天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

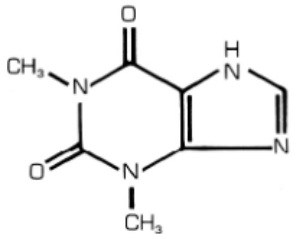
中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL:010-64010651
FAX:010-64060202
E-MAIL:techcomp@techcomp.cn

荧光偏振方法对茶碱进行免疫分析研究

荧光免疫方法可以用来检测茶碱，茶碱是一种用于心肌衰弱刺激的药物，可以起到扩张冠状动脉、松弛支气管平滑肌的作用。免疫方法，是基于在一种特异性的抗体上，受体部位标记和未标记的配体竞争性的键合反应。免疫荧光法首先将荧光物质标记在抗原（或抗体）上，通过免疫反应检测抗体（或抗原）。通过对标记物的一些物理性质的测量，我们可以构建一条以性质和未标记的配体浓度为函数的校正曲线。特异性抗原中抗体的选择性可以实现在相似的环境中对所感兴趣的配体（分析物）进行分析。

目前最流行的免疫技术是放射免疫检定法(ＲＩＡ),因为这种方法的灵敏度很高。但是ＲＩＡ也存在很多问题。比如要取得处理放射性物质及其废弃物的许可证是比较复杂的 ,而且这些试剂一般贮存期都比较短。所以需要发展其他的技术来代替 RIA。于是，一种快速发展，应用性广泛的名为荧光免疫分析（FIA）的技术产生了。这种技术所使用的标记物是小荧光分子，其产生的荧光强度与配体的浓度有关系，因此可以获得校正曲线。

本文中对茶碱在血清或者血浆中的浓度使用荧光偏振免疫方法来进行监控。茶碱的分子式见图 1. 荧光素标记的茶碱示踪物的荧光偏振度与药物的浓度成反比。所以从校正曲线上可以得到未知样品的药物水平。



天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.
中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL:010-64010651
FAX:010-64060202
E-MAIL:techcomp@techcomp.cn

图 1 茶碱的分子结构示意图

<前处理过程>

将溶有茶碱标样的 PH 7.2 缓冲溶液，茶碱荧光指示剂，抗血清混合在一起，培养 3 分钟。

<测试过程>

偏振荧光测量使用 HORIBA JOBIN YVON 的 FLUOROLOG 荧光光谱仪。光谱仪包括三个单光栅单色器，T 型结构，配置有自动偏振附件和两个 Hamamatsu R928P 光电倍增管检测器，光源是 450W 氙灯。

<结果和讨论>

图 2 显示了标记茶碱的抗体的激发发射光谱图。激发狭缝为 7.2nm，发射狭缝为 3.6nm。从图上可以看到最大激发波长为 485nm，最大发射波长为 513nm。

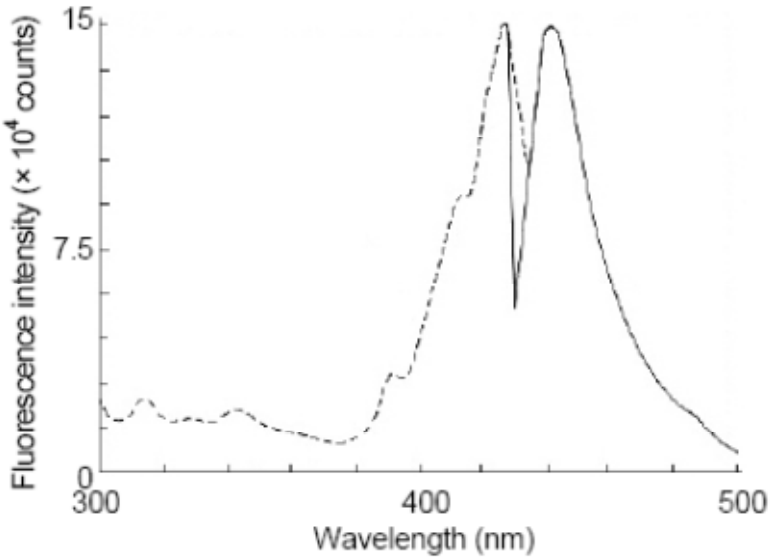


图 2 标记茶碱抗体的激发发射光谱图。虚线代表激发光谱，实线代表发射光谱。积分时间为 1s

天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.
中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL:010-64010651
FAX:010-64060202
E-MAIL:techcomp@techcomp.cn

标记的药物当没有和抗体键合的时候是没有荧光偏振特性的。如图 3 中虚线所示。但是在键合作用发生之后，可以测到大约 0.27 的偏振度，如图 3 中实线显示。这说明复合和没有复合的茶碱通过荧光偏振方法就能区分出来，而不需要进行化学分离的过程。

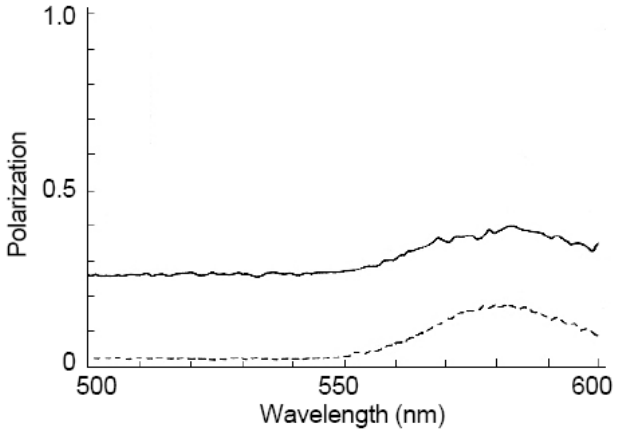


图3　标记茶碱的荧光偏振光谱。实线：抗体存在，虚线：没有抗体。

为了得到校正曲线，我们配制了6组浓度的溶液((0, 2.5, 5, 10, 20, and 40 μg/mL 茶碱缓冲溶液)，设置激发和发射波长在最大值的地方，积分时间为5秒。每个浓度的溶液测试11次取平均值。测量得到的校正曲线见图4

天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.
中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL:010-64010651
FAX:010-64060202
E-MAIL:techcomp@techcomp.cn

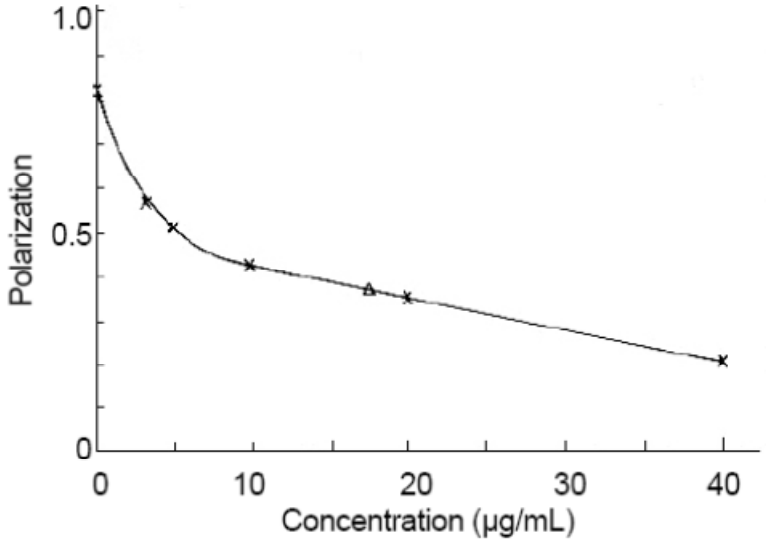


图4. 茶碱浓度对应偏振度的校正曲线。标准溶液的浓度分别为0, 2.5, 5, 10, 20, and 40 μg/mL。图中的三角形表示测量未知样品中茶碱的浓度。

得到校正曲线以后，接下来我们要测试一种包含了11种不同药物的样品。这11种成分如下：

庆大霉素 5μg/mL

茶碱17.8μg/mL

妥布霉素6.5μg/mL

奎尼丁2.6μg/mL

苯妥英12μg/mL

地高辛2.2ng/mL

水杨酸盐220μg/mL

对乙酰氨基酚217μg/mL

锂元素1.2 meq/L

甲氯芬那酸6μg/mL

苯巴比妥51.4μg/mL

天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL:010-64010651
FAX:010-64060202
E-MAIL:techcomp@techcomp.cn

三次重复测试样品得到的平均偏振度为0.122 ± 0.002，从之前的校正曲线中可以得到相对应的茶碱浓度为18.0 ± 0.3 μg/mL。这与样品中茶碱的浓度是相符合的。

在一般的荧光实验中，庆大霉素、奎尼丁、水杨酸盐和对乙酰氨基酚都会对实验产生干扰。而在本次实验中，由于抗体对特定的药物具有选择特异性，与偏振荧光测试方法相结合，就可以消除来自其他荧光发光基团以及未发生结合的标记物的干扰。

这个例子说明荧光免疫分析方法像发射免疫分析方法一样，对于生物试剂具有特异性和灵敏性。此外，荧光免疫分析方法的优点还在于不需要进行分离的过程就可以直接进行测量。