

基于高灵敏探针海萤荧光素类似物的 化学发光法检测尿微量白蛋白

徐未 魏言春 邢达* 陈群

(华南师范大学激光生命科学研究所暨激光生命科学教育部重点实验室, 广州 510631)

摘要 海萤荧光素类似物 FCLA 能检测¹O₂并产生 532 nm 的化学发光, 白蛋白(HSA)能强烈增强 FCLA-¹O₂化学发光。基于此, 建立了一种有效、高灵敏的检测 HSA 的化学发光(CL)检测技术。在选定的最佳实验条件下, HSA 浓度与增强化学发光信号在 0.34 ~ 5.5 mg/L 之间呈良好的线性关系; 检出限为 0.017 mg/L (3σ)。对比荧光光谱分析法、同步荧光扫描法及瑞利光散射法等传统方法, 本方法成本低廉、灵敏度高。实际尿样检测与临床检测结果一致, 同时还初步探讨了 HSA 增敏 CL 的机制。

关键词 化学发光, 白蛋白, 海萤荧光素类似物, 单态氧

1 引言

白蛋白(HSA)广泛存在于人血浆和尿液中。它在尿液中的含量能够预示某些疾病比如心血管疾病、高血压、肾病血管损伤等等。因此, 量化尿液中白蛋白的浓度在临床上非常重要。

目前, 常使用的测量白蛋白的方法有 Lowry 法^[1]、电化学发光法^[2]、分光光度法和荧光分光光度法^[3,4]以及利用瑞利光散射共振法^[5,6]等。这些方法存在或操作复杂或所需仪器昂贵等缺点。化学发光方法^[7,8]因其高灵敏度、操作简单等优点在分析检测中得到广泛应用。化学发光中发光试剂多用发光氨(Luminol)、光泽精, 但尚未见用化学发光探针海萤荧光素类似物 FCLA 检测蛋白质的报道。FCLA 能探测单态氧并发出 532 nm 的化学发光^[9,10]。

本研究自行设计一套化学发光装置。该装置成本低, 能高灵敏检测白蛋白。由此建立了一种简单、有效、高灵敏检测 HSA 的化学发光方法。对比荧光光谱分析法、同步荧光扫描法和瑞利光散射法等, 本方法有高的灵敏度, 并初步分析了 HSA 增敏 CL 的机制。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

白蛋白 HSA 购于 Sigma 公司, 用二次蒸馏水配制成 1×10^{-5} mol/L 母液, 置于 0 ~ 4 °C 冰箱中保存。FCLA 粉末购于日本 Tokyo Kasei Kogyo Co 公司, 在充氮气除氧灭菌的情况下配制成 1×10^{-4} mol/L 标准液, 密封储存在 -20 °C 的冰箱中; H₂O₂、NaClO₃ 购于广州化学试剂厂, 为分析纯试剂; 磷酸缓冲液(PBS): 准确称取 8.5 g NaCl、2.2 g Na₂HPO₄、0.2 g NaH₂PO₄ 溶于 1 L 二次蒸馏水中, HCl 调 pH 至 7.4。尿液由自愿者提供, 收集 24 h 尿液由广州南方医院检测出临床结果; 化学发光法测量时按比例稀释到测量范围内检测。化学试剂为分析纯; 所有实验用水为二次蒸馏水。

自制快速喷射针管; 反应池为 70 mm × 7 mm (内径) 薄玻璃管; 积分球(上海亿奥信息光学科技有限公司); MP-952 光电倍增管(Perkin Elmer, USA); pH 酸度计(Sartorius 公司); 微量振荡器(IKA 公司); LS-55 荧光光谱仪(美国 Perkin Elmer 公司)。应用 $r = (I_{VV} - G \cdot I_{VH}) / (I_{VV} + 2G \cdot I_{VH})$, I_{VV} , I_{VH} 分别为激发偏振器垂直方向时, 发射偏振器在垂直方向和水平方向的荧光强度。G 为仪器校正因子。

2.3 实验方法

如图 1, 将 60 μL 10 mmol/L NaClO₃、6 μL 0.1 mmol/L FCLA、一定标准浓度的 HSA 或者样品溶液

2007-06-04 收稿; 2007-08-27 接受

本文系国家自然科学基金(No. 30470494, 30627003, 60678050)、广东省自然科学基金(No. 015012)资助项目

* E-mail: xingda@snu.edu.cn

或者无 HSA 空白溶液,用 PBS pH 7.4 做溶剂定容至 480 μL ,然后在微量振荡器上混合均匀后注入反应池中,打开光电倍增管 PMT,计算机上 Labview 软件开始记录数字信号。在微量注射器注射端连接一段直径为 7 mm 的胶管于暗箱外,吸取 120 μL 20 mmol/L H_2O_2 ,胶管另一端接入反应池与反应池口紧密契合,吸取的 H_2O_2 喷入反应池中混合,产生化学发光;积分球收集的光子进入光电倍增管 PMT。信号经前置放大器和计数卡被还原成模拟数字信号,计算机上 Labview 程序记录这些信号。以加入 HSA 的 CL 为 I ,没有加入 HSA 的 CL 记为 I_0 ,每个实验重复多次,整个过程都在暗室中完成。以化学发光 5 s 内的积累量作为量化标准。运用公式: $\Delta I = I - I_0$,增强的化学发光 ΔI 与 HSA 浓度呈线性关系。

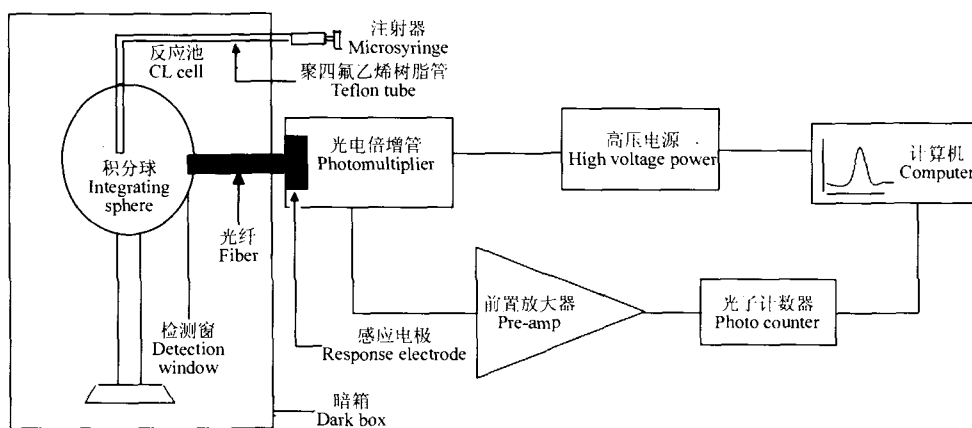


图 1 化学发光检测装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of chemiluminescence detection

3 结果与讨论

3.1 pH 的影响

pH 变化范围 5.28 ~ 9.10。当 pH = 7.4 时相对化学发光强度最大(见图 2)。文献 [11] 报道和 FCLA 检测单态氧并产生化学发光的机制中 FCLA、FCLA 的共轭碱起重要作用。pH < 7, FCLA 溶解度低,共轭碱浓度也小,反应二级常数低,发光效率低; pH > 7 时, FCLA 和 FCLA 共轭碱在水中溶解度增大,与单态氧反应增大。但 FCLA 检测单态氧并产生化学发光是个链式反应。FCLA 或者 FCLA 共轭碱与单态氧的起始反应并不是唯一的限速反应,中间反应也是限速反应。在碱性条件下,中间产物二级衰减速率增快,导致整个反应链化学发光效率低^[9]。而在中性接近生理 pH 值(7.4)状态下,综合增大起始反应速率和减少中间产物衰减, FCLA 检测单态氧并产生化学发光效率最高。这点在文献 [12] 中得到证明。故在后续实验中选择 pH 7.4。

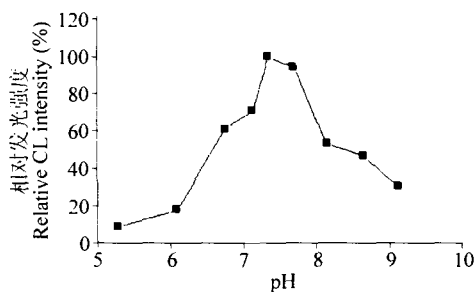


图 2 pH 值对化学发光体系的影响

Fig. 2 Effect of pH on CL system

条件(conditions): 海萤荧光素类似物 (fluoresceinyl cypridina luciferin analog, FCLA) 1×10^{-6} mol/L; H_2O_2 : 4×10^{-3} mol/L; NaClO_3 : 1×10^{-2} mol/L; 人血清白蛋白 (human serum albumin) 8×10^{-8} mol/L; 温度 (temperature): 25 $^\circ\text{C}$; $n = 5$ 。

3.2 反应体系浓度的确定

对 H_2O_2 、 NaClO_3 和海萤荧光素类似物分别在 $5 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-2}$ mol/L、 $1 \times 10^{-3} \sim 3 \times 10^{-2}$ mol/L、 $5 \times 10^{-7} \sim 8 \times 10^{-6}$ mol/L 和温度在 15 $^\circ\text{C}$ ~ 45 $^\circ\text{C}$ 范围内进行了考察。选择 25 $^\circ\text{C}$ 条件下, 3 种反应物最适浓度分别为 4×10^{-3} mol/L、 1×10^{-2} mol/L 和 1×10^{-6} mol/L。

3.3 共存物的影响

在最佳反应条件下,考察尿样中存在的离子和氨基酸对 CL 强度的影响,认定 CL 变化在小于 8% 时影响不显著(如表 1)。实验结果显示共存物对 CL 体系基本没有影响或者影响很小。

表 1 共存物对化学发光体系的影响

Table 1 Effect of coexisting substances on CL system

共存物 Substance	浓度 Concentration (10^{-6} mol/L)	临床范围 Clinical rang (10^{-6} mol/L)	化学发光改变率 Change of Δ CL (%)	共存物 Substance	浓度 Concentration (10^{-6} mol/L)	临床范围 Clinical rang (10^{-6} mol/L)	化学发光改变率 Change of Δ CL (%)
$k^+ NO_3^-$	35	0.65 ~ 1.31	-6.2	$Mg^{2+} SO_4^{2-}$	9	0.08 ~ 0.34	-3.8
$Na^+ Cl^-$	100	2.24 ~ 4.5	6.6	$NH_4^+ SO_4^{2-}$	10	1.11 ~ 3.89	4.8
$Zn^{2+} SO_4^{2-}$	10	0.04 ~ 0.28	-7.7	$Pb^{2+} CH_3COO^-$	20	-	-9.8
葡萄糖 Glucose	20	0.28 ~ 1.5	2.5	黄嘌呤 Xanthine	83	-	4.5
山梨醇 D-Sorbitol	12	-	5.9	L-羟脯氨酸 Hydroxyproline*	30	0.18 ~ 1.8	-8.5
L-酪氨酸 L-Tyr*	30	-	1.2	L-色氨酸 L-Trp*	10	-	11.8

反应条件见图 2 (condition of chemiluminescence reaction was shown in Fig 2)。*: mg/L。

3.4 标准曲线

在最佳反应条件下, HSA 在 $5 \times 10^{-9} \sim 8 \times 10^{-8}$ mol/L (0.34 ~ 5.5 mg/L) 范围内与 ΔI 呈线性关系, 线性方程为 $\Delta I_{CL} = (0.0502 \pm 0.0265) + (0.0193 \pm 0.0013) C_{HSA}$ (C : 10^{-9} mol/L, $r = 0.99289$, $n = 5$)。由公式 $LOD = kS_0/S$, 得出检出限 0.017 mg/L (3σ)。对 5.5 mg/L 平行 11 次测量的 RSD 为 5.8%。

3.5 实际样品检测

采用单一样本 t 检验统计结果, $t < t_{0.95,4}$ 意味着 95% 的置信度内样品均值和预定值没有显著差异。实验结果与临床结果吻合, 能够准确用于实际尿样中微量白蛋白的检测。

表 2 实际尿样品检测

Table 2 Determination results of HSA in urine

样品 Samples	化学发光法检测结果 This method found ($n = 5$, mg/L)	临床结果 Clinical data ^a (mg/L)	t 检验 t -test ^b	样品 Samples	化学发光法检测结果 This method found ($n = 5$, mg/L)	临床结果 Clinical data ^a (mg/L)	t 检验 t -test ^b
1	3.87 ± 0.32	3.73	0.94	3	5.48 ± 0.58	5.34	0.54
2	10.97 ± 1.05	9.17	2.07	4	8.08 ± 0.65	7.07	2.17

a. 24 h 尿样临床检测结果由广州南方医院提供 (the data provided by Nanfang hospital which detected 24 h microalbumin in urine);
b. 单一样品 T 检验 (one-sample t -test): $t_{0.95,4} = 2.776$ 。

3.6 HSA 增敏化学发光机理的探讨

HSA 淬灭 FCLA 的荧光谱说明 HSA 和 FCLA 之间有分子间缔合 (见图 3)。

荧光各向异性反映溶液环境对荧光分子移动抑制的程度, 图 4 是 FCLA 分子在 HSA 溶液中的偏振度的变化图。从图 4 可见, 随着环境中 HSA 浓度不断增大, FCLA 荧光各向异性值出现先迅速增大, 后逐渐趋于恒定。这显示刚开始 HSA 与 FCLA 缔合的速度快, 接着缔合速度逐渐减慢。当 HSA 达到

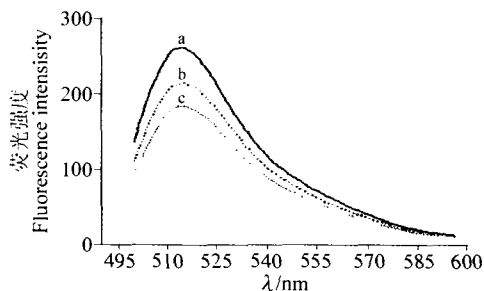


图 3 不同人血清白蛋白浓度缔合 FCLA 荧光光谱图

Fig. 3 Fluorescence emission spectra of FCLA induced by various concentration of human serum albumin

海萤荧光素类似物 (FCLA) 2.5×10^{-6} mol/L; 人血清白蛋白与海萤荧光素类似物浓度比 (C_{HSA}/C_{FCLA}) = 0 (a), 1 (b), 2 (c); λ_{ex} : 488 nm; λ_{em} : 515 nm。

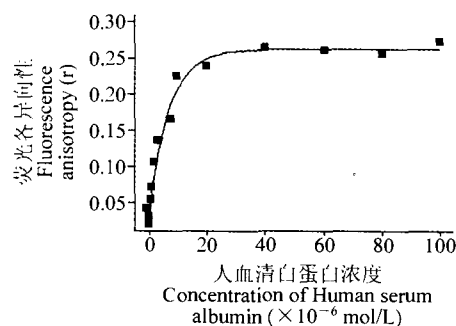


图 4 增加人血清白蛋白浓度条件下海萤荧光素类似物 (FCLA) 荧光各向异性的变化

Fig. 4 Variation of fluorescence anisotropy (r) of FCLA (1×10^{-6} mol/L) with increasing concentration of HSA

2×10^{-5} mol/L 时, FCLA 与 HSA 几乎完全缔合。依据能量转移 Förster 理论, Zhou 等^[13] 已验证并且计算出 FCLA 与 HSA 分子间距离为 $1.39 \text{ nm} < 5 \text{ nm}$, 符合发生有效能量转移的分子间距离范围。

在本实验化学反应体系中, HSA 增敏 CL 的机制可能是: 化学反应 H_2O_2 和 NaClO_3 产生单态氧, 产率几乎为 100%。单态氧被 HSA、FCLA 的缔合物捕获。缔合物中外围的 HSA 与单态氧反应生成激发态高能级的蛋白羰基, 激发态的蛋白羰基将能量转移给附近的 FCLA 分子, FCLA 获得能量成激发态后迅速发光。这是增强化学发光中主要反应。另一个过程: 游离态 FCLA 直接捕获¹ O_2 经脱羧、质子化后退激发产生化学发光。两个过程的协同作用共同提高了 CL 强度。

References

- Lowry O H, Rosebrough N J, Lewis F, Randall R J. *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193: 265 ~ 275
- Wang Xue-Liang(王学亮), Sun Wei(孙伟), Jiao Kui(焦奎). *Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报)*, **2005**, 24(6): 106 ~ 109
- Chun Q, Li K A, Tong S Y. *Anal. Lett.*, **1998**, 31(6): 1021 ~ 1036
- Li N, Li K A, Tong S Y. *Anal. Lett.*, **1995**, 28(10): 1763 ~ 1774
- Li Y, Dong L J, Wang W P, Hu Z D, Chen X G. *Analytical Biochemistry*, **2006**, 354(1): 64 ~ 69
- Feng P, Huang C Z, Li Y F. *Analytical Biochemistry*, **2002**, 308(1): 83 ~ 89
- Fan Ai-Ping(樊爱萍), Liu Cai-Yun(刘彩云), Liao Zhi-Xin(廖志新), Liang Jian-Ying(梁建英), Lu Jian-Zhong(卢建忠). *Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)*, **2006**, 34(1): 35 ~ 37
- Luo Li-Rong(罗丽荣), Ma Li-Feng(马利锋), Zhang Zhu-Jun(章竹君). *Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)*, **2005**, 33(9): 1257 ~ 1260
- Akutsu K, Nakajima H, Fujimori K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1995**, 2: 1699 ~ 1706
- Mashiko S, Suzuki N, Koga S, Nakano M, Ashino T, Mizumoto I, Inaba H. *J. Biolumin Chemilumin*, **1991**, 6(2): 69 ~ 72
- Fujimori K, Nakajima H, Akutsu K, Mitani M, Nakayama M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1993**: 2405 ~ 2409
- Mathys M, Oosthuizen J, Englbrecht M E, Lambrechts H, Greyling D, Levy R D. *J. Biolumin Chemilumin*, **1997**, 12(6): 277 ~ 284
- Zhou J, Xing D, Chen Q. *Photochemistry and Photobiology*, **2006**, 82(4): 1058 ~ 1064

Chemiluminescence Method for the Determination of Human Serum Albumin by Highly Sensitive Chemiluminescence Probe-Fluoresceinyl Cypridina Luciferin Analog

Xu Wei, Wei Yan-Chun, Xing Da*, Chen Qun

(Ministry of Education of Key Laboratory of Laser Life Science, Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract Highly sensitive chemiluminescence (CL) enhancing method was developed to detect human serum albumin (HSA) based on the reaction of fluoresceinyl cypridina luciferin analog (FCLA)-¹ O_2 . Experiments revealed that chemiluminescence could be greatly enhanced by the addition of HSA. Owing to the enhancing effect of HSA, under the optimal conditions, the enhanced CL intensity was linear for a HSA concentration of $5 \times 10^{-9} - 8 \times 10^{-8}$ mol/L, with a detection limit of 0.017 mg/L. The method has a low cost and a higher sensitivity than those of fluorescence spectra analysis, synchrony fluorescence scanning technique, rayleigh light scattering technique. Determination results for HSA in urine were consistent with clinical ones. Additionally, the mechanism of enhanced CL by HSA was discussed.

Keywords Chemiluminescence, human serum albumin, fluoresceinyl cypridina luciferin analog, singlet oxygen

(Received 4 June 2007; accepted 27 August 2007)