® SmartArrayer™136 微阵列芯片点样系统点样于光学级三维高分子 D 基片上, 30 °C 反应 14 h。芯片表面的醛基基团与多肽 N 末端半胱氨酸残基上的氨基和巯基基团共价反应形成五元环结构, 使多肽固定于芯片表面^[15]。用含 0.1% (V/V) 吐温-20 的洗涤液-I(pH 7.5, 50 mmol/L 磷酸盐, 1% (w/V) BSA) 洗涤 2 次; 放入封闭液(pH 7.5, 50 mmol/L 磷酸盐, 0.15 mol/L NaCl, 1% (w/V) BSA, 0.1 mol/L 乙醇胺) 30 °C 反应 1 h; 用超纯水洗涤 3 次, 旋干(480 g, 1 min)。

用酶反应缓冲液(pH 7.35, 20 mmol/L HEPES, 0.14 mol/L NaCl, 2 mmol/L CaCl₂) 配制 30 U/mL 凝血酶溶液, 与芯片 37 °C 反应 1 h; 依次用含 0.1% (V/V) Triton X-100 的洗涤液-II(pH 7.5, 20 mmol/L Tris, 2 mmol/L EDTA, 0.15 mol/L NaCl)、洗涤液-II 和超纯水洗涤芯片 3 次, 旋干。

2.2.4 酶水解过程识别 用 3 μmol/L 荧光素标记的亲合素与芯片 37 °C 反应 1 h; 依次用含 1% (V/V) Tween-20 不含 BSA 的洗涤液-I、不含 BSA 的洗涤液-I 和超纯水洗涤芯片 3 次, 旋干; 用晶芯® LuxScan10K 扫描仪进行扫描; 用 0.3 nmol/L 金纳米粒子与芯片 37 °C 反应 1 h, 按上述步骤洗涤芯片并旋干。

2.2.5 抑制剂检测 将不同浓度的抑制剂分别与凝血酶溶液(30 U/mL)、加标血清(含 30 U/mL 凝血酶)或血浆混合, 血清或血浆的使用浓度为 33%^[16]。将混合溶液与芯片 37 °C 反应 1 h; 依次用含 0.1% (V/V) Triton X-100 的洗涤液-II、洗涤液-II 和超纯水洗涤芯片 3 次, 旋干; 之后的识别过程与 2.2.4 节描述相同。

2.2.6 信号检测 and 数据分析 用 SpotWare™ 芯片扫描仪提取共振光散射信号。所有数据都为扣除背景后的信号值, 用 6 个相同点的信号值计算平均值和标准偏差。抑制剂检测中, 不加抑制剂的子阵列作为阴性对照, 定义为最小信号值 I_{\min} ; 不加凝血酶的子阵列作为阳性对照, 定义为最大信号值 I_{\max} 。子阵列的相对信号强度(Relative fluorescence/RLS intensity, ΔI) 用公式(1) 计算:

$$\Delta I = (I - I_{\min}) / (I_{\max} - I_{\min}) \times 100\% \quad (1)$$

其中 I 为同时加入凝血酶和抑制剂的子阵列的信号值。酶溶液和加标血清中测得的 IC₅₀ 的差的绝对值 (ΔIC_{50}) 定义为:

$$\Delta IC_{50} = |IC_{50, \text{Pure thrombin solution}} - IC_{50, \text{Spiked human serum}}| \quad (2)$$

其中 $IC_{50, \text{Pure thrombin solution}}$ 为在酶溶液中测得的半抑制浓度, $IC_{50, \text{Spiked human serum}}$ 为在加标血清中测得的半抑制浓度。

3 结果与讨论

3.1 检测原理

用文献[16]方法将多肽点样并固定在醛基基片表面, 凝血酶水解多肽上的特异位点使多肽 C 末端的生物素从芯片上解离, 通过生物素和亲和素之间的特异性反应, 用荧光探针和金纳米粒子探针标记此水解过程, 荧光和共振光散射信号减弱。当加入凝血酶抑制剂时, 凝血酶活性受到抑制, 荧光和共振光散射信号减弱程度降低(图1)。

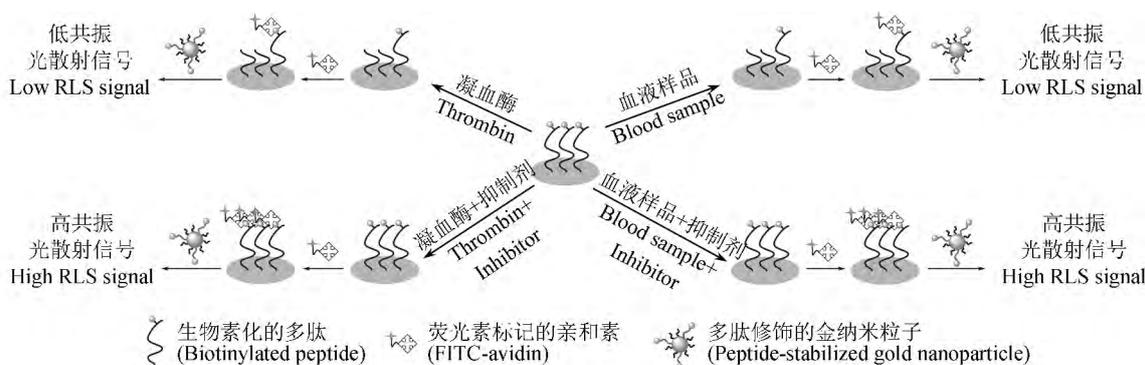


图1 基于多肽微阵列芯片的荧光法和共振光散射法检测凝血酶抑制剂

Fig. 1 Schematic representation of a peptide microarray-based fluorescence and resonance light scattering (RLS) assay for detecting thrombin inhibitor

3.2 酶溶液和加标血清中抑制剂的测定

为了验证本方法检测抑制剂的能力, 检测了凝血酶抑制剂(阿加曲班、抗凝血酶Ⅲ和 AEBSF)在酶溶液和加标血清中的 IC_{50} 值。如图2和图3所示, 3种抑制剂均有效抑制了凝血酶活性, 随抑制剂浓度增加, 芯片阵列的荧光信号、共振光散射信号和相对信号强度都随之增大。凝血酶抑制剂 IC_{50} 值见表1, 3种抑制剂在酶溶液中的 IC_{50} 测定值均与文献^[17, 18]报道相符, 加标血清中测得的 IC_{50} 值和酶溶液中测得的相比有一定差别。 IC_{50} 值大的抑制剂, 其 IC_{50} 差的绝对值也较大(AEBSF > 抗凝血酶Ⅲ > 阿加曲班)。在血清中, AEBSF 能与其它丝氨酸蛋白酶结合, 抗凝血酶Ⅲ能与透明质酸结合肽酶等蛋白结合^[18, 19]。这种与血清蛋白的结合降低了抑制剂对凝血酶的抑制效率。阿加曲班几乎不与血清蛋白结合, 对凝血酶的特异性较强, 抑制效率较高^[20]。说明在复杂的血清环境中, 对凝血酶特异性差的抑制剂, 其抑制能力明显降低。对于同一种抑制剂, 由于血清蛋白对荧光素标记的生物素的非特异吸附, 在纯酶溶液和加标人血清中通过荧光法测得的 IC_{50} 差的绝对值小于共振光散射法。说明共振光散射法能够有效放大血清环境对抑制剂的干扰现象, 较荧光法具有更高的检测灵敏度。以上实验结果表明, 本方法不仅可以在酶溶液中, 还可以在血清中定量计算抑制剂的抑制效率, 考察复杂血清环境对抑制剂的影响。

表1 抑制剂 IC_{50} 实验值与文献报道值对比

Table 1 Comparison of IC_{50} value of this work and those from references

抑制剂 Inhibitors	酶溶液中 IC_{50} 测定值 (共振光散射/荧光) IC_{50} found with pure thrombin solution (RLS/Fluorescence)	加标人血清中 IC_{50} 测定值 (共振光散射/荧光) IC_{50} found with spiked human serum (RLS/Fluorescence)	IC_{50} 文献报道值 IC_{50} reported	IC_{50} 差的绝对值 (共振光散射/荧光) ΔIC_{50} (RLS/Fluorescence)
阿加曲班 Argatroban	0.80/0.77 ($\mu\text{mol/L}$)	1.14/0.44 ($\mu\text{mol/L}$)	1.10 ($\mu\text{mol/L}$) ^[17]	0.34/0.33 ($\mu\text{mol/L}$)
抗凝血酶Ⅲ HAT-Ⅲ	1.46/1.78 ($\mu\text{mol/L}$)	6.98/2.62 ($\mu\text{mol/L}$)	无 None	5.52/0.84 ($\mu\text{mol/L}$)
4-(2-氨基)苯磺酰 氟酸盐 AEBSF	1.81/2.41 (mmol/L)	20.30/8.32 (mmol/L)	0.48 (mmol/L) ^[18]	18.49/5.91 (mmol/L)

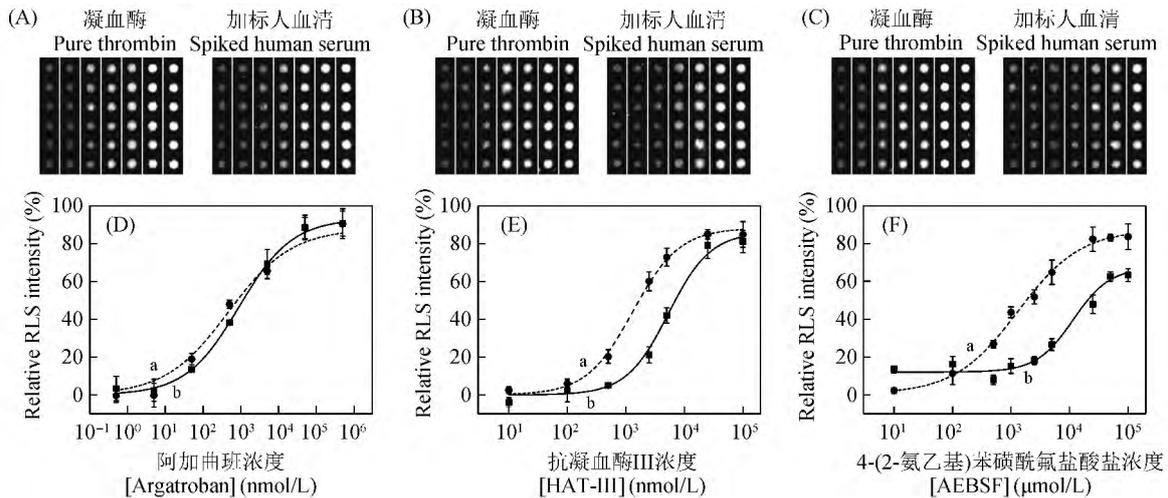


图 2 (a) 酶溶液和 (b) 加标血清中共振光散射法测定的抑制剂 IC_{50} 曲线图和对应的扫描图。扫描图从左到右抑制剂浓度逐渐增加。阿加曲班浓度为 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 。抗凝血酶 III 浓度为 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 25 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 。4-(2-氨基)苯磺酰氟盐酸盐浓度为 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 25, 50 和 100 mmol/L。凝血酶浓度为 30 U/mL, CAEGGFPRFRVVK(biotin) 点样浓度为 0.5 g/L。

Fig. 2 Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) curves and the corresponding images detected by RLS assay in (a) pure thrombin and (b) spiked human serum. The concentrations of inhibitors are increased from left to right in RLS images of each array. The concentrations of argatroban are 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50 and 500 $\mu\text{mol/L}$, the concentrations of human antithrombin III (HAT-III) are 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 25 and 100 $\mu\text{mol/L}$, and the concentrations of 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) are 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 25, 50 and 100 mmol/L, respectively. The concentration of thrombin is 30 U/mL, and the concentration of CAEGGF-PRFRVVK(biotin) in spotting solution is 0.5 g/L.

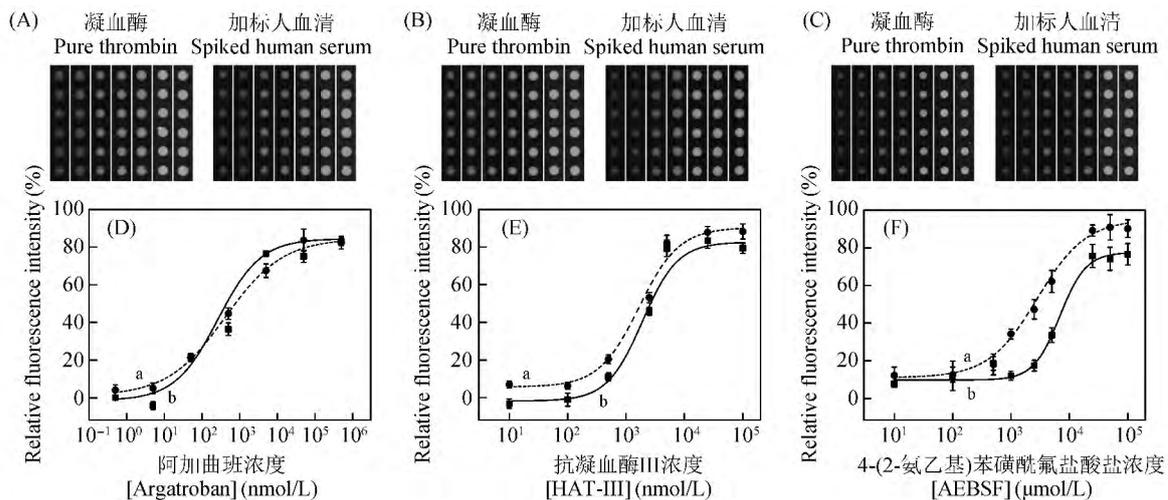


图 3 (a) 酶溶液和 (b) 加标血清中荧光法测定的抑制剂 IC_{50} 曲线图和对应的扫描图

Fig. 3 IC_{50} curves and the corresponding images detected by fluorescent assay in (a) pure thrombin and (b) spiked human serum

实验条件与图 2 相同 (The experimental conditions are the same as in Fig. 2)。

3.3 血浆中抑制剂的测定

为了验证本方法在血浆中筛选抑制剂的能力, 在血浆中检测了 3 种常用凝血酶抑制剂(阿加曲班、抗凝血酶 III 和 AEBSF) 及两种非凝血酶的蛋白酶抑制剂(胰蛋白酶抑制剂和 E-64) 对凝血酶的抑制效果。胰蛋白酶抑制剂和 E-64 对凝血酶没有抑制活性^[21, 22]。如图 4C 所示, 在抑制剂浓度均为 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 的条件下, 共振光散射法测得 5 种化合物的抑制能力为: 阿加曲班 > 抗凝血酶 III > 胰蛋白

酶抑制剂 > E-64 > AEBSF。其中 3 种凝血酶抑制剂在血浆中的抑制能力与酶溶液和加标血清中测得的 IC_{50} 值大小相符,阿加曲班和抗凝血酶 III 抑制能力明显高于另外 3 种化合物。虽然荧光法测得 5 种化合物的抑制能力趋势与共振光散射法一致,但其子阵列的荧光信号变化过小(图 4D),不能满足在血浆中明确区分各种抑制剂抑制能力的要求。对比共振光散射法的检测结果,说明基于 30 nm 金纳米粒子的共振光散射检测法,能够有效放大实验现象,提高检测能力,适用于复杂血浆环境中抑制剂的筛选。

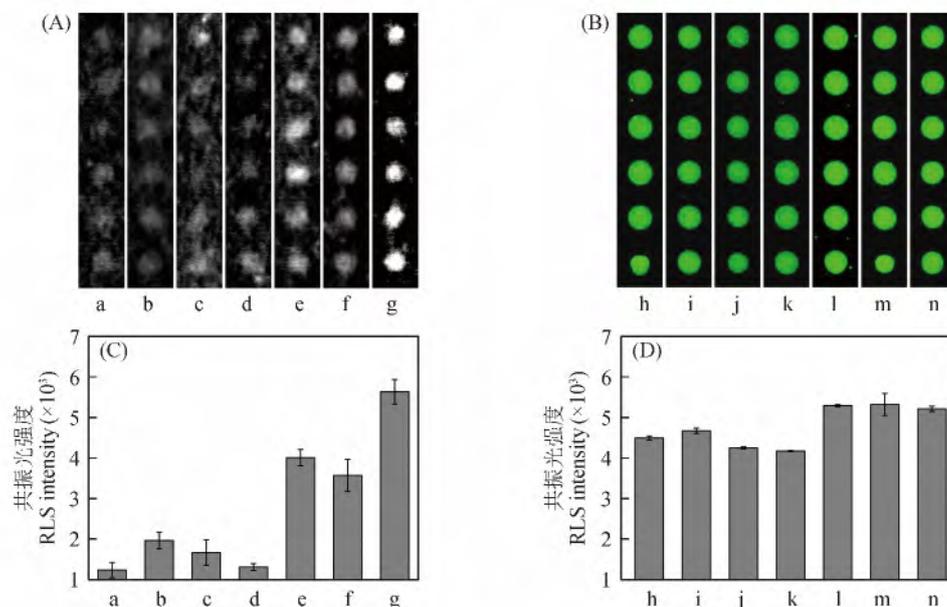


图4 在血浆中检测5种化合物的扫描图((A),(B))和对应的数据分析图((C),(D))。(A)和(C)为共振光散射法检测结果,(B)和(D)为荧光法检测结果。从a到g(或h到n)分别为:活化的血浆、胰蛋白酶抑制剂、N-(反式-环氧丁二酰基)-L-亮氨酸-4-胍基丁基酰胺、4-(2-氨基)苯磺酰氟盐酸盐、阿加曲班、抗凝血酶 III 和未活化的血浆。抑制剂浓度均为 7.5 $\mu\text{mol/L}$, CAEGGPRSFVVK (biotin) 点样浓度为 0.5 g/L。

Fig. 4 Images ((A),(B)) and the corresponding data analysis ((C),(D)) of detection of 5 compounds in human plasma. (A),(C): The detection results of RLS assay; (B),(D): The detection results of fluorescent assay. From a to g (or h to n): activated human plasma, trypsin inhibitor, E-64, AEBSF, argatroban, HAT-III and non-activated human plasma. The concentration of inhibitors is 7.5 $\mu\text{mol/L}$, and the concentration of CAEGGPRSFVVK (biotin) in spotting solution is 0.5 g/L.

3.4 血浆中抑制剂可逆性考察

为了进一步考察本方法的实用性,对阿加曲班和抗凝血酶 III 在血浆中对凝血酶的抑制能力进行了检测。用共振光散射法检测时,随抑制剂浓度增加抗凝血酶 III 得到了近似的 IC_{50} 曲线(图 5C),而高浓度的阿加曲班并没有完全抑制凝血酶的活性(图 5D)。抗凝血酶 III 是凝血酶的不可逆抑制剂,高浓度下能够排除血浆中凝血酶天然底物纤维蛋白原等其它物质的干扰,直接与酶活性位点作用形成不可逆的复合物,完全抑制血浆中的凝血酶活性^[23]。阿加曲班是凝血酶的可逆抑制剂,结合在凝血酶与纤维蛋白原作用的活性位点,产生空间位阻效应抑制纤维蛋白原与凝血酶的结合;同样,纤维蛋白原与凝血酶的结合也会产生空间位阻效应,抑制阿加曲班与凝血酶的结合^[24]。血浆中纤维蛋白原与阿加曲班竞争结合凝血酶,因此增加阿加曲班的浓度也没有完全抑制凝血酶的活性。虽然阿加曲班在酶溶液和加标血清中测定的 IC_{50} 值均小于抗凝血酶 III,但是由于二者的抑制类型不同,抗凝血酶 III 比阿加曲班在血浆中的抑制效果更好,更具有实用价值。这些实验结果说明,基于多肽微阵列芯片的金纳米粒子共振光散射检测方法可以在血浆中区分抑制剂的类型,有助于判断抑制剂的实用使用价值。

在血浆中用荧光法检测时,加入不同浓度抗凝血酶 III(图 6C)和阿加曲班(图 6D),未能有效检测出这两种化合物的抑制能力。以上实验结果表明,基于多肽微阵列芯片的共振光散射检测方法较荧光法更适于在复杂血浆环境中进行抑制剂特性考查,本方法为发展以多肽微阵列芯片为平台的高通量药

物筛选技术打下了基础。

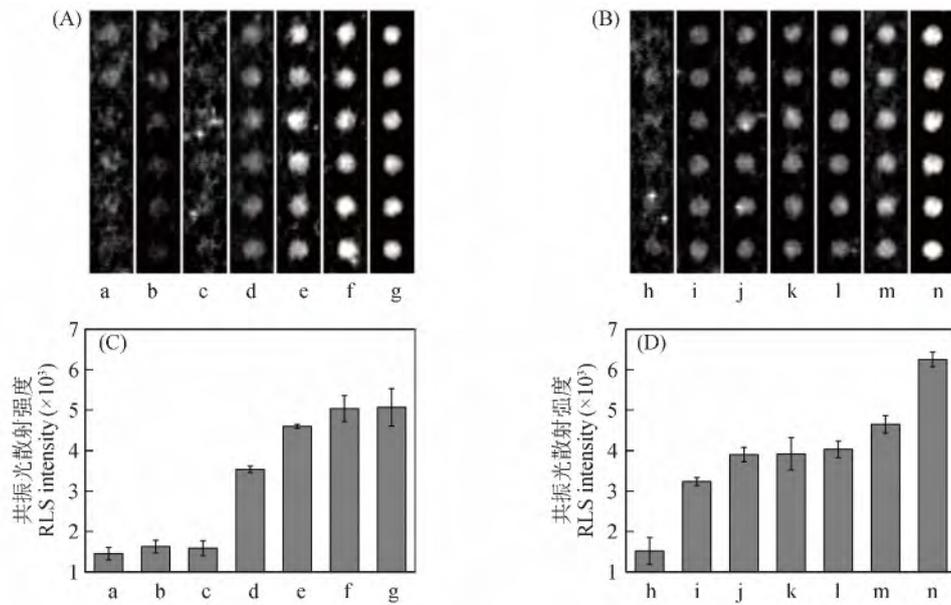


图 5 在血浆中检测抗凝血酶Ⅲ(A,C)和阿加曲班(B,D)的共振光散射扫描图和对应的数据分析图。a和h均为活化的血浆,抗凝血酶Ⅲ浓度从b到f分别为1,2,5,10和20倍半抑制浓度,阿加曲班浓度从i到m分别为1,2,5,10和20倍半抑制浓度,g和n为未活化的血浆。半抑制浓度均采用酶溶液中的测定值。CAEGGfPRSFVRVK(biotin) 点样浓度为0.5 g/L。

Fig. 5 RLS images and the corresponding data analysis for detection of (A,C) HAT-III and (B,D) argatroban in human plasma. a and h are activated human plasma, the concentrations of HAT-III from b to f: 1, 2, 5, 10 and $20 \times IC_{50}$, the concentrations of argatroban from i to m: 1, 2, 5, 10 and $20 \times IC_{50}$, g and n are non-activated human plasma. The IC_{50} values are found with pure thrombin solution. The concentration of CAEGGfPRSFVRVK(biotin) in spotting solution is 0.5 g/L.

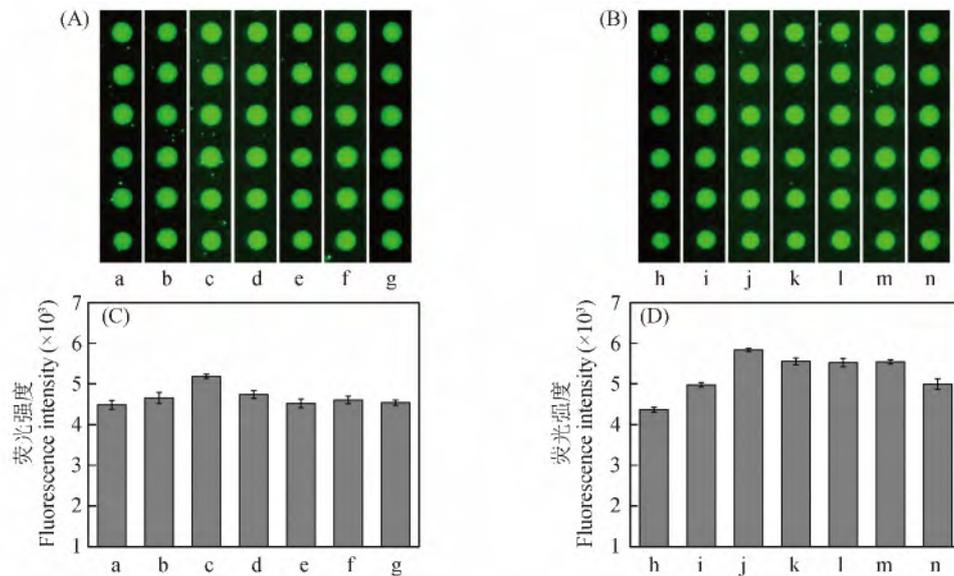


图 6 在血浆中检测抗凝血酶Ⅲ(A,C)和阿加曲班(B,D)的荧光扫描图和对应的数据分析图

Fig. 6 Fluorescence images and the corresponding data analysis for detection of HAT-III (A,C) and argatroban (B,D) in human plasma

实验条件与图 5 相同(The experimental conditions are the same as in Fig. 5)。

References

- 1 Brummel K E ,Paradis S G ,Butenas S , Mann K G. *Blood* ,**2002** ,100(1) : 148 – 152
- 2 Eriksson B I ,Quinlan D J ,Eikelboom J W. *Annual Review of Medicine ,USA: Annual Reviews* ,**2011**: 62: 41 – 57
- 3 Straub A ,Roehrig S ,Hillisch A. *Angew. Chem. Int. Ed.* ,**2011** ,50(20) : 4574 – 4590
- 4 Weitz J I. *Thromb. Haemostasis* ,**2010** ,103(1) : 62 – 70
- 5 Levine M N. *J. Clin. Oncol.* ,**2009** ,27(29) : 4912 – 4918
- 6 Mugherli L ,Burchak O N ,Balakireva L A ,Thomas A ,Chatelain F ,Balakirev M Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* ,**2009** ,48(41) : 7639 – 7644
- 7 Fernandez L ,Bleda M J ,Gomara M J ,Haro I. *Anal. Bioanal. Chem.* ,**2013** ,405(12) : 3973 – 3982
- 8 Sun H Y ,Chattopadhyaya S ,Wang J ,Yao S Q. *Anal. Bioanal. Chem.* ,**2006** ,386(3) : 416 – 426
- 9 Uttamchandani M ,Lee W L ,Wang J ,Yao S Q. *J. Am. Chem. Soc.* ,**2007** ,129(43) : 13110 – 13117
- 10 Uttamchandani M ,Liu K ,Panicker R C ,Yao S Q. *Chem. Comm.* ,**2007** ,15: 1518 – 1520
- 11 Neumann T ,Junker H D ,Keil O ,Burkert K ,Ottleben H ,Gamer J ,Sekul R ,Deppe H ,Feurer A ,Tomandl D ,Metz G. *Letts. Drug Des. Discov.* ,**2005** ,2(8) : 590 – 594
- 12 Turkevich J ,Stevenson P C ,Hillier J. *Discuss. Faraday Soc.* ,**1951** ,11: 55 – 75
- 13 Frens G. *Nature* ,**1973** ,241: 20 – 22
- 14 Levy R ,Thanh N T K ,Doty R C ,Hussain I ,Nichols R J ,Schiffrin D J ,Brust M ,Fernig D G. *J. Am. Chem. Soc.* ,**2004** ,126(32) : 10076 – 10084
- 15 Bi X Y ,Lai S L ,Yang K L. *Anal. Chem.* ,**2009** ,81(13) : 5503 – 5509
- 16 Su M ,Ma L ,Li T ,Liu D J ,Wang Z X. *Anal. Methods.* ,**2013** ,5(21) : 5895 – 5898
- 17 Berry C N ,Girardot C ,Lecoffre C ,Lunven C. *Thromb. Haemostasis* ,**1994** ,72(3) : 381 – 386
- 18 Liu Y. *A Novel Method for the Quantitative Evaluation of Fibrinogen Coagulation* [MS thesis]. Atlanta ,American: Georgia State University ,**2009**: 19
- 19 Rawlings N D ,Waller M ,Barrett A J ,Bateman A. *Nucleic Acids Res.* ,**2014** ,42(D1) : D503 – 509
- 20 Hantgan R R ,Jerome W G ,Hurting M. *Blood* ,**1998** ,92(6) : 2064 – 2074
- 21 Kunitz M. *J. Gen. Physiol.* ,**1947** ,30(4) : 311 – 320
- 22 Barrett A J ,Kembhavi A A ,Brown M A ,Kirschke H ,Knight C G ,Tamai M ,Hanada K. *Biochem. J.* ,**1982** ,201(1) : 189 – 198
- 23 Olson S T ,Bjork I. *Semin. Thromb. Hemost.* ,**1994** ,20(4) : 373 – 409
- 24 Bauer M ,Brandstetter H ,Turk D ,Sturzebecher J ,Bode W. *Semin. Thromb. Hemost.* ,**1993** ,19(4) : 352 – 360

A Peptide Microarray–Based Fluorescent and Resonance Light Scattering Assay for Screening Thrombin Inhibitor

SU Min^{1,2} , LI Tao^{*1} , LIU Dian-Jun¹ , WANG Zhen-Xin^{*1}

¹(State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry , Changchun Institute of Applied Chemistry , Chinese Academy of Sciences , Changchun 130022 , China)

²(University of the Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China)

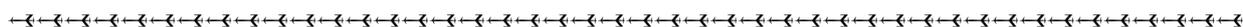
Abstract A peptide microarray-based fluorescence and resonance light scattering (RLS) two readout assay was developed for screening thrombin inhibitors in blood samples. In this assay , the biotinylated peptide microarray was used as the platform. The peptide C-terminal fragments carried biotin sites departed from the slide when the biotinylated peptides were digested by thrombin hydrolysis reaction. The hydrolysis progress was labeled by fluorescence and 30 nm peptide-stabilized gold nanoparticles through the biotin-avidin reaction. In the presence of thrombin inhibitors , the hydrolysis reactions were blocked , and the inhibition capability of inhibitors could be detected by the fluorescent and RLS signal changes. The order of the half maximal

inhibitory concentration (IC_{50}) of thrombin inhibitors in pure thrombin solution and spiked human serum were argatroban < human antithrombin-III (HAT-III) < AEBSF. The absolute differences of IC_{50} between pure thrombin solution and spiked human serum increased with the decreasing inhibition specificity. The order of the inhibition activities of five compounds (7.5 $\mu\text{mol/L}$) in human plasma were argatroban > HAT-III > trypsin inhibitor > E-64 > AEBSF. The reversible or irreversible characters of argatroban and HAT-III had been estimated in human plasma. Compared with the experimental data of fluorescent and RLS assay in blood sample, the RLS assay labeled by 30 nm gold nanoparticles are more suitable for the inhibitor detection in complicated blood sample.

Keywords Peptide microarray; Gold nanoparticle probes; Resonance light scattering; Half maximal inhibitory concentration; Thrombin inhibitor

(Received 23 June 2014; accepted 18 September 2014)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21075118, 21205113)



中国化学会第十二届全国分析化学年会 (第一轮通知)

中国化学会和国家自然科学基金委主办、华中师范大学承办的“第十二届全国分析化学年会”定于 2015 年 5 月 8 日至 11 日在武汉洪山大礼堂召开。这是我国分析化学领域三年一届的盛会,会议将就我国自上届学术会议以来分析化学学科的新成就、新进展进行学术交流和研讨,会议将组织分析化学前沿的大会报告、分组报告和讨论,并邀请部分国外学者和海外华裔学者与会。热忱欢迎广大的分析化学工作者踊跃投稿和参加会议。现将有关事项通知如下:

一、征文内容

(1) 原子光谱分析; (2) 分子光谱分析; (3) 色谱法与分离科学; (4) 电分析化学; (5) 波谱分析(包括顺磁、核磁共振); (6) 质谱分析; (7) 显微成像分析; (8) 微流控芯片分析; (9) 联用方法与自动化分析; (10) 形态、表面及结构分析; (11) 生物分析化学; (12) 药物和代谢物分析; (13) 环境分析化学; (14) 食品分析; (15) 蛋白质分析; (16) 核酸分析; (17) 纳米分析化学; (18) 分析仪器及装置; (19) 质量控制; (20) 化学计量学与生物信息学。凡已在刊物上发表或在全国会议上报告过的论文不在应征之列。此外,本次会议的交流形式包括大会报告、邀请报告、口头报告和墙报交流,并设优秀墙报奖,诚挚欢迎积极参与(<http://ac.ccnu.edu.cn>)。

二、征文要求

应征论文须用 Word 软件编辑,包括题目、作者、单位、必要的图表、结果和讨论、主要参考文献(2~5 篇),用 A4 纸,版心尺寸为 15 cm × 24 cm,标题用小三号黑体,正文用小四号宋体,全文(包括图表)一般为一页,请勿超过两页。文末须附英文题目、作者姓名和单位。截稿日期:2015 年 3 月 15 日。

三、收稿地址

网上投稿和会议注册将于 2014 年 10 月 1 日开通,请尽量网上投稿。如果通过电子邮件投稿,请发至: ac2015china@163.com,并在邮件中注明“会议征文”和论文第一作者及通讯联系人的姓名、职称、工作单位、邮编、联系电话及 E-mail。同时,为便于分类,请在邮件主题中注明稿件类别(如 1 原子光谱分析; 2 分子光谱分析; 3 色谱法与分离科学; 4 电分析化学; 5 波谱分析; 6 质谱分析等)。

有关稿件的处理意见、会议具体日程、注册费用、住宿安排等项事宜请见第二轮通知。会议筹备组联系人:

杨光富: 027-67867800, gfyang@mail.ccnu.edu.cn;

钟鸿英: 027-67862616, hzyhong@mail.ccnu.edu.cn

张爱东: 027-67867635, adzhang@mail.ccnu.edu.cn

徐 晖: 027-67867953, huixu@mail.ccnu.edu.cn

本会欢迎国内外分析仪器公司、厂商到会介绍和展出产品,有关具体事宜请与筹备组联系。

第十二届全国分析化学年会筹备组

2014 年 7 月 18 日