

首先,胶束的加入使荧光产物的 λ_{ex} 和 λ_{em} 发生显著位移;其次,胶束的加入对荧光产物具有增敏作用;第三,就该体系而言,胶束在反应进行过程中加入的时间对增敏作用有很大影响.这是由于CTMAB对酶促生荧光反应具有催化作用,对生成 H_2O_2 的GOD催化氧化GS反应却有一定程度的抑制作用.如果在反应开始时即加入CTMAB,抑制作用较大,胶束对整个反应体系的增敏作用有所降低;反应进行一段后加入胶束,催化作用占据更大优势,使反应速率提高更多.第四,胶束的加入部分消除了反应中酶活性与荧光产物的pH不匹配,因而提高了分析灵敏度.

胶束增敏酶联免疫吸附法荧光测定人IgG及与均相法测定比较

李庆阁 赵一兵 许金钧 黄贤智 陈国珍

(厦门大学化学系,现代分析研究所,厦门,361005)

在荧光免疫分析中,胶束的加入常引起荧光强度增大、光谱位移、荧光寿命和荧光偏振的变化,利用这些变化可以改进自由抗原(Ag)和抗体(Ab)结合抗原的识别,提高分析灵敏度,扩大荧光免疫分析的范围.我们曾详细研究了环境介质对酶联免疫吸附测定(ELISA)荧光指示反应体系的影响,观察到长链烷烃季铵盐胶束对反应兼有催化和增敏作用.本文报导了将胶束增敏作用引入ELISA荧光测定体系,探求解决该体系酶促反应与荧光检测独立进行问题及提高灵敏度的途径,并与作者新近报导的一种均相荧光酶免疫分析法进行了比较.

1 人IgG与兔抗人IgG活性检验

向微孔条中分别加入80, 90, 100 μ l 包被液,依序再加入20, 10, 0 μ l 1.5 mg/ml 人IgG, 4 $^{\circ}$ C过夜包被完毕后,加150 μ l 封闭液封闭多余的结合位点,然后加入100 μ l 1:500 稀释的兔抗人IgG-HRP 偶联物,温育后,滴加显色剂,观察颜色变化.结果表明,颜色深度与IgG量成正比,证明Ag与Ab均有活性.

2 胶束增敏ELISA测定人IgG

向微孔条中分别加入100 μ l 经包被液稀释的兔抗人IgG, 4 $^{\circ}$ C过夜包被,加入100 μ l 不同浓度的人IgG (0, 15~105 μ g/ml) 温育,再加入兔抗人IgG-HRP 100 μ l (1:500 稀释) 温育,分别加入50 μ l 对羟基苯丙酸和 H_2O_2 溶液,5 min后移至1 cm 石英液池中,加入1.5 ml 稀释液,200 μ l 十六烷基三甲基溴化铵溶液和50 μ l NaOH 溶液,取 $\lambda_{em}=442.4$ nm,测 λ_{ex} 在200~380 nm之间的荧光激发强度.结果表明,在上述Ag浓度范围内,荧光强度与人IgG呈良好线性关系,胶束增敏测定比原法灵敏度提高3倍多.

3 均相测定人IgG

于小试管中,分别加入0, 5, 10, 15, 20, 25, 50 μ l 1.5 mg/ml 人IgG,加稀释液使最后体积达100 μ l,加入等体积的1:500 稀释的兔抗人IgG-HRT,温育,加入100 μ l 对羟基苯丙酸和 H_2O_2 溶液,于 $\lambda_{ex}=297.6$ nm, $\lambda_{em}=404.8$ nm处测定荧光强度

的 (F) -时间 (t) 曲线, 以斜率与浓度作图. 结果表明, 抗原浓度在 0.15~0.38 mg/ml 范围内呈线性.

4 胶束增敏 ELISA 与均相法比较

胶束的存在, 使荧光指示反应与检测可同时在抗原抗体反应的中性环境中进行, 部分克服了荧光 ELISA 固有的 pH 不匹配问题, 简化了操作步骤, 且由于胶束的增敏作用, 使测定灵敏度得以提高. 均相法测定时间短, 重现性好, 但由于免疫反应后引起酶活性抑制有限, 使得灵敏度较低, 且该法受抗原抗体结合比影响较大, 线性范围也较窄.

荧光光度法快速测定片剂中氨酰心安的含量

赵慧春 闫娜花

(北京师范大学化学系)

氨酰心安学名为 4-(2-羟基-3-(1-甲基乙基) 氨基) 丙氧基苯乙酰胺, 是一种新的 β -肾上腺素能受体阻滞剂, 具有良好的抗心律失常作用, 尤其对高血压合并冠心病具有显著疗效, 在临床上得到广泛的应用. 本实验利用氨酰心安的荧光性质, 建立了荧光法测定其含量的新方法. 本方法重现性好, 灵敏度高, 检出限 $0.0169 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 基体干扰小, 平均回收率为 99.9%. 用于测定片剂中氨酰心安的含量, 结果令人满意.

1 实验部分

1.1 仪器与主要试剂: 日立--850 型荧光分光光度计, 美国尼高力公司 170 SX 付里叶红外光谱仪.

氨酰心安标准溶液: 用少量甲醇溶解一定量的氨酰心安, 再用水配成 $2.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液.

1.2 实验方法: 在 10.0 ml 容量瓶中, 加入一定量的氨酰心安标准液和 pH 6.40 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲液, 用水定容, 在 $\lambda_{\text{ex}} 222.3$, $\lambda_{\text{em}} 297.4 \text{ nm}$ 等条件下, 以试剂为参比, 测其相对荧光强度 ΔF 值.

2 结果讨论

2.1 氨酰心安荧光谱扫描: 按实验方法配制溶液, 扫描得到氨酰心安的光谱图, 其激发峰两个, λ 分别为 222.3 nm, 272.5 nm, 荧光峰有两个, λ 分别为 297.4 nm, 595.0 nm, 选用 $\lambda_{\text{ex}} 222.3 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 297.4 \text{ nm}$ 进行测定.

2.2 酸度的影响: 酸度对氨酰心安的荧光强度值有较大影响, 实验中选用 pH 6.40 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲液.

2.3 小分子有机试剂的影响: 实验发现, CH_3OH 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 对其荧光强度均有增敏作用, 当其用量占总体积 1/5 时, 可使氨酰心安荧光强度值提高 12%.

2.4 金属离子的影响: 实验发现许多金属离子使其荧光强度值减小, 且峰位稍有蓝移, 可能是与氨酰心安形成了络合物, 以 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 为例, 用摩尔比法测其络合比为 1:1, 红外光谱法也证实了这一点.

2.5 工作曲线的绘制: 实验发现: 氨酰心安的浓度在 $0 \sim 3.00 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的范围内与 ΔF