

## [ 研究简报 ]

荧光各向异性法快速测定荧光标记物对蛋白质的标记比<sup>\*</sup>李东辉 叶 东 朱庆枝 方 莹<sup>†</sup> 许金钩(厦门大学化学系, 教育部生命过程与材料分析科学开放研究实验室; 厦门大学抗癌研究中心<sup>‡</sup>, 厦门, 361005)

关键词 荧光抗体技术, 荧光偏振, 荧光各向异性, 均相

分类号 O 657 32

免疫荧光技术是免疫学检测的重要手段之一, 该技术在病原微生物的早期诊断、自身免疫研究、抗原或抗体的免疫组化定位等方面都得到了广泛应用<sup>[1]</sup>. 荧光色素对抗体(或抗原)标记比的测定是免疫荧光技术的重要部分, 这是因为标记比合适与否直接关系到检测结果的优劣甚至成败. 标记比的传统检测方法包括荧光色素与荧光抗体(或抗原)的共价结合反应、透析、凝胶色谱分离等过程以及分光光度法测定荧光色素-抗体(或抗原)偶联物中色素与蛋白的含量<sup>[2]</sup>, 这一过程耗时且操作繁琐, 而且对那些与蛋白结合后吸收性质有较大改变的荧光色素不易得到准确的测定结果.

荧光偏振的原理和方法已广泛应用于大分子与小分子之间相互作用的研究<sup>[3]</sup>. 本文根据荧光偏振的原理, 以异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)和牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)组成研究体系, 建立了基于荧光各向异性测量的均相测定标记比的方法. 与传统方法相比, 本法具有简便、快速等特点.

## 1 实验部分

固定 FITC 浓度 ( $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L), 变化 BSA 的浓度 ( $5.0 \times 10^{-8}$  mol/L ~  $6 \times 10^{-6}$  mol/L), 按标准步骤<sup>[1]</sup>在 25℃和 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaH}_2\text{CO}_3$  (pH=9.0) 介质中进行 3 h 的标记反应. 反应结束后, 将反应液移入石英液池, 在带偏振器的荧光分光光度计 (Hitachi Model 650-10S) 上进行垂直方向和水平方向荧光强度的测量. 激发波长  $\lambda_{\text{ex}} = 490$  nm, 发射波长  $\lambda_{\text{em}} = 525$  nm; 激发与发射带通均为 5 nm. 根据公式

$$r = (I_{//} - G I_{\perp}) / (I_{//} + 2G I_{\perp})$$

计算出不同 BSA 浓度下 FITC 的各向异性值, 其中  $I_{//}$ 、 $I_{\perp}$  分别为激发偏振器与发射偏振器互相平行与互相垂直时的荧光强度,  $G$  为仪器校正因子. 作出荧光各向异性与 BSA 浓度的关系曲线. 以同样的步骤进行样品的测量及计算.

## 2 原 理

异硫氰酸荧光素以游离态 (F) 和结合态 (B) 存在, 故体系的荧光各向异性值为<sup>[3]</sup>:

$$r = f_{\text{F}} r_{\text{F}} + f_{\text{B}} r_{\text{B}} \quad (1)$$

式中,  $r_{\text{F}}$  为游离态荧光体的各向异性值,  $r_{\text{B}}$  为结合态存在下荧光体的各向异性值,  $f_{\text{F}}$  和  $f_{\text{B}}$  分别为游离态和结合态在荧光体总量中所占的分数. 重整式 (1) 可得式 (2):

$$f_{\text{B}} = (r - r_{\text{F}}) / (r_{\text{B}} - r_{\text{F}}) \quad (2)$$

收稿日期: 1998-07-18 联系人: 许金钩. 第一作者: 李东辉, 男, 31岁, 助理研究员, 博士研究生.

\* 国家自然科学基金 (批准号: 29775021) 资助课题.

©1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

在测得  $r_F$  和  $r_B$  后可得  $f_B$ , 从而可得结合态荧光体的分数及浓度, 进而得到标记比.

### 3 结果与讨论

3.1 荧光偏振曲线 图 1 为 FITC 的荧光各向异性随 BSA 浓度变化的关系曲线. 由图 1 可知, 当蛋白浓度达到一定程度后, FITC 的荧光各向异性不再发生变化, 出现一个平台. 表明溶液中的 FITC 已被蛋白完全结合, 此平台所对应的各向异性值即为  $r_B$ . 而  $r_F$  为没有蛋白存在的空白溶液的荧光各向异性值. 因此, 对一个原始 FITC 浓度已知的样品, 只要测出其各向异性值  $r$ , 即可通过公式求出标记比.

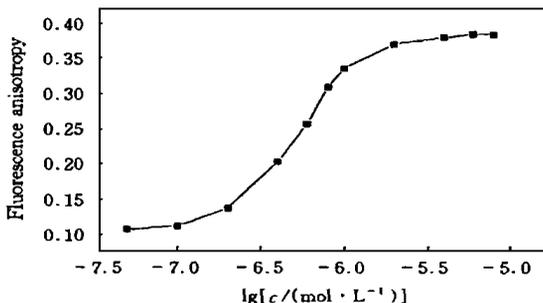


Fig. 1 The relationship between the fluorescence anisotropy of FITC and the concentration of BSA

3.2 样品测定结果 取 20 mg BSA 溶于 1 mL 水中, 加入 1/100(质量比)的 FITC, 于 25°C 按前述方法进行标记反应, 3 h 后停止反应. 以反应缓冲液逐级稀释直至溶液可在荧光分光光度计上进行荧光强度测量. 求出各向异性值及结合态 FITC 浓度, 计算标记比. 本法测得的标记比 1.22 与分光光度法测定的结果 1.36 相比, 符合得相当好.

本文以异硫氰酸荧光素 (FITC) 和牛血清白蛋白 (BSA) 组成研究体系, 根据荧光偏振原理建立了均相测定荧光色素对蛋白质的标记比的方法. 此法除具有简便快速的特点外, 并且由于可直接测定游离态 (或结合态) 荧光体的量, 使测定结果更为准确. 另外, 本法是从荧光偏振的基本原理出发而建立起来的, 因而具有通用性, 对于其它标记体系也是适用的.

### 参 考 文 献

- 1 WU Jian-Guo (武建国), FANG Yu (方宇), WANG Ai-Li (王艾丽) *et al.*. Immunological Assay for Clinical Practice (实用临床免疫学检验), Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press, 1989, 88.
- 2 Kawamura A. Jr. Fluorescent Antibody Techniques and Their Application, 2nd Ed., Tokyo: University of Tokyo Press, 1977, 55.
- 3 Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press, 1983, 145.

## A Rapid Method for the Determination of Molar Ratio of Fluorochrome to Protein Techniques by Fluorescence Anisotropy Detection

LIDong-Hui, YE Dong, ZHU Qing-Zhi, FANG Ying<sup>†</sup>, XU Jin-Gou<sup>\*</sup>  
(Department of Chemistry and the Key Laboratory of Analytical Science of MOE, Anticancer Research Center<sup>‡</sup>, Xiamen University, Xiamen, 361005)

**Abstract** The Determination of molar ratio of fluorochrome to protein is an important part in fluorescent antibody techniques. The conventional method is time consuming and with troublesome manipulations. A rapid homogeneous method based on the anisotropy change of