

技术与方法

铽离子 (Ⅲ) 和 5-FSAP 在 TrF 中
增强效应研究*

陈泮藻 李振甲

(解放军总医院基础医学研究所, 北京 100853)

金林培 郭建权

(北京师范大学化学系, 北京 100875)

摘要 为利用灵敏的酶增强时间分辨荧光免疫分析 (EATrFIA) 测定生物活性物质, 对三价铽离子 [Tb (Ⅲ)], 5-氟水杨酸磷酸盐 (5-FSAP) 和碱性磷酸酶 (AP) 的实验条件进行了探讨, 并发现它们之间有着一些定量的关系. 这些研究结果为时间分辨荧光分析 (TrF) 的发展积累了有益的资料.

关键词 铽/镧螯合物, 碱性磷酸酶, 5-氟水杨酸磷酸酯, 时间分辨荧光分析

时间分辨荧光分析 (TrF) 的建立对临床生化、免疫分析和分子生物学核酸探针分析将产生一次飞跃. 国外已有较深入的研究^[1,2]; 国内虽刚起步, 但在双功能螯合剂合成、稀土离子标记品制备、实验方法学研究和初步应用等方面都取得了进展. 利用双功能螯合剂, 将三价铈离子 [Eu (Ⅲ)] 与抗原 (或抗体) 偶联, 或者与链亲合素 (SA) 偶联, 建立了多种免疫分析方法^[3~7], 已形成为部分代替 RIA 的发展趋势. 但利用 Eu (Ⅲ) 建立的分析方法, 不仅要制备 Eu (Ⅲ) 标记品, 而且后者参与检测过程, 故增加污染因素, 使结果带来误差. 为克服这一弱点, 利用 Tb (Ⅲ) 和 5-氟水杨酸磷酸盐 (5-FSAP), 建立新型酶增强时间分辨荧光免疫分析 (EATrFIA)^[8]. 基本原理: 固相抗体与抗原产生免疫夹心反应, 再与 SA 产生亲合反应. 利用 SA 偶联的碱性磷酸酶 (AP) 水解 5-FSAP, 生成 5-氟水杨酸 (5-FSA), 后者能与 Tb (Ⅲ)、EDTA 形成 5-FSA-Tb (Ⅲ)-EDTA 三元复合物, 经紫外光激发, Tb (Ⅲ) 特征荧光信号得以增强, 此信号可用 Arcus 1230 型时间分辨荧光仪 (TrF

仪) 直接进行液相测量, 并记录结果. 这种方法具有较高的灵敏度和准确性, 是一种新的高效、快速荧光分析技术. 本文就实验条件进行探讨.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 专用聚苯乙烯微量滴定条: 为 Helsinki Finland 产品.

1.1.2 试剂: 5-FSA 和 AP 为 Sigma 产品. 5-FSAP 由北京师范大学化学系合成. 七氧化二铽 (Tb_2O_7) 为 Aldrich 产品. Tris、EDTA、HCl 和 H_3PO_4 等试剂为北京化工厂产品, 分析纯.

1.1.3 仪器: Arcus 1230 型 TrF 仪, 分析振荡器和自动加样器为 Wallac-Pharmacia 公司产品. SP 1800 紫外分光光度计为日本日立公司产品. 气相色谱仪为日本产品.

1.2 测定方法

1.2.1 聚苯乙烯微滴定条处理: 滴定条常规

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1995-06-12, 修回日期: 1995-09-27

清洗外, 再经 1% EDTA·Na₂ 浸泡 12 h, 重蒸馏水洗 3~5 次, 45℃ 干燥, 密封于塑料袋内保存备用。

1.2.2 5-氟水杨酸磷酸酯合成: 由 5-FSA 经化学方法合成 5-FSAP。

1.2.3 三氯化铽合成: 称取一定量 Tb₂O₃ 用 1 mol/L HCl 搅拌至溶, 用 1 mol/L NaOH 调至 pH4, 再用 0.1 mol/L pH7.0 柠檬酸缓冲液配成需要的浓度, 4℃ 保存备用。

1.2.4 测定步骤: 微滴定条孔加入 200 μl 含 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 0.05 mol/L pH7.4 Tris-HCl 缓冲液, 室温放置 1 h, 去上清, 每孔加入 50 μl AP 和 50 μl 5-FSAP, 室温放置 30 min. 再加入 100 μl Tb (III) -EDTA-Tris-HCl 溶液, 振摇 2 min, 静置 2 min. 用 TrF 仪测量荧光强度。

1.2.5 测量条件: 用 TrF 仪测量荧光信号激发光波长 337.1 nm; 发射光波长 613 nm; 延迟时间 400 μs; 样品测量时间 1 s; 结果以 cps 表示。

1.2.6 结果计算: 以 Tb (III) -EDTA 螯合物相对荧光强度 (信号/噪音比值) 为纵坐标, 以 AP 浓度或 5-FSAP 浓度或 Tb (III) 浓度为横坐标作图。Tb (III) -EDTA 螯合物是指 Tb (III) -EDTA-Tris-HCl 复合物在紫外光激发下, 通过能量传递使 Tb (III) 荧光强度得以增强。

2 结果与讨论

2.1 5-FSAP 合成和质量鉴定

5-FSA 与 H₃PO₄ 由化学方法, 进行磷酸化合成 5-FSAP, 产物经红外光谱仪分析, 结果见图 1。5-FSAP 和 5-FSA 气相色谱分析结果表明, 人工合成的 5-FSAP 纯度达 99.9999%。近年来利用 Tb (III) 螯合物, 建立的 EATrFIA 分析法^[8,9], 已逐步在免疫分析和核酸探针分析中得到应用。但关键和必备的试剂是 5-FSAP。国内尚未见合成报道。因此作者成功地合成 5-FSAP, 为开展新型双功能螯合剂与蛋白质、多肽、激素及核酸等偶联

研究, 改进现有 Eu (III) 标记方法。

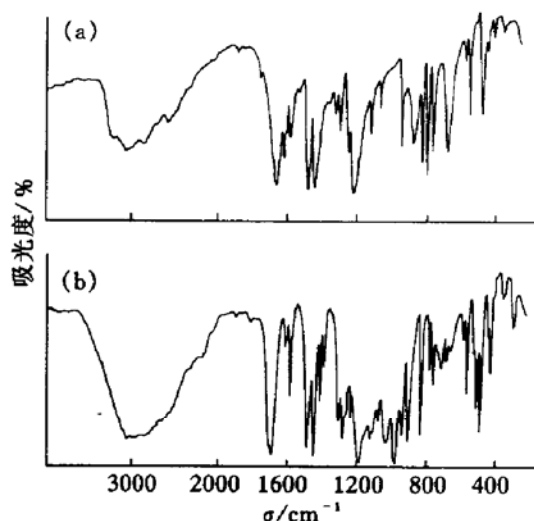


图 1 5-FSAP 的红外光谱图

(a) 为 5-FSA, (b) 为 5-FSAP. σ : 波数。

2.2 AP 与螯合物相对荧光强度

不同浓度的 AP (1~100 kU/L) 与 Tb (III) -EDTA 螯合物 (1 mmol/L) 相对荧光强度曲线见图 2。结果表明在反应过程中, 没有 5-FSAP 存在下, 随着 AP 浓度增加, Tb (III) 螯合物相对荧光强度保持一个恒定值。

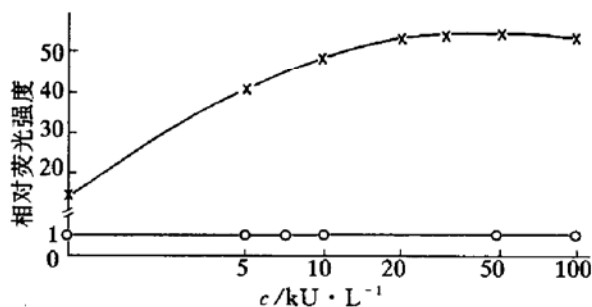


图 2 AP 与螯合物相对荧光强度曲线

○-○: 5-FSAP 浓度为 0, ×-×: 5-FSAP 浓度为 2 mmol/L。

2.3 5-FSAP 浓度与螯合物相对荧光强度

不同浓度 5-FSAP 与 Tb (III) 螯合物相对荧光强度曲线见图 3。

结果表明在一定的 AP 浓度下, 5-FSAP 与 Tb (III) 螯合物相对荧光强度呈正相关。另一方面, 在一定的 5-FSAP 浓度下, 随着

AP 浓度的增加, Tb (Ⅲ) 螯合物相对荧光强度也随之增加, 两者存在着一定比例关系. 从图 3 可见 5-FSAP 浓度、AP 浓度与 Tb (Ⅲ) 螯合物相对荧光强度之间呈正相关. 文献 [8] 报道 5-FSAP 采用 2 mmol/L, 而本实验从 1.2~2 mmol/L 均可以. 结果还提示, 在 5-FSAP 浓度恒定下, 首先制作 AP 标准曲线, 本方法可测定未知样品中 AP 浓度.

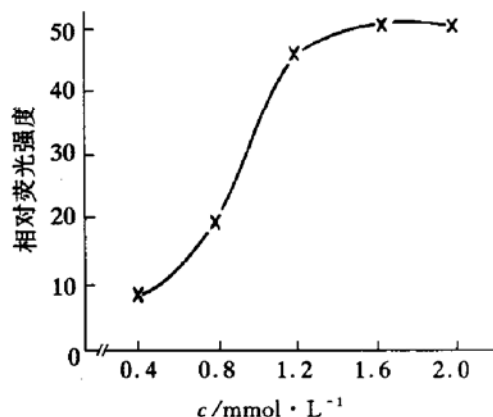


图 3 5-FSAP 与螯合物相对荧光强度曲线

Tb(Ⅲ) 浓度: 1 mmol/L, AP 浓度: 50 kU/L.

2.4 Tb (Ⅲ) 浓度与螯合物相对荧光强度

在一定 AP (50 kU/L) 和 5-FSAP (2 mmol/L) 浓度下, 不同浓度 Tb (Ⅲ) - EDTA-Tris-HCl 对 Tb (Ⅲ) 螯合物相对荧光强度的影响. 从图 4 表明 Tb (Ⅲ) 浓度由 0.4 mmol/L 增加至 0.6 mmol/L 时; 则 Tb(Ⅲ)-EDTA 相对荧光强度呈上升趋势;

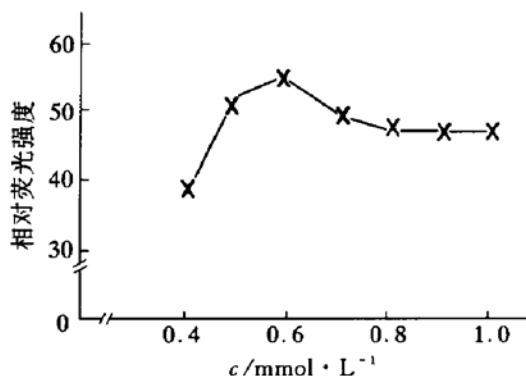


图 4 Tb (Ⅲ) 浓度与相对荧光强度曲线

随着 Tb (Ⅲ) 浓度的增加, 相对荧光强度出现平坦, 实验时将 Tb (Ⅲ) 浓度选择在曲线平坦部分, 有利于保证免疫检测的可靠性.

总之, 上述实验结果为建立酶增强时间分辨荧光分析法, 和酶增强时间分辨荧光免疫分析法测定生物活性物质打下基础.

参 考 文 献

- 1 Soini E, Kojila H. Clin Chem, 1983; 29: 65
- 2 Hemmila I, Scand J. Clin Lab Invest, 1988; 48: 389
- 3 陈泮藻, 李振甲. 免疫学杂志, 1990; 6: 54
- 4 张安胜, 李振甲. 中华医学检验杂志, 1991; 14: 50
- 5 陈泮藻, 金林培, 李振甲等. 光电子技术与信息, 1994; 4: 55
- 6 陈泮藻, 史华红, 李振甲. 免疫学杂志, 1993; 9: 207
- 7 史华红, 陈泮藻, 李振甲等. 科学通报, 1995; 40: 367
- 8 Evangelista R A, Pollak A, Templeton E F. Anal Biochem, 1991; 197: 213
- 9 Diamandi A P, Christopoulos T K, Diamandis E P. Clin Chem, 1992; 38: 545

Laboratory Research in Enhance Effect of Tb (Ⅲ) and 5-FSAP on TrF. Chen Panzao, Li Zhenjia (*Institute of Basic Medicine in General Hospital of PLA, Beijing 100853, China*); Jin Linpei, Guo Jianquan (*Department of Chemistry of Beijing Normal University, Beijing 100875, China*).

Abstract To study the ultrasensitive enzymatically amplified time-resolved fluorescence assay (TrF) of bioactive matter, the experimental condition of trivalent terbium ion [Tb (Ⅲ)], 5-fluorosalicyl phosphate ester (5-FSAP) and alkaline phosphatase (AP) have been investigated. It is found that there are some quantitative relationships between them. These results supply some good information for development of TrF.

Key words terbium/europium chelate, alkaline phosphatase, 5-fluorosalicyl phosphate ester, time-resolved fluorescence-assay