

IgG-Eu-IDPA 对抗原 IOV 的时间分辨荧光免疫检测*

李占东¹⁾ 吕会田²⁾ 乐加昌¹⁾ 范青华³⁾ 李文⁴⁾ 罗志勇^{1)**}

¹⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ²⁾北京工商大学生物系, 北京 100037;

³⁾中国科学院化学研究所, 北京 100080; ⁴⁾中国科学院理化技术研究所, 北京 100101)

摘要 镧系螯合物已经被广泛应用于高灵敏度的时间分辨荧光免疫分析. 但是, 使用紫外光激发镧系螯合物会对生物分子和细胞产生很大的损害. 合成了能够被可见光(最大波长 565 nm) 激发的 IgG-Eu-IDPA, 并测量了 IgG-Eu-IDPA 的光谱属性, 如荧光寿命、在不同 pH 值和不同浓度环境下的荧光强度. 在自制的时间分辨荧光仪上使用 IgG-Eu-IDPA 作为荧光探针, 检测 IOV 抗原. 数据显示, 它的灵敏度远远高于传统的荧光仪. 结果表明, IgG-Eu-IDPA 能够在高灵敏度的原位和活体分析中作为一种新的、有潜力的荧光探针.

关键词 荧光光谱, 荧光探针, 时间分辨荧光免疫分析

学科分类号 Q6

镧系金属化合物以其出色的荧光特性在荧光材料中占有重要的位置. 与传统荧光染料相比, 镧系金属具有荧光峰半宽窄、荧光寿命长、生物毒性小等特点, 广泛应用于时间分辨荧光检测和生物的活体检测^[1~3].

当前镧系金属用于时间分辨荧光检测一般是用紫外光激发, 其对样品的组分有破坏作用, 且会激发蛋白质的内源荧光, 增加了检测的本底.

我们合成了可见光激发的 Eu 基荧光探针并用于对抗原的时间分辨荧光免疫检测, 降低了激发光对样品的破坏, 减少了本底干扰. 在检测仪器方面, 采用自己研制的时间分辨荧光仪, 采用发光二极管(LED)脉冲光源, 降低了仪器的成本, 扩大了适用范围, 并可实现仪器的小型化.

1 生化试剂和检测仪器

1.1 生化试剂

IgG 购自北京欣经科生物技术公司. IOV、A6D 由猪血中分离提纯而得. EuCl₃、白屈氨酸为中国科学院化学研究所提供. 其他试剂为国产分析纯.

1.2 检测仪器

F4500 型荧光仪(HITACHI 公司), U-2010 型紫外吸收仪(HITACHI 公司), F-900 型荧光寿命仪(EDINBURGH 公司), 时间分辨荧光仪(自制).

2 实验方法与步骤

2.1 合成荧光探针

a. 取 1.96 g 白屈氨酸(化合物(1))加 6.2 ml 苯氧氯化磷, 油浴加热到 130°C~140°C 2.5 h, 冷却到室温, 生成化合物(2), 缓慢加入 40 ml 无水甲醇(约 25~30 min), 继续搅拌反应 10 min, 用 80 ml 双蒸水稀释. 所得溶液用 3×65 ml 乙酸乙酯萃取, 再用 3×50 ml 双蒸水水洗, 得 160 ml 乙酸乙酯溶液. 经无水 Na₂SO₄ 干燥, 过夜, 用旋转蒸发器蒸干溶剂, 用甲醇重结晶, 得化合物(3).

b. 取 2 g 化合物(3)加 28%的氨水, 在一封闭的容器中加热到 150°C 反应 24 h, 冷却到室温, 加浓盐酸调 pH 值到 2.5, 在蒸发皿中蒸干得到白色固体, 即化合物(4).

c. 取所得固体(4) 1.0 g, 加入对甲苯磺酸 0.2 g 作为催化剂, 与 25 ml 甲醇在 50 ml 圆底烧瓶中 80°C 油浴回流 16 h, 同时以氮气保护. 反应结束后, 停止加热, 逐渐冷却后用旋转蒸发器蒸干溶剂, 加入双蒸水, 以饱和 NaHCO₃ 中和, 调 pH 为 7 左右, 用 3×25 ml 乙酸乙酯萃取, 旋转蒸干, 再用 CHCl₃

*国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2002AA248051)和国家自然科学基金资助项目(30100040).

** 通讯联系人. Tel: 010-64888423, E-mail: pchh@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2005-07-19, 接受日期: 2005-09-07

溶解, 用氮气吹至浓缩 (便于点样). 用硅胶薄层层析分离, 展开剂为 $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 8 : 1$, 在紫外光下得到 4 条明显的带, 刮下最上面的那条带用 CHCl_3 提取, 浓缩重结晶, 得 15 mg 化合物 (5).

d. 取 15 mg 化合物 (5) 加 7 mg $(\text{ICH}_2\text{CO})_2\text{O}$ 、1.5 ml 乙酸酐、4 mg 对甲苯磺酸, 油浴 60°C 1 h, 冷却后用 10 ml 双蒸水稀释, 80°C 加热 10 min, 除去溶剂乙酸酐, 然后用乙酸乙酯萃取 3 次, 旋转蒸

干后用甲醇溶解, 重结晶得化合物 (6) 20 mg IDPA (I substitute dipicolinic acid)^[4,5].

e. 取 2 mg IgG 加 2 mg IDPA 溶于 $700 \mu\text{l}$ 0.1 mol/L 硼酸钾溶液中, 调 pH 值为 9, 室温 24 h, 用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, PBS 稀释至 $8 \sim 10 \text{ g/L}$, 再加入 1 mmol/L EuCl_3 溶液, 得到 Eu-IDPA 与蛋白质的螯合物.

IgG-Eu-IDPA 的合成路径见图 1.

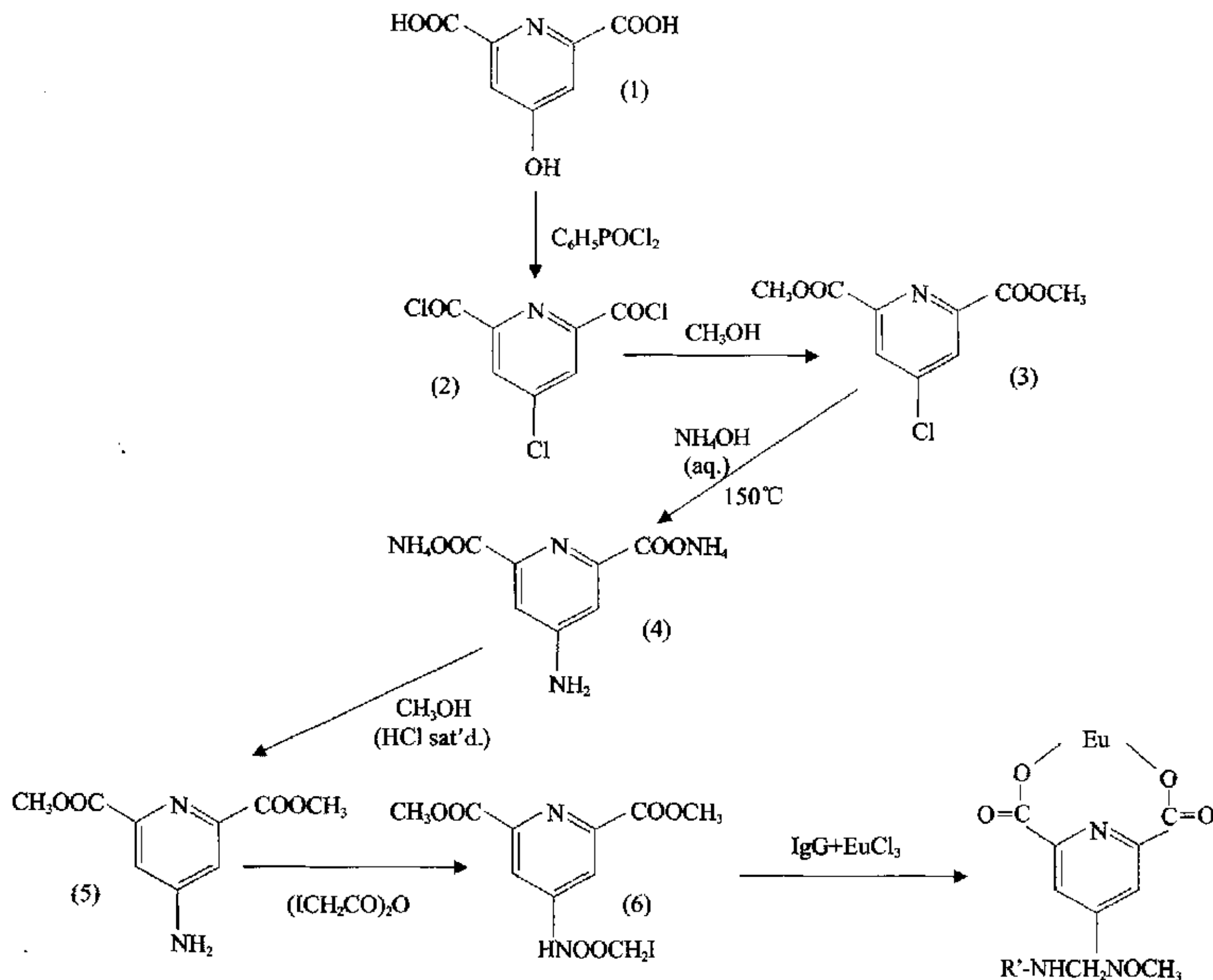


Fig. 1 Route of Compounding IgG-Eu-IDPA

2.2 搭建时间分辨荧光仪

稳态荧光仪是用连续光照射样品, 这样检测到的荧光实际上包括: 暗记数、样品的散射光、杂质荧光和真正的荧光. 在荧光很弱, 或激发光与发射光波长差不多的时候, 样品的散射光和杂质荧光会产生很强的干扰. 而时间分辨荧光仪采用脉冲光源, 通过时间阈值将散射光和杂质荧光过滤掉, 对于微弱荧光的检测有重大意义^[2].

图 2 为时间分辨荧光仪的示意图, LED 脉冲光源以一定的频率发射激发光到样品, 同时产生触发信号, 分别经延时电路 1 和延时电路 2 送到光子计数器控制其开始计数和终止计数, 样品在激发光

的作用下产生荧光, 光电倍增管将荧光信号转化为电流脉冲 (一个电流脉冲对应一个光子信号) 放大后送到光子计数器, 光子计数器根据设定的时间阈值, 记录触发信号后特定时间窗口内的电脉冲个数.

2.3 时间分辨荧光仪的组成部分

激发光源为自制的 μs 脉宽高亮 LED 脉冲光源, 其重复频率可调. 光电倍增管选用 R955 型光电倍增管. 光子计数器选用美国 Stanford 公司 SR-400 型单光子计数器, 该计数器可实现在选通时间窗口内对单光子脉冲计数.

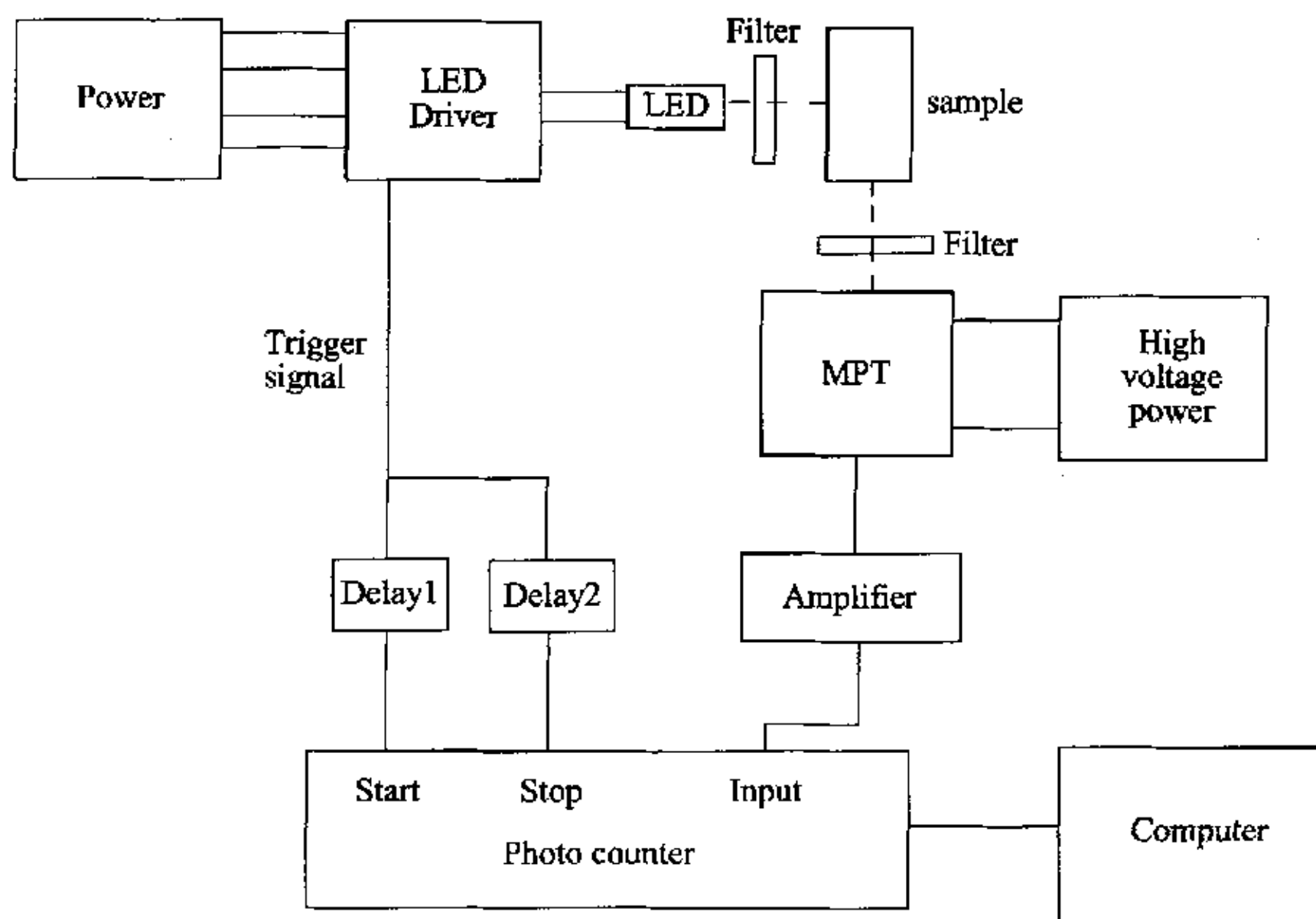


Fig. 2 Sketch map of time resolved luminoscope

3 结果与讨论

3.1 荧光探针的荧光特性

图 3 为荧光探针的吸收光谱, 可以看出荧光探针在 547 nm、565 nm 有吸收峰, 其中 565 nm 的吸收峰稍强于 547nm 的吸收峰.

图 4 为 565 nm 激发荧光探针的荧光光谱, 表明在 594 nm、616 nm、694 nm 有荧光峰, 其中 616 nm 的荧光峰最强, 694 nm 的荧光峰最弱.

图 5 为 IgG-Eu-IDPA 在激发光波长为 565 nm 时, 616 nm 荧光的衰减曲线. 荧光探针被激发光激发时, 会产生两种不同寿命荧光, 长寿命荧光寿命约为 20 μ s, 短寿命荧光寿命约为 4 us. 这与镧系金属有机配合物的能量传递理论^[6,7]一致.

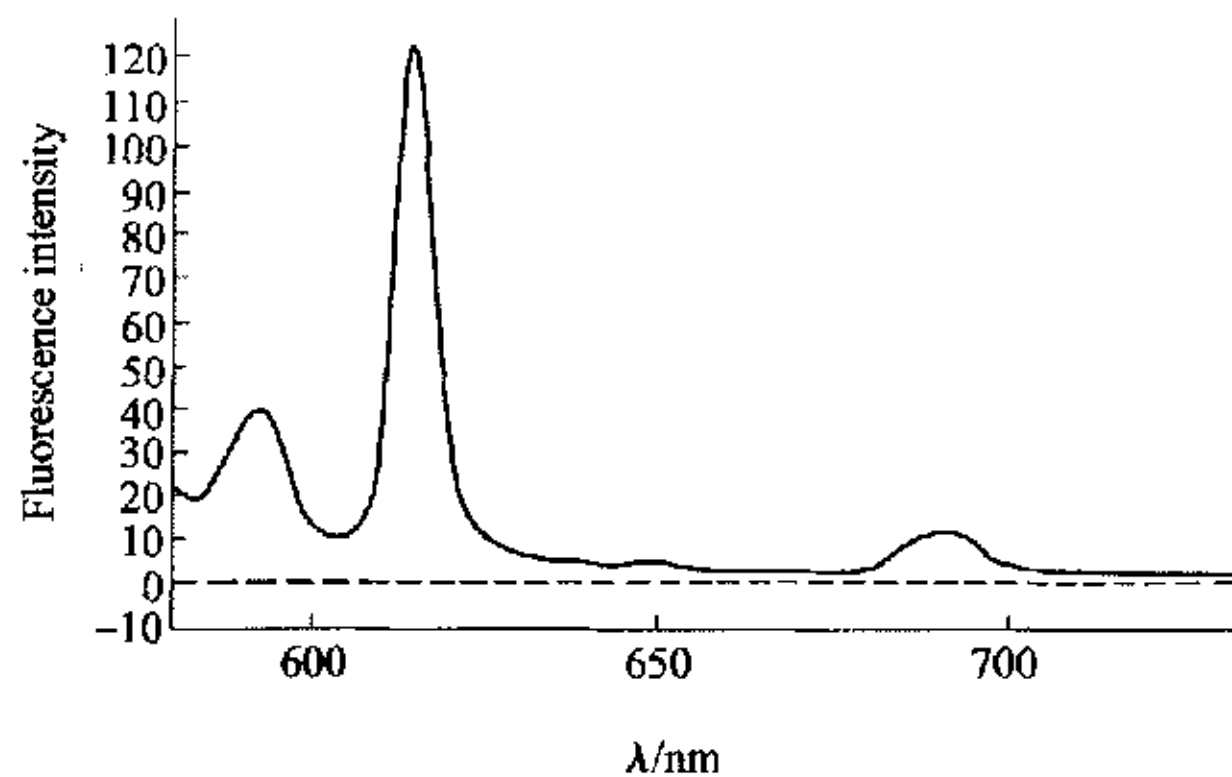


Fig. 4 Fluorescence spectrum of IgG-Eu-IDPA that excited by 565 nm light

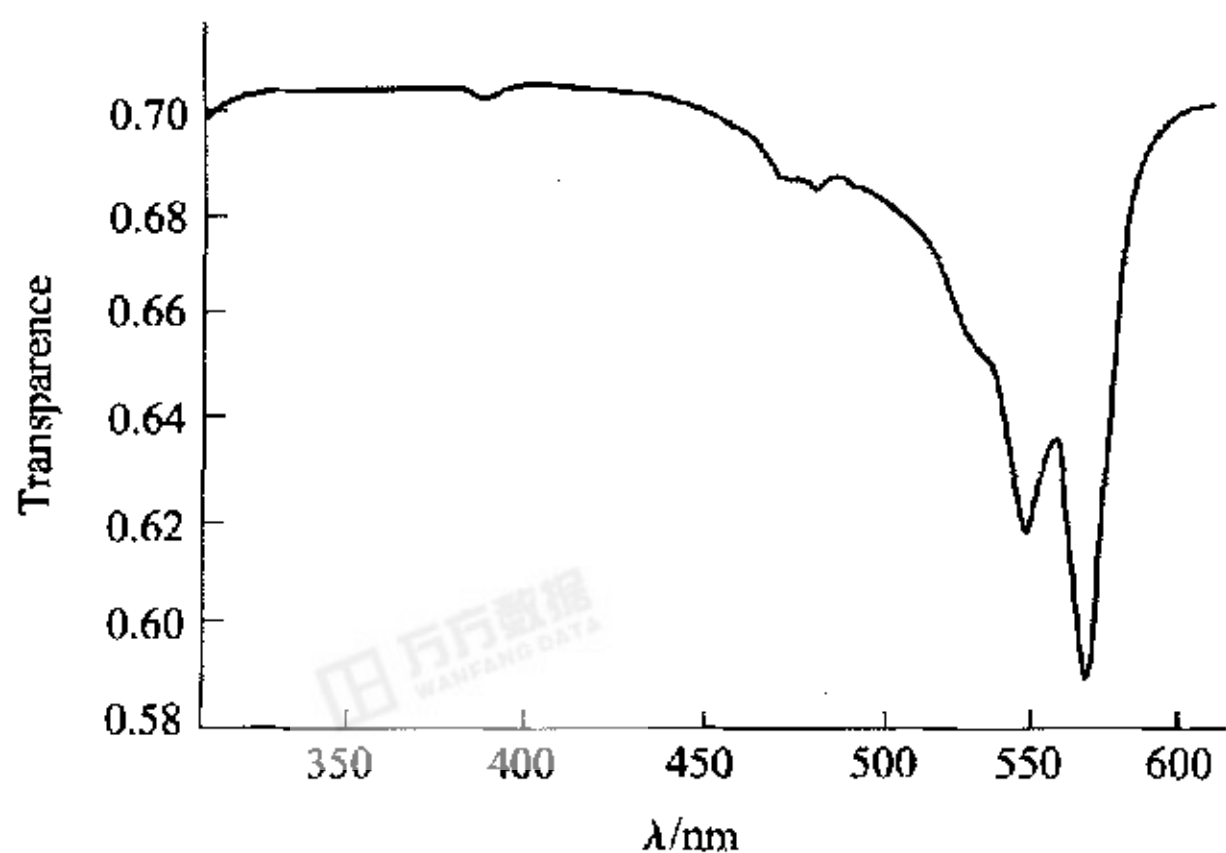


Fig. 3 Absorption spectrum of IgG-Eu-IDPA

3.2 pH 值对荧光探针荧光性质的影响

将荧光探针用不同 pH 的柠檬酸缓冲液稀释至 0.01mmol/L, 用 F-4500 型荧光仪测量其稳态荧光. 图 6 为不同 pH 下的荧光探针的荧光强度, 可以看出荧光探针在 pH 为 4.9 左右荧光最强^[8].

3.3 浓度对荧光强度的影响

将荧光探针用 pH 为 4.9 的柠檬酸缓冲液稀释至不同的浓度, 用 F-4500 型荧光仪测量其稳态荧光. 图 7 为不同浓度下的荧光探针的荧光强度. 可以看出, 荧光探针在浓度 2×10^{-5} mol/L 左右荧光最强. 以后随着探针浓度的降低, 荧光强度也随之降低, 荧光强度与探针浓度成正比.

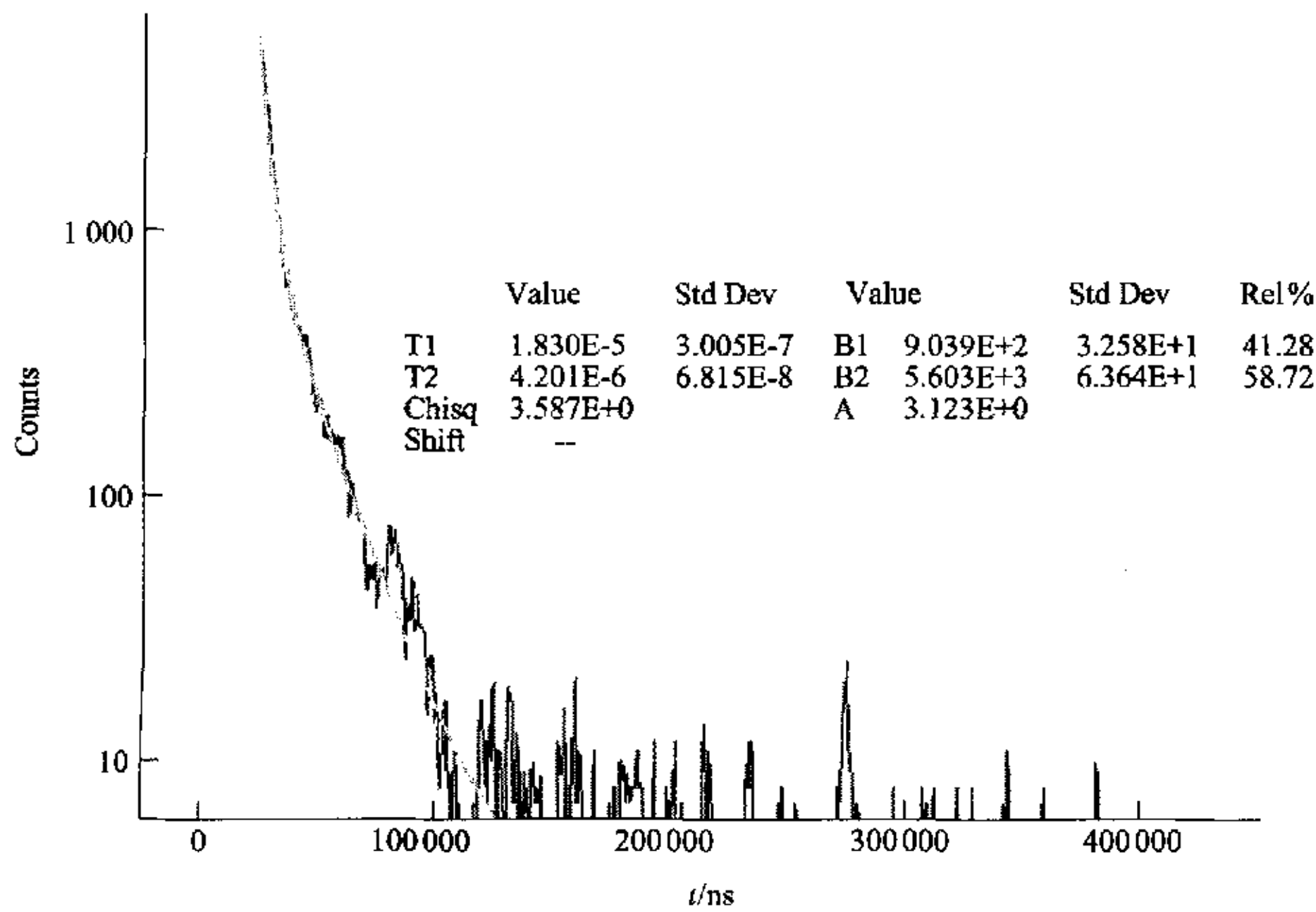


Fig. 5 Fluorescence lifetime of the IgG-Eu-IDPA

EX: 565 nm; EM: 615 nm. —: Original curve; —: Fitted curve.

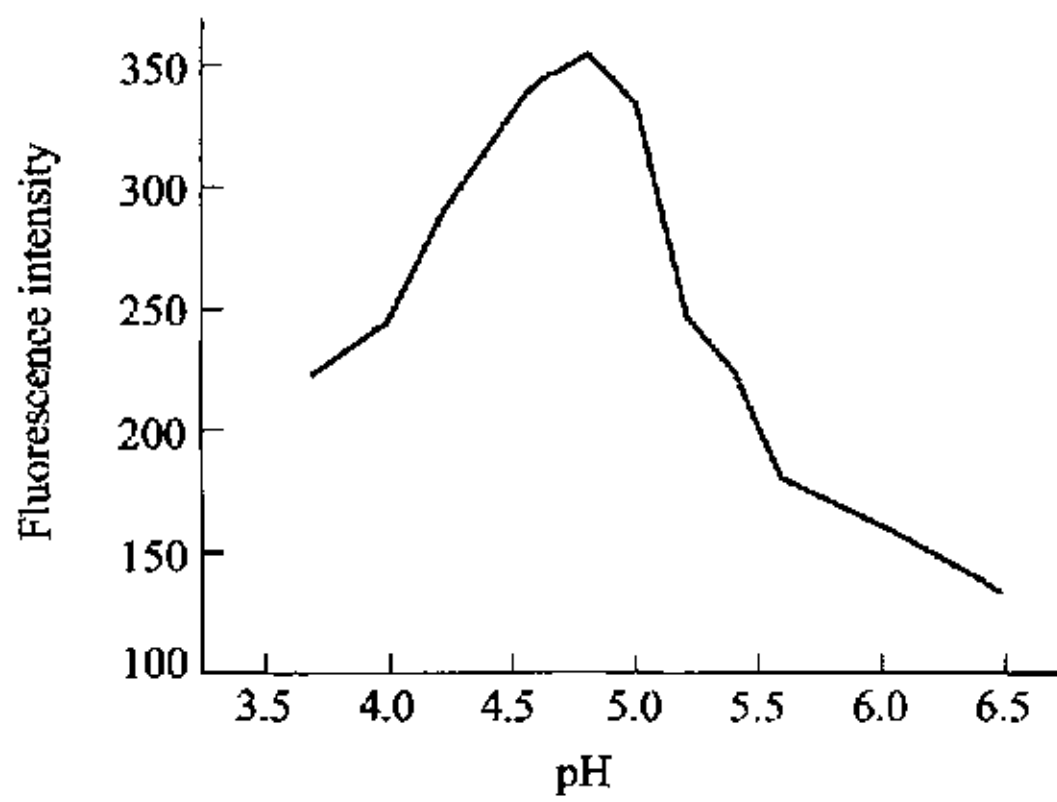


Fig. 6 Fluorescence intensity of IgG-Eu-IDPA at different pH

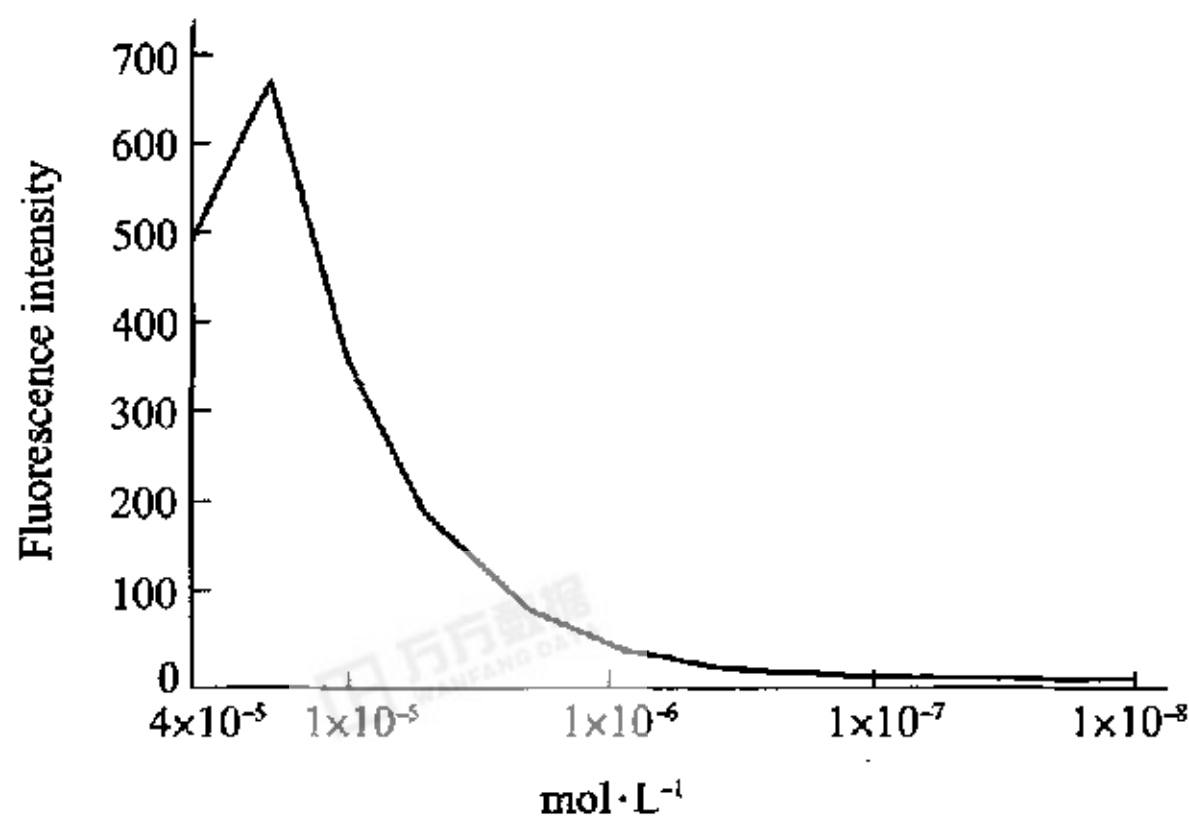


Fig. 7 Fluorescence intensity of IgG-Eu-IDPA in different concentration

3.4 荧光探针用于抗原的检测

参照 ELISA 方法^[9]将 0.5 ml 5 g/L A6D 抗体用 50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 9.6) 缓冲液稀释 10 倍铺到 96 孔板上的 8 个孔中包被过夜, 次日倾去包被液, 用洗涤液洗 3 次. 每孔加 0.6% 明胶封闭, 37°C 温育 2 h. 倾去封闭液, 洗板, 每孔加稀释至 10⁻⁹ mol/L 的抗原 IOV 0.2 ml, 37°C 温育 1 h. 倾出上清, 再用洗涤液洗 3 次. 每孔加入 0.5 ml (浓度为 0.5 g/L) 标记了荧光探针的羊抗鼠 IgG, 37°C 温育 1 h. 用洗涤液洗 5 次. 将 96 孔板上残留物质用 0.01% Triton X-100 洗脱、浓缩^[9], 加入 pH 4.9 的柠檬酸缓冲液, 进行稳态荧光检测. 图 8 是用稳态荧光仪 F-4500 检测所得的荧光光谱, 由图 8 可以看出, 稳态荧光仪已经检测不到抗原的存在.

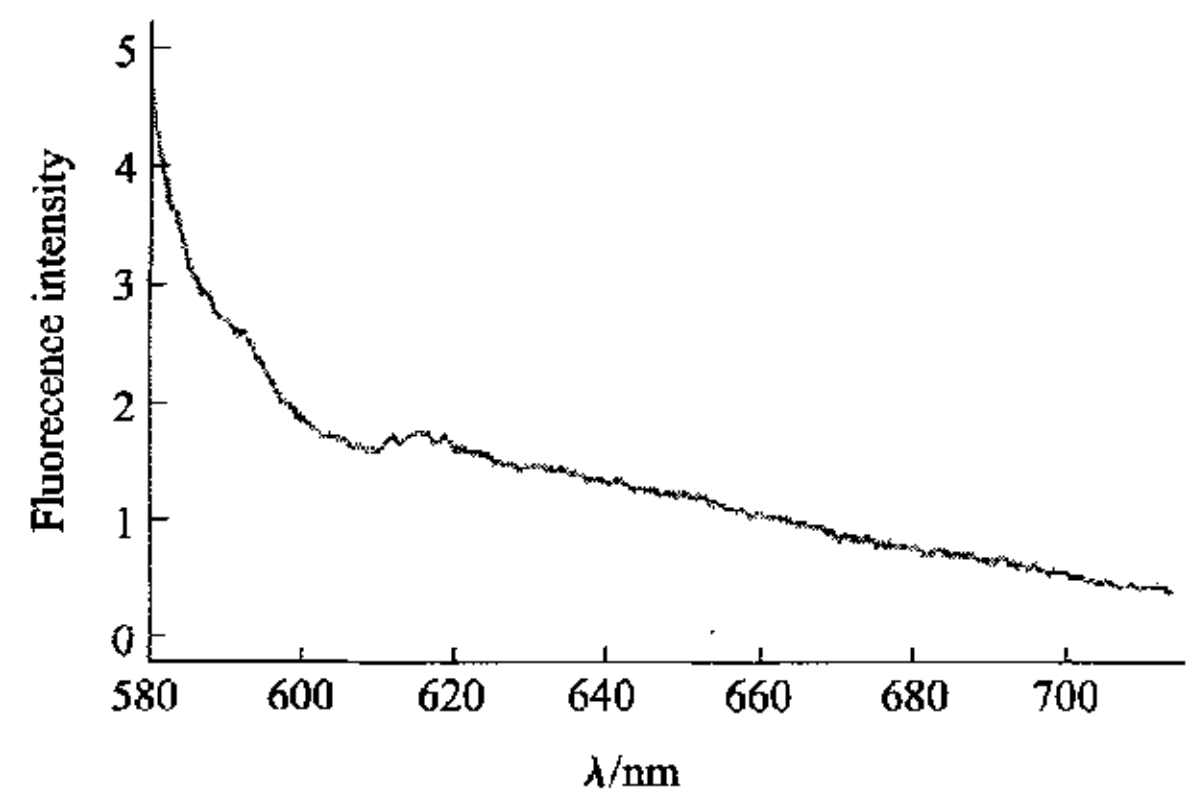


Fig. 8 Detect 10⁻⁹ mol/L antigen IOV using F-4500 luminoscope

为提高检测的精度,改用时间分辨荧光仪进行检测.脉冲光源的中心波长为 565 nm,脉冲频率为 1 000 Hz,时间门槛为 4 μ s,记数宽度为 600 μ s.图 9 是用时间分辨荧光仪检测稀释至 10^{-9} mol/L 的 IOV 抗原,可以看出时间分辨荧光仪由于加了时间门槛,过滤了杂散的荧光,还是可以明显地分辨样品与缓冲液,时间分辨荧光仪的灵敏度高于稳态荧光仪.

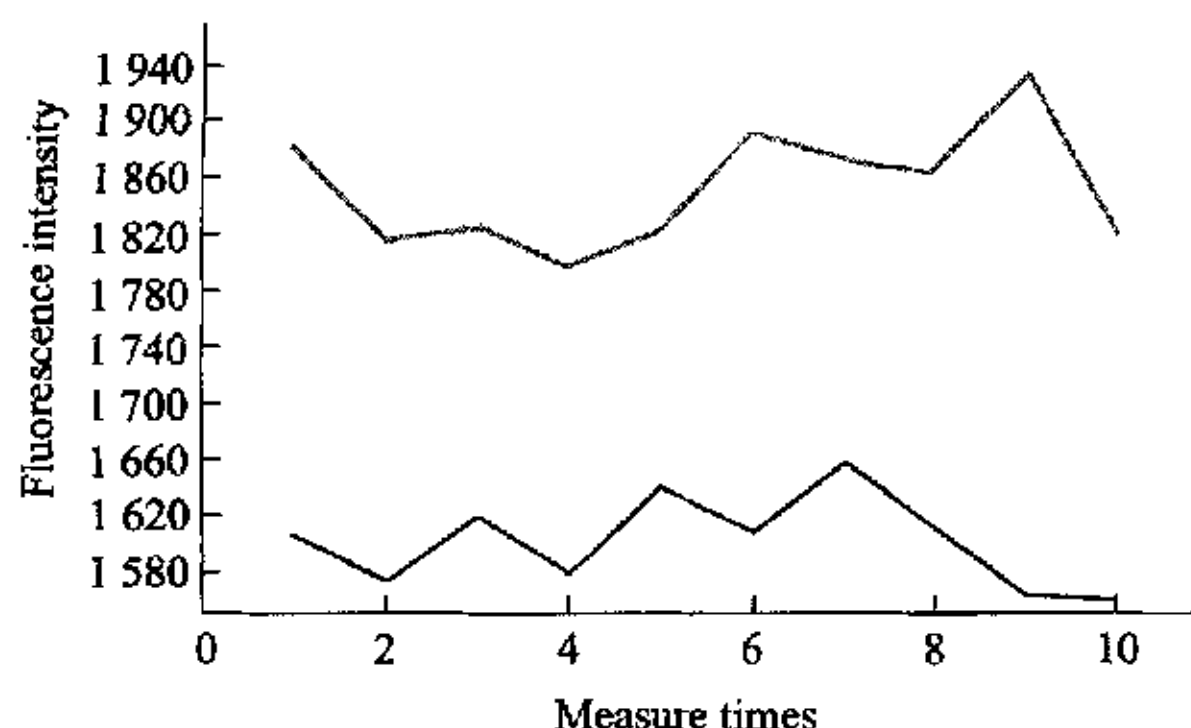


Fig. 9 Detect 10^{-9} mol/L antigen IOV using the time resolved luminoscope

—: Background; - - -: Sample.

4 结 论

Eu-IDPA 利用 565 nm 可见光激发样品,克服了紫外光对生物样品的破坏作用.其 stockes 位移约为 50 nm,远远少于传统的稀土荧光染料,但这不会影响检测灵敏度.因为 LED 的线宽远窄于闪光灯,并且在激发和发射光路上加了干涉滤光片,可有效抑制激发光的影响,而且时间分辨荧光方法检测是在激发光消失一段时间后才开始对荧光计数,因此激发光对荧光检测的干扰微乎其微.

传统的稀土荧光染料寿命为 1 ms,而我们合成的荧光探针寿命约为 20 μ s,当激发光脉冲足够窄以及具有良好的下降沿时,可以极大地提高激发光脉冲的重复频率,这样有助于提高检测灵敏度、检测结果的可靠性、缩短测量时间.

传统的时间分辨光谱仪采用的闪光灯工作电压达千伏以上,需要采取严格措施屏蔽高压气体放电产生的电磁干扰.而 LED 工作电压低、干扰少、功耗小、成本低并可实现仪器小型化.

Eu-IDPA 的荧光性质在以前的文献中有所介绍,但没有用于生物学的荧光检测.本实验把 Eu-IDPA 和抗体相联,用于抗原检测,为生物学检测提出了一个新的方法,但还需深入研究,如抗原浓度与荧光强度的线性关系等.

参 考 文 献

- Hindle A A, Hall E A H. Dipicolinic acid(DPA) assay revisited and appraised for spore detection. *Analyst*, 1999, **124** (11): 1599~1604
- 贾明, 邹红云. 时间分辨荧光免疫分析技术的发展现状. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, **17**: 635~637
Jia M, Zou H Y. *Journal of Cellular and Molecular*, 2001, **17**: 635~637
- Hindle A A, Hall E A H. Dipicolinic acid(DPA) assay revisited and appraised for spore detection. *Analyst*, 1999, **124** (11): 1599~1604
- Lamtire J B, Zhou Z H, Kumar A S, *et al.* Luminescence properties of terbium (III) complexes with 4-Substituted dipicolinic acid analogues. *Inorg Chem*, 1995, **34** (4): 864~869
- de Sá G F, Malta O L, de Mello C D. Spectroscopic properties and design of highly luminescent lanthanide coordination complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 2000, **196** (1): 165~195
- Yang Y T, Zhang S Y. Study of lanthanide complexes with salicylic acid by photoacoustic and fluorescence spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*, 2004, **60** (8~9): 2065~2069
- Janauer Ann, Starzak M E. Carrier-mediated transport in model membranes monitored by Eu (III) fluorescence. *Journal of Luminescence*, 2000, **91** (1~2): 13~18
- Sharma P K, Nass R, Schmidt H. Effect of solvent, host precursor, dopant concentration and crystallite size on the fluorescence properties of Eu_ III /doped yttria. *Optical Materials*, 1998, **10** (2): 161~169
- 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1996. 221~227
Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. *Method and Technique of Biochemical Experiment*. Beijing: Higher Education Press, 1996. 221~227

Use IgG-Eu-IDPA to Detect Antigen IOV by Time Resolved Fluoroimmunoassay*

LI Zhan-Dong¹⁾, LÜ Hui-Tian²⁾, YUE Jia-Chang¹⁾, FAN Chun-Hua³⁾, LI Wen⁴⁾, LUO Zhi-Yong^{1)**}

¹⁾*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;*

²⁾*Department of Biology, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037, China;*

³⁾*Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;*

⁴⁾*Technical Institute of Physics and Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)*

Abstract Lanthanide chelates have been successfully developed as fluorescence probes and widely used for highly sensitive time resolved fluoroimmunoassay. However, Lanthanide chelates are excited by UV-light which do a lot of damage to the biomolecules and cells. IgG-Eu-IDPA which can be excited by visible light (the maximum excite wavelength is 565nm) was compounded. The other spectra properties such as fluorescence lifetime, fluorescence intensity at different pH, fluorescence intensity in different concentration were measured. It was used as a fluorescence probe to detect antigen IOV with the self-built time resolved luminoscope. Its sensitivity is much higher than that of ordinary luminoscope. The results indicate that IgG-Eu-IDPA can be a new potential fluorescence probe for high sensitivity *in situ* and *in vivo* analysis.

Key words fluorescence spectrum, fluorescence probe, time resolved fluoroimmunoassay

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China and The National Natural Sciences Foundation of China (30100040).

**Corresponding author . Tel: 86-10-64888423, E-mail: pchh@sun5.ibp.ac.cn

Received: July 19, 2005 Accepted: September 7, 2005