

- Press, 1989; 9, 14
- 7 Smit V T H B M, Boot A J M, Smits A M M *et al.*, Ki-ras codon 12 mutation occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas *Nucl Acids Res*, 1988; **16**: 7773
 - 8 Melchior W B, Von Hippel P H. Alteration of the relative stability of dA, dT and dG, dC base pairs in DNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973; **70**: 298
 - 9 Rodenhuis S, Slebos B J C, Boot A J M *et al.* Incidence and possible clinical significance of Ki-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the Human Lung, *Cancer Res*, 1988; **48**: 5738
 - 10 Rodenhuis S, Vande Wetering M L, Mooi W J *et al.* Mutational activation of the Ki-ras oncogene, a possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung, *New Engl J Med*, 1987; **317**: 929

固相时间分辨荧光免疫螯合剂 BCPDA 的 制备及其标记技术*

韩 玲 陈 杞

(第二军医大学基础同位素室, 上海 200433)

提 要

报道了固相时间分辨荧光免疫螯合剂 4, 7-二氯磺基苯-1, 10-菲罗啉-2, 9-二羧酸 (BCPDA) 的制备方法, BCPDA 标记蛋白质及螯合 Eu^{3+} 方法, BCPDA- Eu^{3+} 标记物荧光光谱研究以及固相时间分辨荧光免疫分析法检测甲胎蛋白异质体 (AFP-R-LCA) 方法的建立. 结果表明 BCPDA 能在温和条件下与蛋白质氨基结合并与 Eu^{3+} 螯合, BCPDA- Eu^{3+} 蛋白质标记物荧光特性、标记比度、生物结合活性与国外同类产品一致, 所建立的检测 AFP-R-LCA 免疫分析法最小检测值 0. 6ng/ml, 为提高我国非放射性同位素标记技术水平奠定了基础.

关键词 时间分辨荧光免疫分析, 辅, 亲和素, BCPDA, 固相

时间分辨荧光免疫分析技术 (TRFIA) 是 80 年代初发展起来的一项新型非放射性超微量免疫分析技术^[1,2], 它既具有 RIA 的高度灵敏性, 又具有酶免疫分析法 (EIA) 的操作简便、快速、易自动化等特点, 并克服了 RIA, EIA, 发光免疫分析等方法的固有缺点, 可用于免疫分析、核酸分析及受体分析等分子生物学领域. 固相 TRFIA 是最新一代的 TRFIA 方法^[3], 它以国外最新合成的 Eu^{3+} 螯合剂 4, 7-二氯磺基苯-1, 10-菲罗啉-2, 9-二羧酸 (BCPDA) 为螯合剂, 引入了生物素-亲和素系统, 克服了原来液相 TRFIA 需增强溶液、易受环境 Eu^{3+} 污染、

只能液相测量等缺点, 简化了测量步骤, 提高了测量灵敏度. 固相 TRFIA 的关键是选择合适的螯合剂, 制备高比度、高生物活性的蛋白质标记物. 有关这方面的工作国内尚未见报道. 我们参考 Evangelista 等方法^[4], 制备了 BCPDA, 并用 BCPDA 标记亲和素 (Avidin, Av) 及链霉亲和素 (Streptavidin, SA), 并探讨了 BCPDA 标记蛋白质及螯合 Eu^{3+} 的各种条件, 建立了固相 TRFIA 双位点夹心法检测甲胎蛋白异质体 (AFP-R-LCA) 方法.

* 本文为国家自然科学基金支持的课题.

收稿日期: 1992-02-09 修回日期: 1992-05-10

1 材料与方法

1.1 仪器 X₄型显微熔点测定仪(北京第三光学仪器厂);日立850型荧光分光光度计;日立570-50红外分光光度计;Arcus-1230型时间分辨荧光仪(LKB-Wallac).

1.2 试剂 2,9-二甲基-4,7-二苯基-1,10-菲罗啉,分析纯,德国Merck公司产品;氯磺酸,化学纯,亭新化工厂产品;亲和素、活化生物素、生物素化羊抗人IgG由海军医学研究所提供;链霉亲和素及生物素化羊抗鼠IgG均购于卫生部上海生物制品所;Eu₂O₃,上海跃龙化工厂提供.

1.3 方法

1.3.1 BCPDA的合成 参考 Evangelista 等方法略加修改^[4].以2,9-二甲基-4,7-二苯基-1,10-菲罗啉(I) 11mmol/L与N-溴代丁二酰亚胺 73mmol/L反应得2,9-双(三溴甲基)-4,7-二苯基-1,10-菲罗啉(II),平均产率98%,M.P. 242—244℃.以2.6mmol/L II溶于浓硫酸中反应得2,9-二羧酸-4,7-二苯基-1,10-菲罗啉(III),产率99%,M.P. 202—205℃(分解).将III 1mmol/L溶于少量氯磺酸中,反应得黄色粉末状产物BCPDA,产率92%,M.P. >300℃(分解).

1.3.2 BCPDA标记亲和素(Avidin, Av)参考 Evangelista 与 Diamandis 等方法,略加改进^[4,5].

1.3.3 BCPDA螯合Eu³⁺ 用10mmol/L Tris(pH7.8,含10⁻⁵mol/L Eu³⁺)稀释水解BCPDA及BCPDA-Av至所需浓度,37℃保温1h,得BCPDA-Eu³⁺及Av-BCPDA-Eu³⁺.

1.3.4 BCPDA浓度曲线 参考 Diamandis 等方法^[5].

1.3.5 BCPDA及其标记物荧光光谱测定 分别取4ml Eu³⁺-BCPDA、Eu³⁺-BCPDA-Av、BCPDA-Av、水解BCPDA、10⁻⁶mol/L Eu³⁺,测荧光光谱.

1.3.6 聚苯乙烯微滴板的包被 参考

Diamandis 等方法进行^[5].

1.3.7 BCPDA标记蛋白的活性测定 参考 Diamandis 等方法略加改进^[5].

1.3.8 生物素标记AFP-R-LCA单抗M₁(MbM₁) 取1mg活化生物素溶于二甲基甲酰胺中,将生物素溶液加入不断搅拌MbM₁(1mg/ml)中,室温搅拌2h,对0.1mol/L NaHCO₃(含0.9%NaCl)透析24h,加50%甘油于-20℃保存.

1.3.9 双位点夹心法检测AFP-R-LCA 用前述方法包被AFP-R-LCA单抗A₁₁(MbA₁₁) 50μg/ml,200μl/孔,加入AFP-R-LCA标准抗原200μl/孔,37℃,2h,洗4次,加入生物素化MbM₁5μg/ml,200μl/孔,37℃,2h,洗4次,加入SA-BCPDA-Eu³⁺(4μg/ml),200μl/孔,37℃,1h,洗6次后吸干测荧光强度.

2 结果

2.1 BCPDA及其前体熔点和光谱分析

2.1.1 BCPDA及其前体熔点及红外光谱分析 表1为BCPDA及其前体熔点和主要红外吸收光谱.该结果表明BCPDA及其前体熔点与文献值近似,化合物III呈现羧基特征吸收,其前体II无此吸收,提示该化合物已基本羧化.BCPDA呈现羧基及氯磺酸基特征吸收,表明4,7-二苯环上已连接氯磺酸基,同时仍保持羧基完整性.上述结果说明合成BCPDA与预期产物结构一致.

2.1.2 BCPDA及其标记物荧光光谱分析 表2表明BCPDA蛋白质标记物以及Eu³⁺螯合物的荧光激发峰为304nm,荧光发射峰为615nm,提示BCPDA蛋白质标记物与Eu³⁺螯合后能较好吸收能量,发射较强荧光.

2.1.3 BCPDA浓度曲线 测定不同浓度(0.5×10⁻⁹,10⁻⁹,5×10⁻⁸,10⁻⁸,5×10⁻⁷,10⁻⁷,5×10⁻⁶,10⁻⁶,10⁻⁵mol/L)BCPDA的荧光强度,以荧光强度为纵座标,以BCPDA浓度为横座标,绘制浓度曲线(图1).

2.2 BCPDA标记蛋白质条件的选择

2.2.1 标记反应时间对标记物生物结合

活性的影响 图 2 表明反应时间为 15min 时标记物生物结合活性不断下降。
记物生物结合活性最高,随着反应时间的延长,

表 1 BCPDA 及其前体的熔点及红外吸收光谱

名 称	熔 点		主要红外吸收光谱		
	自制	文献 ^[3]	羟基特征吸收 3450cm ⁻¹	羧基特征吸收 1740cm ⁻¹	氯磺酸基特征吸收 1180cm ⁻¹
2, 9-双(三溴甲基)-4, 7-二苯基-1, 10-菲罗啉 (I)	242—244℃	/	—	—	—
2, 9-二羧酸-4, 7-二苯基-1, 10-菲罗啉 (II)	202—205℃	202—208℃	+	+	—
BCPDA	>300℃	>300℃	+	+	+

表 2 BCPDA 及其标记物荧光光谱

名 称	荧光激发光谱 (nm)		荧光发射光谱 (nm)	
	范围	λ_{ex}	范围	λ_{em}
Eu ³⁺	324—348	337	655—700	676
BCPDA	295—316	306	600—604	620
Avidin	288—310	300	580—625	605
BCPDA-Avidin	292—314	300	580—620	600
BCPDA-Eu ³⁺	290—318	304	580—630	619
Avidin-BCPDA-Eu ³⁺	280—320	303	605—630	615

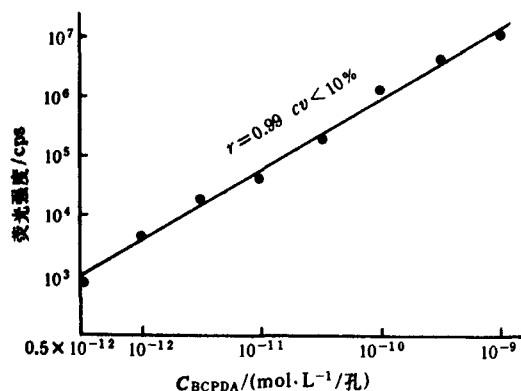


图 1 BCPDA 浓度曲线

2. 2. 2 BCPDA 用量对标记物生物结合活性的影响 图 3 表明当 BCPDA: Av (重量比) = 1: 2 时, 标记物 BCPDA-Av 的生物结合活性最高. 随着 BCPDA 用量的增加, 虽然标记物的标记比不断上升, 但其生物结合活性却不断下降, 提示 BCPDA 用量过多, 标记物标记比过高将影响标记物的生物结合活性.

2. 3 固相 TRFIA 双位点夹心法检测 AFP-R-LCA 标准曲线

以不同浓度 (0, 1, 5, 15, 20ng/ml) 的 AFP-R-LCA 标准品为检测标本, 绘制标准曲线如图 4. 回归分析得相关系数 $r=0.98$, 标准曲线测定范围 1—20ng/ml, 最小可测值为 0.6ng/ml, 变异系数小于 10%.

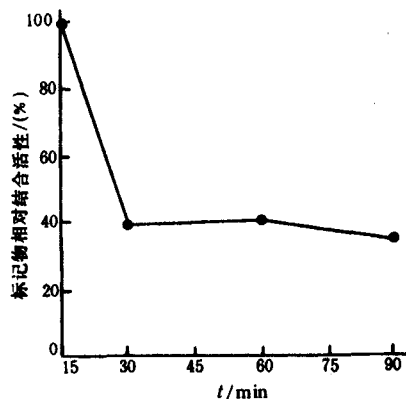


图 2 标记反应时间与标记物生物活性关系

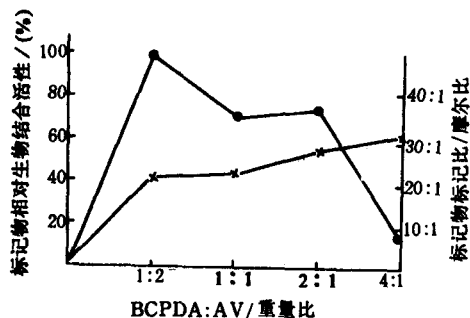


图 3 BCPDA 用量与标记物生物结合性及标记率的关系

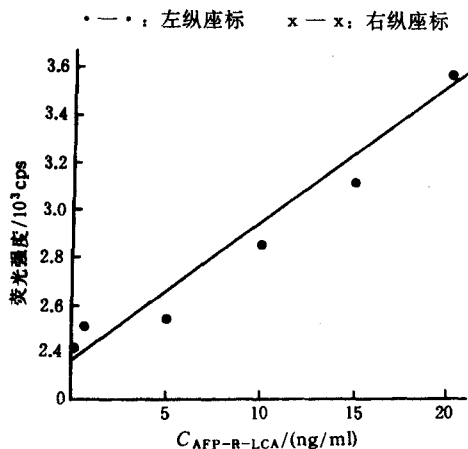


图 4 固相 TRFIA 法检测 AFP-R-LCA 标准曲线

3 讨 论

镧系元素作为示踪物用于免疫及核酸分析是最近 10 年发展起来的新的标记技术。Eu³⁺等稀土元素取材容易，荧光激发光波长范围较宽，发射光波长范围较窄，有利于提高激发能降低本底，提高信噪比。并且激发光与发射光之间的 Stokes 移位较大^[6]，荧光衰变时间较长 (Eu³⁺为 1000μs)，而样品中蛋白类自身荧光衰变时间较短 (1—10ns)^[7]，利用时间分辨荧光测量法，延迟测量时间，待样品中短寿命荧光完全衰变后，再测量 Eu³⁺螯合物荧光，有效地排除非特异本底荧光。

TRFIA 关键在于选择合适的螯合剂，制备高质量的标记物。国外报道主要螯合剂有 DTPA^[8]，DTPAA^[7]，异硫氰酸苯基——EDTA^[9]，异硫氰酸苯甲基——DTTA^[10]，1-(P-苯二氮)-EDTA^[11]，W₁₁₇₄^[7]，W₂₀₁₄^[12]等。这类螯合

物需借助增强溶液进行液相测定，易受环境 Eu³⁺污染，给免疫测定及试剂的配制带来许多困难。BCPDA 为国外最新合成的 Eu³⁺螯合剂，它一端含氯磺酸基可与蛋白质氨基结合，另一端含 2 个杂芳香氮及 2 个羧基可与 Eu³⁺螯合。以 BCPDA 建立的固相 TRFIA 可克服上述螯合剂之缺点，提高测量灵敏度^[3]，具有广泛的应用前景。

Evangelista 等报道以 2, 9-二甲基-4, 7-二苯基-1, 10-菲罗啉及 N-氯代丁二酰亚胺为原料经三步反应合成 BCPDA。我们以 N-溴代丁二酰亚胺代替 N-氯代丁二酰亚胺制备 BCPDA 并提高反应速度。并观察到合成反应完成后，由于氯磺酸基极易水解，必须低温快速真空滤除水分并真空干燥，将产物避光保存于 -20℃。

标记比的高低是影响免疫测定灵敏度的重要因素之一。国外文献报道标记方法多采用 Tolvonon 等的直接标记法^[13]，标记比以 15:1 (Eu³⁺:蛋白质) 较好。国内文献报道多用 DT-PAA 二步标记法^[8]，标记比以 3—4:1 较好。我们参考 Diamandis 等二步标记法^[5]，获得较高标记比 Eu³⁺:SA=20:1—25:1，以及较高生物活性，符合固相 TRFIA 要求。在观察了各种因素对标记物的影响后发现标记反应时应注意以下几点：a. 标记反应时间：过长的标记时间可获得较高标记比，但标记物生物活性下降。我们的实验表明 15—20min 的标记时间可获得较高生物活性。b. BCPDA 用量：BCPDA 标记蛋白质时的用量因蛋白质不同而不同。BCPDA 用量过多，标记比过高，生物活性下降。所以应选择最适 BCPDA 用量以获得较高标记比及生物活性。在我们的实验条件之下，Av:BCPDA (重量比)=1:1，SA:BCPDA=1:2 的投料量最合适。c. BCPDA 与 Eu³⁺螯合时间。Diamandis^[5]等报道螯合反应时间 1h (37℃)，我们的实验表明螯合反应可在 20min (37℃) 内迅速完成。

Chan^[14]等报道固相 TRFIA 法检测甲胎蛋白的灵敏度为 0.1ng/ml。我们用固相 TRFIA 双位点夹心法测定 AFP-R-LCA，灵敏

度为 0.6ng/ml.

总之,我们在国内首先合成了固相 TRFIA 螯合剂 BCPDA,探讨了 BCPDA 标记蛋白质及螯合 Eu^{3+} 的各种条件,所得 BCPDA 与国外同类产品一致,标记物具有较高标记比及生物活性,建立的双位点夹心法检测 AFP-R-LCA 的灵敏度为 0.6ng/ml,灵敏度高于 EIA 法,并可与 RIA 相比较.为新一代非放射免疫方法的建立及推广应用奠定了基础.

本实验得到陈雄、张丽民、陈克明、贺广彩等老师的大力支持,特此感谢.

参 考 文 献

- 1 Hurskainen P, Dahlen P, Siitari H *et al.* Time-resolved fluorometry: Principles and application to clinical microbiology and DNA technology. *Adv Exp Med Biol*, 1990; **263**: 123
- 2 Hemmila I. Lanthanides as probes for time-resolved fluorometric immunoassays. *Scand J Clin Lab Invest.*, 1988; **48**: 389
- 3 韩玲,沈先荣,陈杞.一种新的非放射性免疫分析技术——时间分辨荧光免疫分析.国外医学,军事医学分册.1991; **4**: 159
- 4 Evangelista RA, Pollak A, Allore B *et al.* A new europium chelate for protein labling and time-resolved fluorometric applications, *Clin Biochem*, 1988; **21**: 173
- 5 Diamandis E P, Morton R C, Reichstein E *et al.* Multiple fluorescence labeling with europium chelaters application to time-resolved fluoro-immunoassays. *Anal Chem*, 1989; **61**: 48
- 6 胡天喜.时间分辨荧光免疫分析法.生物化学与生物物理进展,1987; **14** (5): 8
- 7 张天胜,李振甲.时间分辨荧光免疫分析技术的应用与进展.国外医学,临床生化分析与检验学分册,1990; **11** (5): 1
- 8 Dechaud H, Bador R, Claustrat F *et al.* Laser-excited immunofluorometric assay of prolactin, with use of antibodies coupled to lanthanide-labeled diethylenetriaminepentaacetic acid. *Clin Chem*, 1986; **32**: 1323
- 9 Hemmila I, Dakubu S, Mikkala V M *et al.* Europium as a label in time-resolved immuno-fluorometric assays. *Anal Biochem*, 1984; **137**: 335
- 10 Helsingius P, Hemmila I, Lovgren T *et al.* Solid-phase immunoassay for digoxin using time-resolved fluorescence. *Clin Chem*, 1986; **32**: 1767
- 11 Charles S H L and Claude F M. Attachment of fluorescent metal chelates to macromolecules using "Bifunctional" chelating agents. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977; **75** (1): 149
- 12 Dahlen P, Hurskainen P, Lovgren T *et al.* Time-resolved fluorometry for the identification of viral DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol.*, 1988; **26** (11): 2434
- 13 Tolonen E, Hemmila I, Marniemi J *et al.* Two-site time-resolved immuno-fluorometric assay of human insulin. *Clin Chem*, 1986; **32**: 637
- 14 Chan M A, Bellem A C, Diamandis E P. Time-resolved immuno-fluorometric assay of alpha-fetoprotein in serum and amniotic fluid, with a novel detection system. *Clin Chem*, 1987; **33**: 2000

高效薄层色谱法纯化合成寡核苷酸及其衍生物

王升启 马立人

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

提 要

在分子生物学研究的许多领域均需要一定纯度的寡核苷酸.目前寡核苷酸的纯化方法主要有高效液相色谱法及电泳法两种.这两种方法不仅需要一定的仪器设备而且纯化周期长(2—3d)、回收率低(50%—80%).文中报道建立了一种高效薄层色谱纯化寡核苷酸及其衍生物的方法.该方法可在3—4h内获得寡核苷酸纯品,平