

吡啶酯 DMAE·NHS 发光性能的研究

尹东光等

1. 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

Wallac Victor 1420 Multilabel Counter, 芬兰 Wallac 公司; DMAE·NHS, 本实验室合成; 二甲基甲酰胺(DMF), >99%, ACROS 公司; H_2O_2 、 HNO_3 、NaOH, 均为分析纯, 北京化学试剂公司; 十六烷基三甲基氯化铵(CTAC), ACROS 公司; Tween-20, TritonX-100, 华美生物医学工程公司; 96 微孔板, 丹麦 NuNc 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DMAE·NHS 的发光动力学

取一定量的 DMAE·NHS 水溶液于微孔板中, 加入发光启动试剂, 在发光仪上测量 DMAE·NHS 的发光计数随时间的变化。

1.2.2 DMAE·NHS 的发光强度

取 $100\mu\text{l}$ $2.5\times 10^{-4}\text{mol/L}$ DMAE·NHS 的 DMF 浓溶液用蒸馏水稀释成浓度为 $2.5\times 10^{-7}\text{mol/L}\sim 2.5\times 10^{-13}\text{mol/L}$ 的稀溶液, 各浓度点分别取 $50\mu\text{l}$ 于微孔板中, 加入发光启动试剂, 在发光仪上测量每秒钟 DMAE·NHS 的发光计数(CPS)。

1.2.3 发光启动试剂及表面活性剂对 DMAE·NHS 的发光强度的影响

改变发光启动试剂中各成份(H_2O_2 、 HNO_3 、NaOH)的浓度和体积, 分别测量 H_2O_2 、 HNO_3 和 NaOH 不同浓度和体积时 DMAE·NHS 的发光强度。在发光启动试剂中分别加入表面活性剂 CTAC、Triton X-100 和 Tween-20, 测量 DMAE·NHS 的发光强度。

1.2.4 DMAE·NHS 的热稳定性

将 DMAE·NHS 用 0.1mol/L PB 配成 pH 分别为 5.8, 7.0, 8.0 的三种不同酸度的水溶液, 分别间隔一定时间后取样置于室温和 37°C 保存, 至 16 天分别取样测量 DMAE·NHS 的发光强度, 与 4°C 对比, 观察测得的 CPS 随时间的变化。

由此考查 DMAE·NHS 的发光活性在不同酸度和不同温度下随时间变化的情况。

2. 结果及讨论

2.1. DMAE·NHS 的发光动力学

实验测得 DMAE·NHS 的发光动力学曲线如图 3.1 所示，从 DMAE·NHS 的发光动力学曲线可以看出，DMAE·NHS 的发光为闪光，0.4s 时发光强度达到最大，前 2s 钟内发光强度下降很快，此后下降比较慢，发光半衰期约为 0.9s。图 3.2 为 DMAE·NHS 与 TSH 抗体的偶联物 DMAE·NHS-Ab 的发光动力学曲线，DMAE·NHS-Ab 的发光动力学性质与 DMAE·NHS 相似。表 3.1 为测得不同时间内的 DMAE·NHS 发光的平均 CPS 值，由表 3.1 可知 DMAE·NHS 在 0.4s 内发光的平均 CPS 值最大。实验中还发现，DMAE·NHS 与 DMAE·NHS-Ab 的发光动力学性质不受 DMAE·NHS 或 DMAE·NHS-Ab 浓度的影响，改变 DMAE·NHS 或 DMAE·NHS-Ab 浓度只影响发光强度的大小，但不影响其达到最大发光强度的时间和半衰期。上述结果与文献^[56,87,88]报导一致。

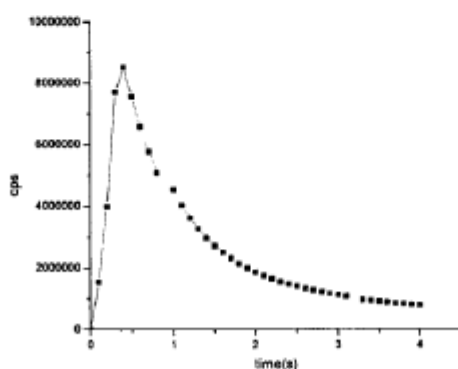


图 3.1. DMAE·NHS 的发光动力学曲线

[DMAE·NHS] = 2.5×10^{-8} mol/L, V = 50 μ l, t = 20°C

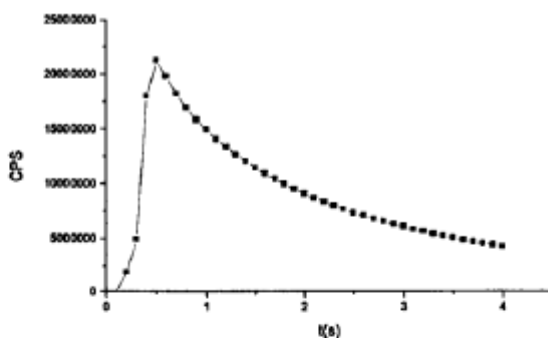


图 3.2. DMAE-NHS 与 TSH 抗体联结物的发光动力学曲线

[DMAE-NHS-Ab]= 2.1×10^{-4} mol/L, V=10 μ l, t=20 $^{\circ}$ C

表 3.1. DMAE-NHS 不同时间内发光的平均 CPS 值

t(s)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1	2	5	10	20
CPS $\times 10^7$	1.82	1.80	1.80	1.91	1.86	1.60	1.19	0.57	0.39	0.20

注: [DMAE-NHS]= 2.5×10^{-4} mol/L, V=50 μ l, t=20 $^{\circ}$ C

2.2. DMAE-NHS 的发光强度

如图 3.3 所示, 在实验所用仪器的域值范围内, DMAE-NHS 的动力学检测范围为 $1.25 \times 10^{-11} \sim 1.25 \times 10^{-17}$ mol, 实验测得 DMAE-NHS 的发光强度为 6.11×10^{18} cps/mol 或 1.03×10^7 cps/ng。用 DMAE-NHS 标记 TSH 单克隆抗体, DMAE-NHS 与 Ab 的分子比为 2.4 的情况下, 实验测得 DMAE-NHS-Ab 的发光强度为 1.8×10^{19} cps/molAb 或 1.125×10^5 cps/ngAb。DMAE-NHS-Ab 的动力学检测范围为 $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-18}$ mol。

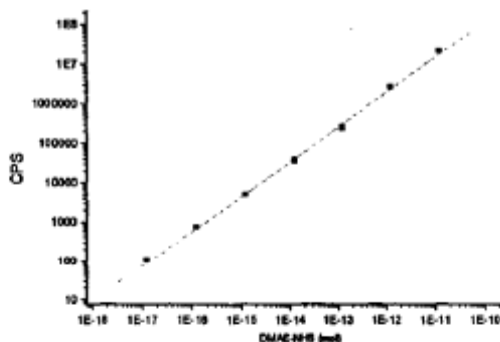


图 3.3. DMAE·NHS 的物质的量与其发光强度关系曲线

2.3. 发光启动试剂对 DMAE·NHS 发光强度的影响

根据文献报导^[42-63], 吡啶酯发光通常采用的发光启动试剂有三种配方, 分别包含二种、三种或四种物质, 二种物质的配方是 H_2O_2 和 $NaOH$, 三种物质的配方是 HNO_3 (有些用 HCl 代替)、 H_2O_2 和 $NaOH$, 四种物质的配方为除上述三种物质外还加入一种表面活性剂如 CTAC、Triton X-100、Tween-20 等以增强发光。发光启动试剂的加入方式有两种, 一种是一次性加入发光启动试剂; 一种是分两次加入两种试剂: 首先加入 HNO_3 和 H_2O_2 溶液, 然后加入 $NaOH$ 溶液, 如果加入表面活性剂, 则表面活性剂可与 HNO_3 一起加入也可与 $NaOH$ 一起加入。早期文献报导多采用一次性加入发光启动试剂(H_2O_2+NaOH), 但我们在实验中发现, 采用一次性加入发光启动试剂的方法不妥, 一是相对第二种方式发光强度小, 二是 H_2O_2 在 $NaOH$ 溶液中不稳定, 容易分解($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \uparrow$)。

不同文献报导中, 发光启动试剂使用的 HNO_3 , H_2O_2 和 $NaOH$ 的浓度和体积不同, 实验发现, HNO_3 , H_2O_2 和 $NaOH$ 的浓度和体积不同, DMAE·NHS 发光强度不同, 参考文献方法, 试验了十多种不同 HNO_3 , H_2O_2 和 $NaOH$ 的浓度和体积的情况, 图 3.4 列出其中四种情况, 最后发现发光启动试剂采用如下组成时发光强度最大, 即(1)100 μ l 0.1mol/L HNO_3 +0.1% H_2O_2 (2) 100 μ l 0.25mol/L $NaOH$ 。

加入表面活性剂能增大 DMAE·NHS 的发光强度, 参照有关文献^[89], 试验了三种表面活性剂: CTAC, Triton X-100, Tween-20 对 DMAE·NHS 的发光强度的影响,

如图 3.5 所示，2%Triton X-100 的增强效果最好，能使 DMAE·NHS 的发光强度增大 4.5 倍，2% Tween-20 和 0.2%CTAC 使 DMAE·NHS 的发光强度分别增大 3.5 和 2.8 倍。加入 Triton X-100 或 Tween-20 能增加 DMAE·NHS 的发光强度而不引起本底增加，但加入 CTAC 时引起本底增加很多，故不宜使用 CTAC 做增强剂。

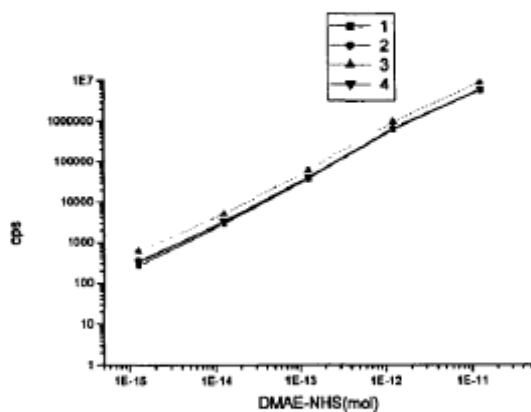


图 3.4. 发光启动试剂对 DMAE·NHS 发光强度的影响

- 1:(1)50 μ l0.4mol/LHNO₃+1.2%H₂O₂, (2)150 μ l0.25mol/LNaOH
 2:(1)100 μ l0.1mol/LHNO₃+0.5%H₂O₂, (2)100 μ l0.25mol/LNaOH
 3:(1)100 μ l0.1mol/LHNO₃+0.1%H₂O₂, (2)100 μ l0.25mol/LNaOH
 4:(1)40 μ l0.4mol/LHNO₃+1.2%H₂O₂, (2)150 μ l0.25mol/LNaOH

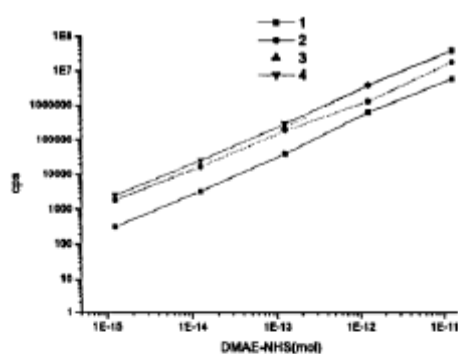


图 3.5. 表面活性剂对 DMAE-NHS 发光强度的影响

- 1: (1)100 μ l0.1mol/LHNO₃+0.1%H₂O₂, (2)100 μ l0.25mol/L NaOH
 2: (1)100 μ l0.1mol/LHNO₃+0.1%H₂O₂, (2)100 μ l0.25mol/LNaOH+0.2%CTAC
 3: (1)100 μ l0.1mol/LHNO₃+0.1%H₂O₂, (2)100 μ l0.25 mol/LNaOHNaOH+2%Tween-20
 4: (1)100 μ l0.1mol/LHNO₃+0.1%H₂O₂, (2)100 μ l0.25 mol/LNaOH+2%Triton X-100

2.4. DMAE-NHS 的热稳定性

如图 3.6、3.7 所示，DMAE-NHS 的热稳定性随 pH 值增大和温度升高而降低，室温(20℃)下，DMAE-NHS 在 pH 为 5.8, 7.0, 8.0 的 PB 缓冲液中均较稳定，16 天后发光活性分别降低 1.6%、3.6%和 8.3%。37℃下，DMAE-NHS 在 pH 为 5.8, 7.0, 8.0 的水溶液中，经过 16 天后的发光活性分别降低 8.9%、22%和 42%。DMAE-NHS 在水溶液中的发光活性随时间而降低的原因是因为发生水解，在碱性环境中有利于水解，升高温度也有利于水解，即 DMAE-NHS 的水解速度随溶液 pH 值增大和温度升高而加快。实验还发现在 4℃或冰冻条件下，DMAE-NHS 在 pH 为 7.0 的 0.1mol/L PB 缓冲液中稳定，保存半年后，其发光活性没有下降。

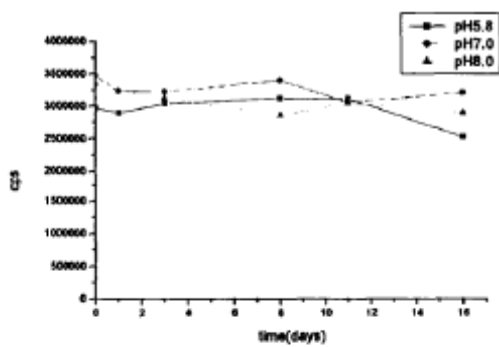


图 3.6. 室温下 DMAE-NHS 的发光活性随时间的变化

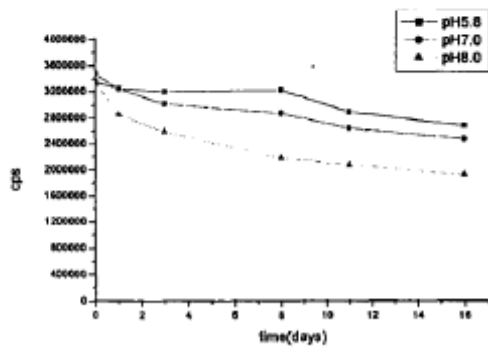


图 3.7. 37°C下 DMAE-NHS 的发光活性随时间的变化