

# 异硫氰酸荧光素-牛血清白蛋白标记物的化学发光反应

黄春保<sup>\*1</sup> 慈云祥<sup>2</sup> 常文保<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(黄冈师范学院化学系, 黄州 438000) <sup>2</sup>(北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

**摘 要** 采用反相流动注射法,系统地研究了碱性介质中和阳离子在表面活性剂 CTMAB 存在下,NaClO 氧化异硫氰酸荧光素-牛血清白蛋白标记物的化学发光行为和化学发光反应的条件,提出了反相流动注射化学发光测定牛血清白蛋白的新方法。该法测定牛血清白蛋白线性范围为 0.08 ~ 16 mg/L;检出限为 0.032 mg/L。讨论了蛋白质标记物化学发光增强作用的原因。

**关键词** 异硫氰酸荧光素,牛血清白蛋白,化学发光反应,流动注射法

## 1 引 言

蛋白质测定在临床医学和生命科学研究中具有重要意义。这方面的研究引起了人们的广泛重视。近年来,常见蛋白质测定方法的报道,其中大多是利用蛋白质与生色探针的结合作用,生成有色复合物后以分光光度法测定<sup>1-3</sup>,少数是将蛋白质用吡啶、四环素等荧光探针标记后,用荧光光度法测定<sup>4,5</sup>,也见有蛋白质电分析方法的报道<sup>6</sup>。这些方法在临床检测和生化分析中具有一定的应用价值。

研究发现,在碱性条件下,选用某些氧化剂氧化异硫氰酸荧光素(FITC),能产生化学发光,但强度很弱。若在碱性介质中,将异硫氰酸荧光素标记到蛋白质分子上,生成的蛋白质标记物则更易于氧化,不仅化学发光能力极大增强,而且发光强度与蛋白质的含量呈良好的线性关系。本文采用反相流动注射方法,研究了碱性介质中,次氯酸钠氧化异硫氰酸荧光素-牛血清白蛋白(BSA)标记物的化学发光行为、反应条件和阳离子表面活性剂的增敏作用,提出了反相流动注射化学发光测定牛血清白蛋白的新方法。体系的发光强度与 BSA 的含量在 0.08 ~ 16 mg/L 范围内呈良好的线性关系;检测限为 0.032 mg/L。由于采用反相流动注射进样方式,消除了样品背景干扰,故方法的灵敏度高,且稳定性好。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

GD-1 型微光测量仪(西北有色地质研究所);LP-1 型蠕动泵(北京东方仪器设备公司);自动平衡记录仪(上海大华仪表厂);821 型 pH 计(中山大学)。

BSA(A. R., Sigma 公司)。FITC 溶液(1 g/L):称取 50 mg FITC(第三军医大学朝晖制药厂),用 5 mL 0.5 mol/L 碳酸盐缓冲溶液和少量水使其溶解后转入 50 mL 容量瓶中定容。9.0 × 10<sup>-2</sup> mol/L NaClO 溶液(pH = 9.5):移取 1.5 mol/L NaClO 溶液,适当稀释,用 HCl 调节溶液酸度至 pH = 9.5(酸度计测量),然后定容,该溶液在使用前配制。8.0 × 10<sup>-4</sup> mol/L CTMAB 溶液;0.5 mol/L NaHCO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 缓冲溶液(pH = 9.5)。所用试剂均为分析纯,用二次蒸馏水配制溶液。

### 2.2 实验方法

**2.2.1 FITC-BSA 标记物的制备与分离** 准确称取 40 mg BSA 置于比色管中,依次加入 1.5 mL 水,0.5 mL 碳酸盐缓冲溶液,摇匀后缓慢滴加 1 mL FITC 溶液,混合均匀后置于冰箱(4 ℃)中反应 12 h。用 G25 色谱柱分离游离的 FITC。收集 FITC-BSA 标记物并定容 20 mL。该液准确稀释 250 倍后用于化学发光体系的实验。

**2.2.2 测定方法** 采用反相流动注射法。测定装置流程和抽取试液速度、试液混合顺序如图 1 所示。NaClO 溶液通过旋转六通阀注入,每次注射体积为 100 μL。试液在流动过程中混合,并立即流进发光仪

检测化学发光强度,以响应信号峰高进行定量分析。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 发光性质

在选定的条件下,对 FITC、BSA 和 FITC-BSA 标记物进行了化学发光实验。结果表明:FITC 能被氧化而发光,但发光能力不强;BSA 未观察到氧化发光现象;FITC-BSA 标记物却具有很强的氧化发光能力。向含有标记物的试液中注射 NaClO 溶液 3 s 后即有光响应信号,10 s 时响应信号达最大值,随后迅速消失。由此可见, FITC-BSA-ClO<sup>-</sup>-CTMAB 化学发光体系是快速化学发光体系。

#### 3.2 表面活性剂的选择和用量的影响

实验了阳离子型、阴离子型和非离子型表面活性剂的增敏作用。结果表明,仅阳离子表面活性剂对 FITC-BSA-ClO<sup>-</sup> 体系的化学发光有增强作用。在比较溴化烷基三甲胺类和溴化烷基吡啶类阳离子表面活性剂的增敏效果时,发现溴化烷基三甲胺类的增敏作用强于溴化烷基吡啶类;而在同类阳离子表面活性剂中,当主碳链上碳原子数  $n = 14$  时,其增敏作用随主碳氢链的增长而依次增加。由于 CTMAB 能使体系的化学发光强度增大 30 倍且体系的发光强度稳定,故 CTMAB 被选用。进一步的实验表明,CTMAB 浓度在  $4.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 范围内,体系的化学发光强度最大且稳定。实验选用 CTMAB 的浓度为  $8.0 \times 10^{-4}$  mol/L。

#### 3.3 酸度的影响

通过调节 NaClO 溶液的酸度来控制化学发光反应体系的酸度。在充分搅拌下,向 NaClO 溶液中缓慢加入稀 HCl 或 NaOH,用酸度计测量溶液的酸度,制备不同酸度的 NaClO 溶液。实验了酸度对体系化学发光强度的影响,结果表明 NaClO 溶液的 pH 在 8.5 ~ 10.5 范围内,体系的化学发光强度最大且稳定。当酸度太高或太低,都会使体系的化学发光强度显著降低。实验选用 pH = 9.5 的 NaClO 溶液。

#### 3.4 NaClO 浓度的影响

实验了 NaClO 溶液的浓度对体系化学发光强度的影响。结果表明:当 NaClO 的浓度大于  $6.0 \times 10^{-2}$  mol/L 时,体系的发光强度达到最大且稳定。为减少调节 NaClO 溶液酸度时逸出 Cl<sub>2</sub> 对工作环境的污染,实验中选用  $9.0 \times 10^{-2}$  mol/L NaClO 溶液。

#### 3.5 工作曲线

结果表明:在选定实验条件下,标记物中 BSA 含量在 0.08 ~ 16 mg/L 范围内,化学发光强度与 BSA 含量呈良好的线性关系。线性方程为  $I_G = -3.5 + 21.83 C(\text{mg/L})$ ,相关系数  $r = 0.999$  ( $n = 10$ );方法的检测限为 0.032 mg/L。对含 0.8 mg/L BSA 标记物平行测定 11 次,其相对标准偏差为 1.8%。由此可见,该法的灵敏度高,重现性好。

#### 3.6 FITC-BSA 发光能力增强作用的探讨

FITC 和 FITC-BSA 标记物的结构分别如图 2 和图 3(为方便讨论,结构式中苯环上的碳原子以数字标示),它们均属三苯甲烷类酸性染料的衍生物。该类物质被氧化,能生成苯多酚而产生化学发光,其化学发光能力与分子中 C<sub>9</sub> 和 C<sub>14</sub> 间的电子密度差(值)的大小和分子间的能量转移有关。C<sub>9</sub> 和 C<sub>14</sub> 间的电子密度差越大(值越大),其发光能力越强;减少激发分子的非辐射能量损失,有利于提高体系的发光强度<sup>7</sup>。在碱性介质中,用 NaClO 氧化 FITC 和 FITC-BSA,均是由于生成苯多酚发光。因此,在标记物中发光母体仍可以认为是 FITC。在相同的反应条件下, FITC-BSA 标记物的化学发光能力远远大于游离 FITC 的化学发光能力。究其原因,我们认为主要是标记物中发光母体的结构变化所致。由图 3 可见,在 FITC 分子中 C<sub>17</sub> 上连接的是异硫氰基,而在标记物中, FITC 的异硫氰基与蛋白质的自由氨基经

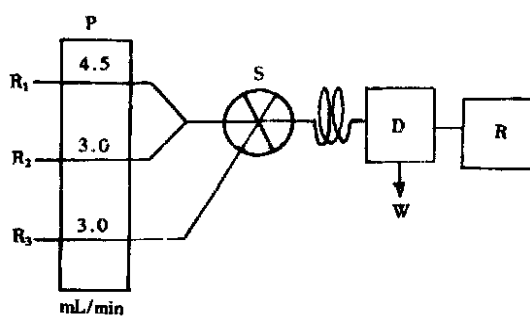


图1 流动注射体系

Fig. 1 Schematic diagram of the flow injection system

P. 蠕动泵(peristaltic pump); S. 注射器(injector); D. 检测体系(detection system); R. 记录仪(recorder); W. 废液(waste); R<sub>1</sub>. fluorescein isothiocyanate-bovine serum albumin (FITC-BSA); R<sub>2</sub>.  $8.0 \times 10^{-4}$  mol/L cetyltrimethylammonium bromide; R<sub>3</sub>.  $9.0 \times 10^{-2}$  mol/L NaClO.

碳酰胺化而形成了硫碳氨基键,这种基团结构的改变导致了共轭体系中碳原子上的电子密度的改变。我们采用半经验法 PM3 分别计算了 FITC 和 FITC-BSA 分子中共轭环上碳原子的电荷密度,并由此计算出  $C_9$  和  $C_{14}$  之间的  $\rho$  值分别为  $\rho_{FITC} = 0.092$  和  $\rho_{FITC-BSA} = 0.103$ 。故 FITC-BSA 标记物的化学发光能力更强。

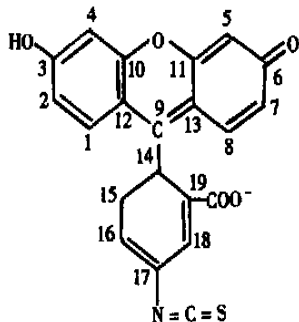


图 2 FITC 的结构式

Fig. The structure of FITC

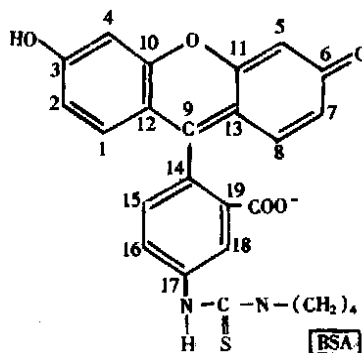


图 3 FITC-BSA 的结构式

Fig. 3 The structure of FITC-BSA

## References

- 1 Wei Yongju (魏永巨), Li Kean (李克安), Tong Shenyang (童沈阳). *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报), **1996**, 17(11):1687~1692
- 2 Hu Qiuluan (胡秋鸾), Li Na (李娜), Zhao Fenglin (赵凤林), Li Kean (李克安), Tong Shenyang (童沈阳). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **1999**, 27(2):166~169
- 3 Zaia D A M, Verri W A, Zaia C T B V. *Talanta*, **1999**, 49(2):373~376
- 4 Huang Ziyun (黄祖云), Yue Guihua (岳贵花), Chen Zhenhua (陈震华), Xu Li (许莉), Zhang Zongxian (张宗显). *Journal of Analytical Science* (分析科学学报), **1997**, 13(3):213~215
- 5 Song Gongwu (宋功武), Feng Guangrong (冯光荣), Li Ying (李瑛), Wan Liyuan (万里元). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2000**, 28(5):659
- 6 Williams KM, Ekstroem J, Marshall T. *Electrophoresis*, **1999**, 20(7):1373~1381
- 7 Chen GN, Huang C S. *Talanta*, **1988**, 35(8):625~631

## Study on Chemiluminescence Reaction of Fluorescein Isothiocyanate Labeled Protein by Flow Injection Method

Huang Chunbao<sup>\*1</sup>, Ci Yunxiang<sup>2</sup>, Chang Wenbao<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (Department of Chemistry, Huanggang Teacher's College, Huangzhou 438000)

<sup>2</sup> (College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

**Abstract** The chemiluminescence characteristic of bovine serum albumin (BSA) labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) has been studied. The experimental conditions for the BSA-FITC-ClO<sup>-</sup>-CTMAB (cetyltrimethylammonium bromide) chemiluminescent system were optimized. Based on the relation between chemiluminescence intensity and protein concentration a flow injection assay method has been established for the quantitative determination of bovine serum albumin. The linear range for BSA is 0.08~16.0 mg/L, the detection limit is 0.032 mg/L. The relative standard deviation ( $n = 11$ ) for the determination of 0.8 mg/L BSA is 1.8%. The enhancement effect of chemiluminescence characteristic of protein labelled with FITC is discussed.

**Key words** Fluorescein isothiocyanate, bovine serum albumin, chemiluminescence reaction, flow injection method

(Received 17 May 2001; accepted 26 November 2001)