

基于基质辅助激光解析质谱的高通量酪氨酸酶活性及抑制剂分析

石倩^{1,2}, 刘冬梅³, 方小泥^{1,2}, 刘宝红^{1,2}

(1. 复旦大学化学系, 2. 药学院, 上海 200438;
3. 青岛市市立医院药学部, 青岛 266001)

摘要 利用具有高效便捷分离能力和强紫外吸收的磁性石墨烯纳米材料 Fe₃O₄@G, 结合基质辅助激光解析质谱用于酪氨酸酶的活性及抑制剂分析. 与其它方法相比, 该策略在避免繁琐样品前处理的基础上, 减少了样品的损失, 提高了检测的灵敏度. 此外, 结合基质辅助激光解析质谱实现了高通量的样品分析. 本文结果对于深入了解黑色素合成过程、研究相关疾病以及开发有效的药物和美容产品具有重要意义.

关键词 基质辅助激光解析质谱; 磁性石墨烯; 酪氨酸酶; 活性测定; 抑制剂分析

中图分类号 O657.6 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20240330

High-throughput Analysis of Tyrosinase Activity and Inhibitors Based on Matrix-assisted Laser Desorption/ionization Mass Spectrometry

SHI Qian^{1,2}, LIU Dongmei³, FANG Xiaoni^{1,2*}, LIU Baohong^{1,2*}

(1. Department of Chemistry, 2. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200438, China;
3. Department of Pharmacy, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266001, China)

Abstract The efficient and convenient separation capability and strong ultraviolet absorption of magnetic graphene nanomaterials (Fe₃O₄@G) were applied in the analysis of tyrosinase activity and inhibitors using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). Compared to other methods, this approach reduces sample loss and improves detection sensitivity by avoiding cumbersome sample pretreatment processes. Additionally, the combination of MALDI-MS enables high-throughput sample analysis. The development of this research is of significant importance for gaining a deeper understanding of melanin synthesis processes, studying related diseases, and developing effective drugs and cosmetic products.

Keywords Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS); Magnetic graphene; Tyrosinase; Activity assay; Inhibitor analysis

酪氨酸酶(Tyrosinase)是一种广泛存在于植物和动物组织中的酶^[1,2]. 作为一种铜含量较高的氧化酶, 酪氨酸酶具有2个与芳香底物结合的位点, 对单酚和邻二酚均具有活性^[3-5]. 酪氨酸酶在许多生理过程中发挥着重要作用, 包括植物的褐变反应、哺乳动物的黑色素合成和昆虫的外骨骼硬化等^[6]. 酪氨酸酶的功能涉及到黑色素合成中的2个不同反应, 包括将单酚催化羟基化为邻二酚, 或是在分子氧存在下催化邻二酚的氧化生成相应的邻醌^[7]. 此外, 酪氨酸酶在临床研究中也发挥着至关重要的作用. 酪氨酸酶的表达与常见的皮肤病, 如黑色素瘤与白癜风的发生和发展密切相关, 已被用作相关

收稿日期: 2024-07-01. 网络首发日期: 2024-07-23.

联系人简介: 方小泥, 女, 博士, 副教授, 主要从事药物分析方面的研究. E-mail: xnfang@fudan.edu.cn

刘宝红, 女, 博士, 教授, 主要从事电分析化学方面的研究. E-mail: bhliu@fudan.edu.cn

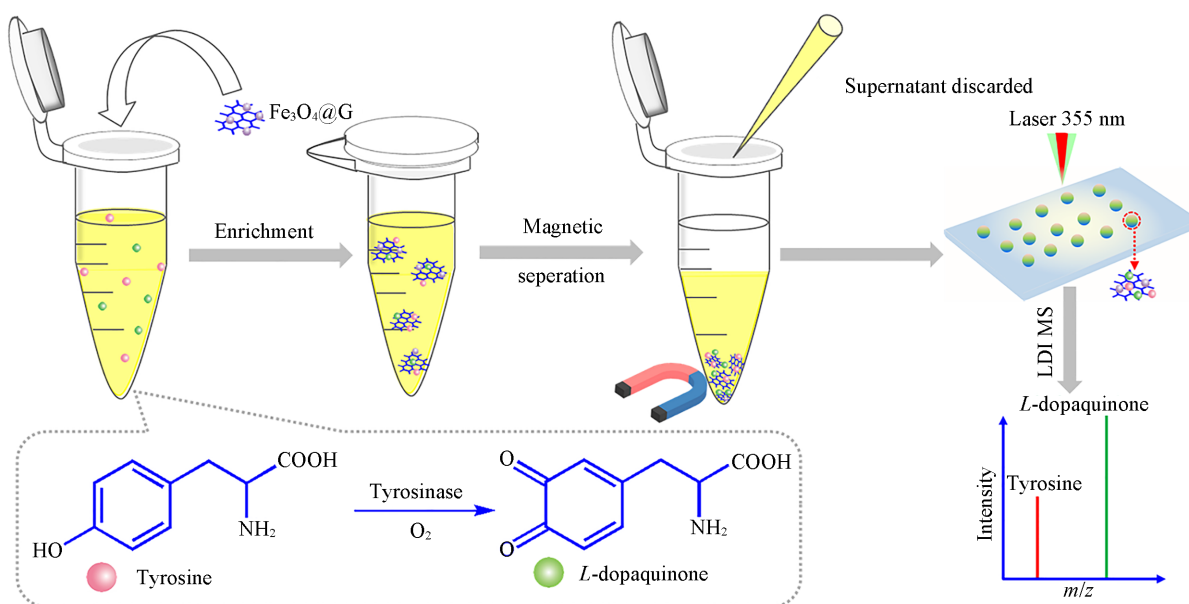
基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 21934001, 22374028)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(Nos.21934001, 22374028).

疾病诊断的生物标志物^[8]。由于酪氨酸酶在黑色素合成中的重要作用,其抑制剂已广泛应用于化妆品行业的美白产品^[9,10]。因此,开发高灵敏高通量的酪氨酸酶活性测定方法及相应的抑制剂筛选方法对于深入了解黑色素合成过程、研究相关疾病以及开发有效的药物和美容产品具有重要意义。

近年来,各种各样的分析方法已被广泛应用于酪氨酸酶活性的测定及其抑制剂筛选,如光化学和电化学等检测方法^[11-16]。然而,这些方法检测通量不高,操作较为复杂,背景干扰大,灵敏度也有待进一步提升。基质辅助激光解析质谱技术(MALDI-MS)具有快速、准确、简单、高灵敏和低成本等优点,已被广泛应用于各种生物小分子的分析检测^[17-19]。为有效消除传统基质在MALDI-MS中产生的背景干扰信号,无机纳米颗粒已成为MALDI-MS中用于小分子化合物检测的首选基质^[20]。此外,各种各样的分离纯化前处理技术也被广泛应用于MALDI-MS分析中,有效地提升了小分子化合物的抗干扰能力及检测灵敏度^[21]。目前,多个课题组已设计合成了集小分子化合物分离及质谱基质于一体的无机纳米颗粒,并应用于小MALDI-MS分子化合物的高通量高灵敏检测^[22-24]。然而,此类分析方法目前暂未用于酪氨酸酶活性的测定及其抑制剂筛选。

本文设计合成了磁性石墨烯纳米材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$,结合MALDI-MS实现了高灵敏高通量酪氨酸酶活性及抑制剂分析(Scheme 1)。在酪氨酸代谢过程中,酪氨酸(Tyrosine)在酪氨酸酶的催化作用下生成L-多巴醌(L-dopaquinone)。依据酪氨酸和L-多巴醌质谱检测信号的相对强度,可以准确计算出参与酪氨酸代谢过程中酪氨酸酶的催化活性。得益于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 大范围离域 π 电子系统、超大的比表面积及磁响应性能,酪氨酸代谢过程中的底物及反应产物能够实现快速高效便捷的磁分离。同时,借助石墨烯优异的紫外光吸收性能,磁性石墨烯纳米材料可被用作MALDI-MS检测的基质。将负载有酪氨酸和L-多巴醌的磁性石墨烯纳米材料直接滴加到MALDI-MS靶板上进行质谱分析,不仅避免了繁琐的样品前处理过程,还有效减少了样品的损失,从而提升了检测的灵敏度。基于此,开发了一种基于基质辅助激光解析质谱的高灵敏高通量酪氨酸酶活性分析方法,并应用于酪氨酸酶抑制剂分析。研究结果表明,该方法在大规模生物测定及临床研究等领域均展示出广阔的应用前景。



Scheme 1 Schematic illustration of the analysis of tyrosinase activity and inhibitors based on MALDI-MS

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

酪氨酸、酪氨酸酶、L-多巴醌、苯甲酸、曲酸、人血清白蛋白(HAS)、牛血清白蛋白(BSA)、葡萄糖氧化酶(GOX)、溶菌酶、乙酰胆碱酯酶(AchE)和胰蛋白酶,德国Merck公司;氧化石墨烯(GO),南京

先丰纳米材料科技有限公司; 乙醇、浓硝酸、氢氧化钠、浓氨水、六水合三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、柠檬酸钠、乙酸钠和聚乙二醇(PEG-20000, 分子量为20000), 分析纯, 国药集团化学试剂上海有限公司。

JEOL 6400型扫描电子显微镜(SEM), 日本电子株式会社; JEOL 2011型透射电子显微镜(TEM), 日本电子株式会社; Nicolet FTIR 360型红外光谱仪(FTIR), 美国赛默飞世尔科技公司; XploRA型激光拉曼光谱仪(Raman), 法国荷日巴乔宾优温公司; V-550型紫外-可见光谱仪(UV-Vis), 日本电子株式会社; 5800型基质辅助激光解析质谱仪(MALDI-MS), 美国应用生物系统公司。

1.2 实验过程

1.2.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 的制备 参照文献[25,26]方法合成 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 。首先, 将1 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于乙二醇中, 在磁力搅拌下向其中加入200 mg 柠檬酸钠和经酸化处理的石墨烯材料; 超声2 h 确保磁性纳米颗粒良好地分散在溶液中, 然后加入4 g 乙酸钠和2.5 g PEG-20000; 待混合溶液均匀分散后, 转移至水热反应釜中, 于200 °C反应12 h, 然后冷却至室温; 通过磁分离将反应产物与剩余的反应液分离, 然后用去离子水反复洗涤; 最后, 于60 °C下真空干燥, 所得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 材料于室温储存, 备用。

1.2.2 酪氨酸酶活性及抑制剂分析 向2.0 mL离心管中加入500 μL 去离子水和100 μL 1.0 mol/L酪氨酸酶; 再加入100 μL 不同活性(0~5 U/mL)的酪氨酸酶; 将混合物在37 °C下孵育30 min完成酶催化反应; 随后, 加入适量的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 材料来分离和富集反应底物和产物; 通过涡旋振荡混合反应溶液10 min, 确保待分离分子与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 充分接触; 在外加磁场作用下分离已吸附分析物的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 材料, 并弃去上层清液; 最后, 加入10 μL 去离子水分散负载了分析物的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 材料, 并使用移液枪移取0.5 μL 溶液直接进行MALDI-TOF质谱分析。

为了验证该方法检测复杂样本中酪氨酸酶活性的可行性, 将其用于1%(体积分数)的胎牛血清和人类血清样本中酪氨酸酶活性的检测。在上述体系中加入相应量的胎牛血清和人类血清样本, 并按照实验步骤进行酪氨酸酶活性检测。通过监测酪氨酸酶活性下产物的质谱信号强度变化, 可以评估样本中酪氨酸酶的活性水平。此外, 为了评估该方法在酪氨酸酶抑制剂筛选方面的应用性能, 分别向酶活性检测体系中添加不同浓度的苯甲酸和曲酸等抑制剂; 通过监测酪氨酸及其产物的质谱信号强度变化, 可以判断不同抑制剂的预制能力强弱。

2 结果与讨论

2.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 的表征

MALDI-TOF作为一种“软”电离工具, 具有分析速度快、检测灵敏度高、准确性高、重复性高和高通量的优势, 同时样品预处理简单且具有较强的耐盐性, 已成为化分析中不可或缺的重要研究工具^[27-29]。为了克服传统MALDI-TOF中基质离子干扰和低质荷范围中的其它无效离子的问题, 石墨烯等稳定的无机材料被引入作为MALDI的替代基质。此方法可以有效消除离子干扰, 提高小分子分析的灵敏度和准确性^[30-32]。特别是与石墨烯相关的激光解吸电离(LDI)技术在小分子分析中具有巨大的应用潜力。此外, 将石墨烯与磁性纳米颗粒结合也具有重要意义。这种磁性石墨烯纳米材料($\text{Fe}_3\text{O}_4@G$)的合成使得分析物的分离和富集变得高效且便捷。结合磁性纳米颗粒的特性, 可以方便地实现对目标分子的分离和富集, 而石墨烯作为基质材料可以提升质谱检测的灵敏度。因此, 实验中合成了磁性石墨烯纳米材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$, 以用于小分子的分离富集和后续的质谱检测。

首先, 对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 复合材料的形貌和尺寸特征进行了SEM和TEM表征。由图1(A)可见, 磁性纳米颗粒已修饰在经过酸化处理的石墨烯表面上并均匀分布在石墨烯表面未观察到团聚现象。这种均匀分布有助于保持 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 材料的磁性特性, 并提高其分离能力。TEM表征结果显示, 直径约为150 nm的磁性纳米颗粒紧密地附着在石墨烯表面[图1(B)]。 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 的拉曼光谱图进一步证实了 Fe_3O_4 颗粒的稳定附着[图1(C)], 在1566和2679 cm^{-1} 处存在石墨烯的G和2D特征峰。其中, D峰表示碳原子晶格的缺陷, G峰表示碳原子 sp^2 杂化面内的振动, 这些峰的存在进一步确认了石墨烯与 Fe_3O_4 的复合形成。

此外, 考虑到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 复合材料的磁性大小对分离能力的影响, 对其磁性性质进行了表征。由

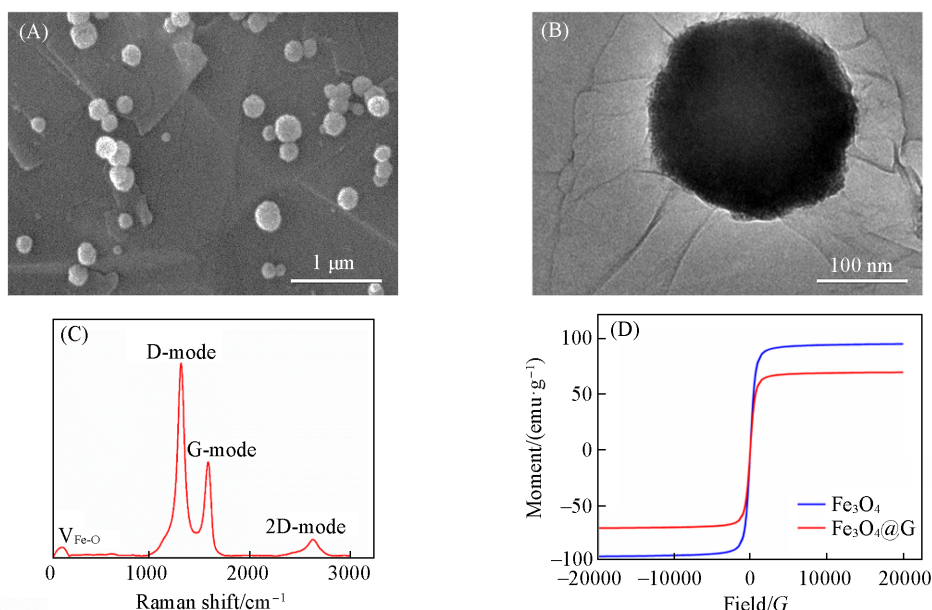


Fig. 1 SEM image(A), TEM(B) image, Raman spectrum(C) and magnetization curve(D) of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$

图1(D)可见,经石墨烯修饰后,磁性纳米颗粒的磁性大小并没有显著变化,仍然表现出良好的超顺磁性,磁性强度为 $66.3 \text{ Am}^2/\text{kg}$. 在实际应用中, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 在外加磁场作用下能够快速实现分离. 由图S1(见本文支持信息)可见,仅需 1 min, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 即从均匀分散状态迅速转变为磁性分离聚集状态,这种高效的分离能力为后续的分析 and 检测提供了保证.

2.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 对酪氨酸酶作用底物和产物的富集能力

为了证实 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 对小分子的分离能力,考察了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 对酪氨酸及其代谢产物 *L*-多巴醌的富集固定能力. 由 Scheme 1 可见,酪氨酸和 *L*-多巴醌均属于芳香化合物,可通过与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 之间的 π - π 堆积作用和范德华力相互作用而被分离和富集. 由于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 具有超大的比表面积和分离能力,酪氨酸与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 孵育 5 min 后即达到最大吸附容量[图 2(A)]. 此时,体系中超过 98.23% 的酪氨酸已经被 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 吸附,最大吸附容量达到 $(31.67 \pm 0.58) \text{ mg} \cdot (\text{g Fe}_3\text{O}_4@\text{G})^{-1}$. 尽管相对于酪氨酸, *L*-多巴醌被 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 分离的效率稍显逊色,但其仍然可以在 10 min 内富集 95.10% 的 *L*-多巴醌,且最大吸附容量高达 $(27.01 \pm 1.13) \text{ mg} \cdot (\text{g Fe}_3\text{O}_4@\text{G})^{-1}$ [图 2(B)]. 因此, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 对酪氨酸和 *L*-多巴醌均展现优异的富集效果,这将有助于提高后续目标分子的检测灵敏度.

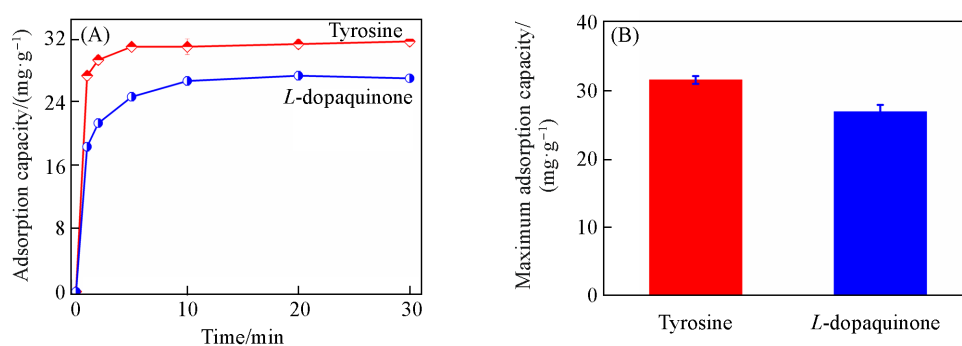


Fig. 2 Extraction of tyrosine and *L*-dopaquinone by $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ as a function of incubation time(A) and maximum adsorption capacity of tyrosine and *L*-dopaquinone by $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ after 10 min incubation(B)

Each bar represents the mean \pm standard deviation ($n=3$).

2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 作为 MALDI-MS 基质的性能

除了具备良好的分离性能, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 还可直接用作后续质谱检测的基质,提高了分析通量并简化

实验操作. 由图S2(见本文支持信息)可见, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 在 335 nm 附近具有较强的紫外吸收峰, 因此可以吸收 MALDI-MS 激光的能量, 并将其转移到待分析物上进行质谱检测. 因此, 进一步考察了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 作为 MALDI-MS 基质检测酪氨酸和 *L*-多巴醌的性能. 由图 3(A)和(B)可见, 无论酪氨酸和 *L*-多巴醌的摩尔比例是 1:2 还是 2:1, 均可成功进行 MALDI-TOF 检测. 与传统基质 CHCA 相比(见本文支持信息图 S3), 使用 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 作为基质检测的酪氨酸和 *L*-多巴醌几乎没有背景干扰. 值得注意的是, 经过 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 分离富集后, 相同浓度的酪氨酸和 *L*-多巴醌在质谱靶板上的信号更强(见本文支持信息图 S4). 然后, 结合 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 的分离性能对方法的检测限进行了考察. 由图 3(C)和(D)可见, 该方法无论是检测酪氨酸(0.1~500 fmol)还是 *L*-多巴醌(0.5~100 fmol), 均展示了良好的线性和较低检测浓度. 综合 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 的形貌和性能表征, 已经证实 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ 非常适合基于 MALDI-MS 的酪氨酸和 *L*-多巴醌分析, 为高效的酪氨酸酶活性及抑制剂分析奠定了良好的结构基础.

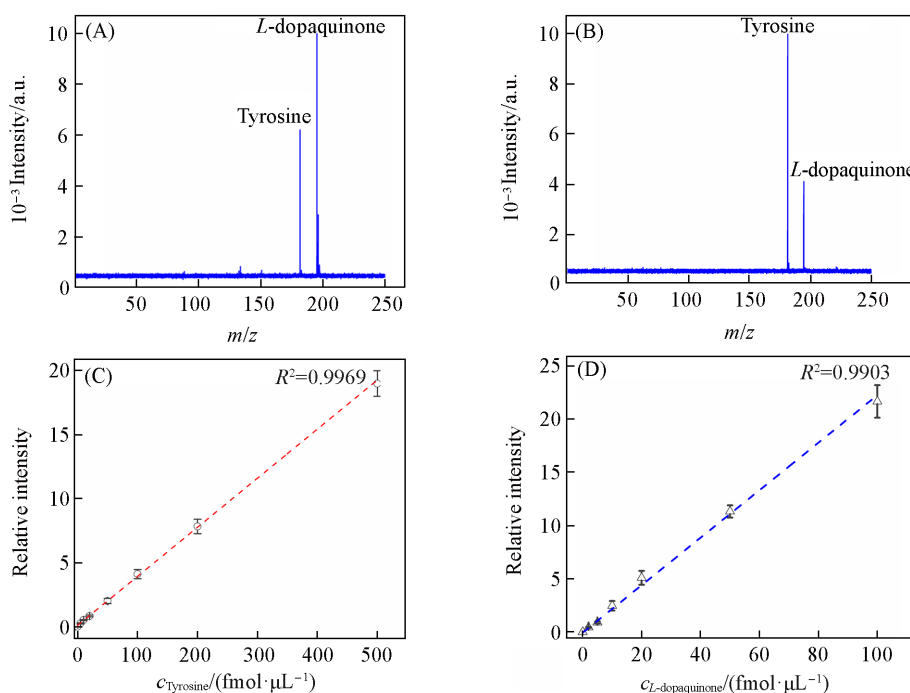


Fig. 3 Mass spectrum of $n(\text{Tyrosine}):n(\text{L-dopaquinone})$ of 1:2(A) and 2:1(B) with $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ as the matrix and linear range of tyrosine(C) and *L*-dopaquinone(D) after enrichment by $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ and further used as the matrix for MALDI-MS detection

2.4 酪氨酸酶活性检测

酪氨酸在酪氨酸酶的催化作用下转化为 *L*-多巴醌^[33]. 通过比较酪氨酸和 *L*-多巴醌质谱检测信号绝对强度的比值, 即相对强度, 可以准确计算参与酪氨酸代谢的酪氨酸酶的催化活性. 为了验证开发的方法可用于酪氨酸酶活性检测, 在 1.0 mol/L 酪氨酸反应体系中加入不同活性的酪氨酸酶(0~5 U/mL), 在 37 °C 下反应 30 min 后测定底物和产物的相对质谱信号. 由图 4(A)可见, 随着酪氨酸酶浓度的增加, 相对质谱信号强度不断减小. 当酪氨酸酶浓度增加到 0.5 U/mL 时, 几乎所有的酪氨酸已经被消耗完, 此时质谱信号强度趋近于 0. 当酪氨酸酶浓度超过 1 U/mL 后, 酪氨酸酶已将底物完全转化为产物 *L*-多巴醌, 此时体系中仅含有 *L*-多巴醌. 根据质谱信号强度与酪氨酸酶活性的关系进行了线性拟合. 由图 4(A)插图可见, 该方法呈现出良好的线性关系, R^2 为 0.989, 拟合线性方程为

$$\text{RI} = 99.32 - 99.78c_{\text{tyrosinase}}$$

式中: RI 为酪氨酸和 *L*-多巴醌质谱检测信号绝对强度的比值(相对强度); $c_{\text{tyrosinase}}$ (U/mL) 为酪氨酸酶活性浓度.

在实际应用中, 检测样本通常包含复杂的组分, 可能存在各种干扰因素. 在这种情况下, 方法的良好特异性可以有效消除背景干扰, 获得良好的检测结果. 为了进一步验证该方法的特异性, 在酪氨

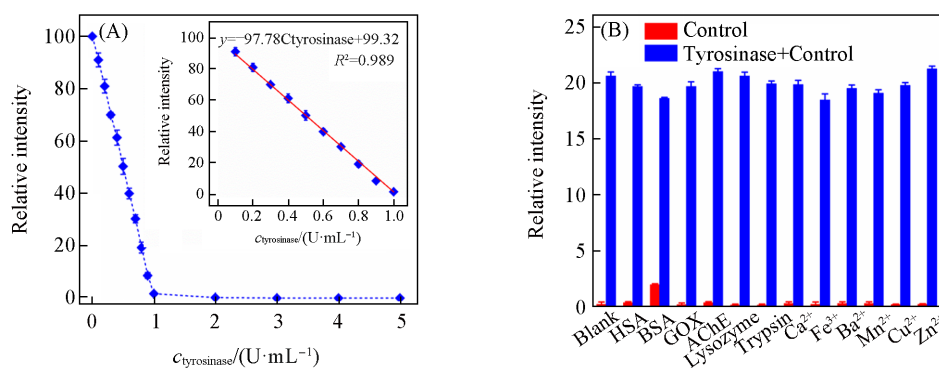


Fig. 4 Analysis of tyrosinase activity using MALDI-MS was conducted to assess its effectiveness(A) and test of specificity of the MALDI-TOF-MS based approach for tyrosinase activity detection(B)

(A) Inset: relative MS intensity vs. different tyrosinase concentrations; (B) each bar represents the mean±standard deviation($n=3$).

酸酶催化体系中添加了人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、葡萄糖氧化酶(GOX)、乙酰胆碱酯酶(AchE)、溶菌酶(lysozyme)和胰蛋白酶(Trypsin)以及7种生物阳离子(Zn^{2+} , Fe^{3+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} 和 Cu^{2+})作为对照. 由图4(B)可见, 无论是蛋白质还是金属离子均不会对酪氨酸酶活性的检测产生明显干扰. 其主要原因可以归结为以下两方面: (1) 酪氨酸和L-多巴醌均为芳香化合物, 其通过 π - π 堆积作用和范德华力被 $Fe_3O_4@G$ 分离富集, 而金属离子与 $Fe_3O_4@G$ 不会产生任何的相互作用力, 少量的非特异性吸附金属离子通过多次洗脱能够有效的除去; (2) 虽然蛋白不排除非特异吸附的可能, 但由于其分子量与待测物质酪氨酸和L-多巴醌差异巨大, 质谱检测时质量范围设定为250以下, 不会对小分子化合物的检测产生干扰, 从而保证了该方法良好的特异性.

鉴于开发的方法具有良好的检测灵敏度和选择性, 进一步探索了该方法在生物应用方面的潜力. 根据表1中的数据, 将该方法应用于胎牛血清和人血清样本(取样10 μ L, 用990 μ L去离子水稀释)中酪氨酸酶活性的检测. 实验结果显示, 在0~1.0 U/mL酪氨酸酶浓度范围内, 该方法能够有效地监测到胎牛血清和人血清样本中的酪氨酸酶活性, 并且随着酶浓度的增加, 活性也相应增加. 进一步将开发的方法与传统的比色法和电化学法进行了比较, 3种方法的检测结果基本一致, 表明该方法在酶活性检测方面具有较高的可靠性. 与比色法和电化学检测方法相比, 基于质谱技术的酪氨酸酶活性检测展现出无与伦比的高通量性能, 这将有效缩短检测时间、降低成本, 并实现对大规模生物样本的快速检测.

Table 1 Results of Tyrosinase Activity Assay in Serum Samples

Spiked	Fetal bovine serum			Human serum			
	MALDI-MS	Colorimetric assay	Electrochemical assay	Spiked	MALDI-MS	Colorimetric assay	Electrochemical assay
0	0.053±0.002	0.046±0.003	0.048±0.005	0	0.075±0.001	0.079±0.002	0.081±0.001
0.1	0.161±0.005	0.152±0.006	0.160±0.003	0.1	0.153±0.002	0.149±0.005	0.152±0.004
0.5	0.597±0.002	0.607±0.001	0.600±0.005	0.5	0.602±0.003	0.586±0.001	0.605±0.003
1.0	1.092±0.006	1.116±0.002	1.088±0.003	1.0	1.151±0.003	1.109±0.04	1.132±0.02

2.5 酪氨酸酶抑制剂分析

考虑到酪氨酸酶在黑色素形成和食品褐变过程中的重要性, 酪氨酸酶抑制剂已被广泛应用于皮肤色素沉着症和食品抗褐变处理中^[9]. 因此, 开发一种方便高效的酪氨酸酶抑制剂筛选方法对于化妆品和食品行业均非常重要. 苯甲酸和曲酸会干扰酪氨酸酶的正常功能或与其底物竞争结合, 常被用作具有竞争力和高选择性的酪氨酸酶活性抑制剂^[10,34]. 通过在酪氨酸酶催化体系中加入不同浓度的抑制剂, 并监测酪氨酸酶活性的变化, 可以实现对抑制剂的快速筛选. 由图5可见, 随着苯甲酸和曲酸浓度的增加, 酪氨酸酶催化的底物和产物的相对质谱信号比逐渐增大, 直到酶活性被完全抑制, 底物无法转化为产物. 证实了苯甲酸和曲酸确实是酪氨酸酶活性的抑制剂. 此外, 通过比较苯甲酸[图5(A)和

(C)]和曲酸[图5(B)和(D)]对酪氨酸酶的抑制效果可以观察到,在相同条件下,曲酸需要更高的浓度才能有效抑制酪氨酸酶活性,因此可以推断苯甲酸是一种更强的酪氨酸酶活性抑制剂.为了进一步验证本文开发的方法在复杂环境中的适应性和准确性,继续在1%人血清样本中进行抑制剂筛选实验,相关实验结果见本文支持信息图S5.实验结果表明,与单一的标准体系相比,该方法在复杂体系中进行抑制剂筛选仍然具有可行性.因此,该方法不仅可以用于复杂样本中酪氨酸酶活性的检测,还可以用于快速筛选酪氨酸酶抑制剂.

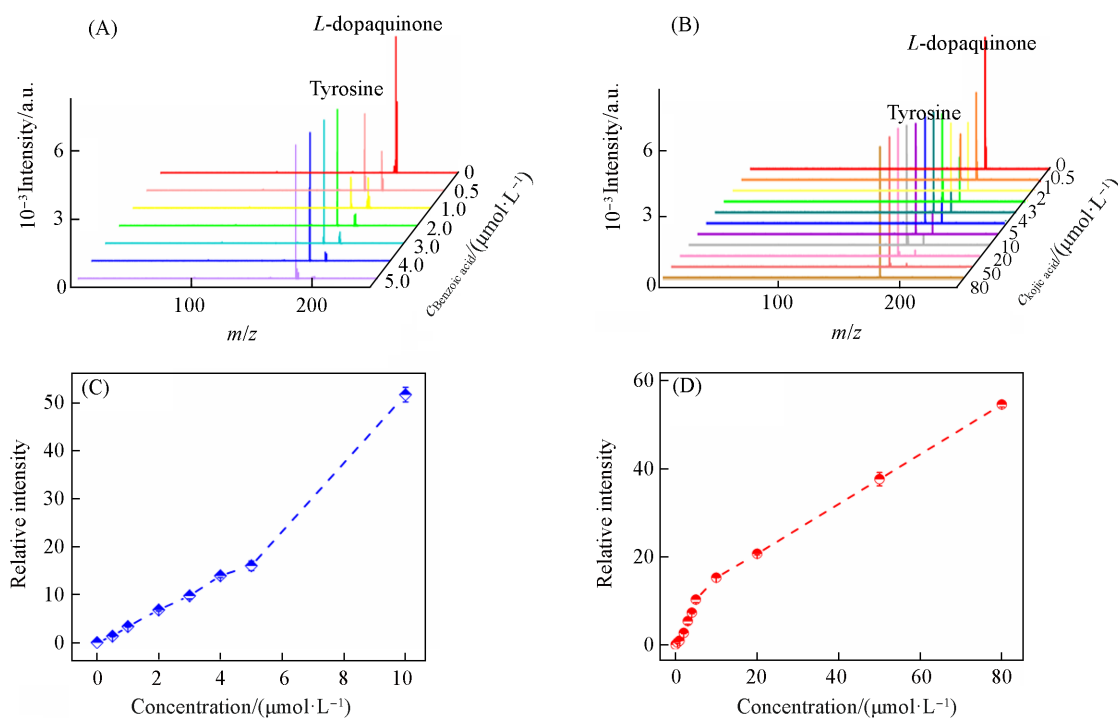


Fig. 5 Mass spectra of tyrosine metabolized into *L*-dopaquinone(A, B) and the relative intensity change of the MS signal(C, D) at different concentrations of benzoic acid(A, C) and kojic acid(B, D)

The intensity of the MS signal was measured at various concentrations of benzoic acid and kojic acid, and the results showed a clear correlation between the concentration of the analyte and the intensity of the MS signal. As the concentration of benzoic acid or kojic acid increased, the intensity of the MS signal also increased proportionally. Each bar represents the mean±standard deviation($n=3$).

3 结 论

建立了一种基于基质辅助激光解析质谱的高通量酪氨酸酶活性及抑制剂分析方法.首先,利用 $\text{Fe}_3\text{O}_4@G$ 纳米材料的大范围离域 π 电子系统、超大比表面积和磁响应性能,实现快速高效地磁分离酪氨酸代谢过程中的底物和反应产物.然后,利用石墨烯优异的紫外光吸收性能,将磁性石墨烯纳米材料作为基质用于MALDI-MS检测.最后,将负载有酪氨酸和*L*-多巴醌的磁性石墨烯纳米材料直接滴加到MALDI-MS靶板上进行质谱分析.与传统的酪氨酸酶活性及抑制剂分析方法相比,本文方法显著提高了分析效率,实现高灵敏检测,并提供待测物结构信息,为探索新的酪氨酸酶抑制剂提供了新路径.研究结果为深入了解黑色素合成过程以及开发有效的药物和美容产品提供了可靠的理论支持.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20240330>.

参 考 文 献

[1] Lai X. L., Wichers H. J., Soler-Lopez M., Dijkstra B. W., *Chemistry-Eur. J.*, 2018, 24(1), 47–55

- [2] Fan M. H., Zhang G. W., Hu X., Xu X. M., Gong D. M., *Food Res. Int.*, **2017**, *100*, 226—233
- [3] Zolghadri S., Bahrani A., Hassan-Khan M. T., Munoz-Munoz J., Garcia-Molina F., Garcia-Canovas F., Saboury A. A., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2019**, *34*(1), 279—309
- [4] Pillaiyar T., Manickam M., Namasivayam V., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2017**, *32*(1), 403—425
- [5] Saeedi M., Eslamifar M., Khezri K., *Biomed. Pharmacother.*, **2019**, *110*, 582—593
- [6] Huang L. L., Jiang S. Y., Shi Y. K., *J. Hematol. Oncol.*, **2020**, *13*(1), 143
- [7] Du Z. F., Lovly C. M., *Mol. Cancer*, **2018**, *17*, (1), 58
- [8] Hou J. Y., Dong J., Zhu H. S., Teng X., Ai S. Y., Mang M. L., *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, *68*, 20—26
- [9] Nazir Y., Saeed A., Rafiq M., Afzal S., Ali A., Latif M., Zuegg J., Hussein W. M., Fercher C., Barnard R. T., Cooper M. A., Blaskovich M. A. T., Ashraf Z., Ziora Z. M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2020**, *30*(1), 126722
- [10] Nedellec Y., Gondran C., Gorgy K., MC Murtry S., Agostini P., Elmazri O., Cosnier S., *Biosens. Bioelectron.*, **2021**, *180*, 113137—113141
- [11] Liu G. Y., Zhao J. H., Lu, S. S., Wang S., Sun J., Yang X. R., *ACS Sens.*, **2018**, *3*(9), 1855—1862
- [12] Zhao J. H., Bao X. F., Wang S., Lu S. S., Sun J., Yang X. R., *Anal. Chem.*, **2017**, *89*(19), 10529—10536
- [13] Yu L., Gao Z. H., Xu Q., Pan X. Y., Xiao Y. X., *Biosens. Bioelectron.*, **2022**, *210*, 114320
- [14] Chen J., Wei X., Tang H., Ali M. C., Han Y. X., Li Z., Qiu H. D., *Sens. Actuators B*, **2020**, *305*, 127386
- [15] Peng M. S., Wang Y., Fu Q., Sun F. F., Na N., Ouyang J., *Anal. Chem.*, **2018**, *90*(10), 6206—6213
- [16] Li S. Q., Zhao R. Y., Ma M. R., Fu G. Q., Mu S., Han T. H., Liu X. Y., Zhang H. X., *Sens. Actuators B*, **2022**, *370*, 132438
- [17] Calvano C. D., Monopoli A., Cataldi T. R. I., Palmisano F., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2018**, *410*(17), 4015—4038
- [18] Shi C. Y., Deng C. H., *Analyst*, **2016**, *141*(10), 2816—2826
- [19] Abdelhamid H. N., *Microchim. Acta*, **2018**, *185*(3), 200
- [20] Kind T., Tsugawa H., Cajka T., Ma Y., Lai Z. J., Mehta S. S., Wohlgemuth G., Barupal D. K., Showalter M. R., Arita M., Fiehn O., *Mass Spectrom. Rev.*, **2018**, *37*(4), 513—532
- [21] Chen L. F., Ou J. J., Wang H. W., Liu Z. S., Ye M. L., Zou H. F., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, *8*(31), 20292—20300
- [22] Huang D. N., Wang X. Y., Deng C. H., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2013**, *27*(7), 847—850
- [23] Sha Y. F., Huang D. N., Zheng S. J., Deng C. H., *Anal. Methods*, **2013**, *5*(18), 4585—4590
- [24] Fang X. N., Zhang K., Yang P. Y., Qiao L., Liu B. H., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2016**, *30*(S1), 128—132
- [25] Shi C. Y., Deng C. H., Li Y., Zhang X. M., Yang P. Y., *Proteomics*, **2014**, *14*(12), 1457—1463
- [26] Sun N. R., Deng C. H., Li Y., Zhang X. M., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2014**, *6*(14), 11799—11804
- [27] Cho Y. T., Su H., Wu W. J., Wu D. C., Hou M. F., Kuo C. H., Shiea J., *Adv. Clin. Chem.*, **2015**, *69*, 209—254
- [28] Santos I. C., Hildenbrand Z. L., Schug K. A., *Analyst*, **2016**, *141*(10), 2827—2837
- [29] Patel R., *Clin. Chem.*, **2015**, *61* (1), 100—111
- [30] Li Y. X., Chen X. M., Xia L., Xiao X. H., Li G. K., *J. Chromatogr. A*, **2019**, *1606*, 460382
- [31] Jiang D. D., Wu S. Y., Lv S. Q., Qi R. X., Li Y. Y., Liu J. H., *Microchim. Acta*, **2023**, *190*(11), 452
- [32] Xie L. J., Jiang R. F., Zhu F., Liu H., Ouyang, G. F., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, *406*, 377—399
- [33] Guo N. H., You X., Wu Y. T., Du D., Zhang L., Shang Q., Liu W. B., *Anal. Chem.*, **2020**, *92*(8), 5780—5786
- [34] Hashemi S. M., Emami S., *Pharm. Biomed. Res.*, **2015**, *1*(1), 1—17

(Ed.: L, W, K)