讲 座

镧系元素标记核酸探针技术

韩 玲 陈 杞

（第二军医大学基础同位素实验室，上海 200433）

提 要

镧系元素标记核酸探针技术是利用某些镧系元素及其螯合物作为标记物，通过多种标记方法合成镧系元素核酸探针，用时间分辨荧光测定法进行检测，可以代替放射性核素标记探针进行各种检测和分析。该方法具有灵敏、快速、安全、简便、经济等特点。

关键词 镧系元素，核酸探针，时间分辨荧光

镧系元素标记核酸探针技术是80年代末发展起来的一种非放射性标记技术。它采用三价的镧系元素及其螯合物作为荧光标记物，利用时间分辨荧光测定法排除样品的非特异性荧光干扰，提高测量的灵敏度。它在灵敏度、专一性、稳定性、简便性等方面都可与放射性核素核酸探针相媲美，它的线性范围及分析速度都超过放射性核酸探针。它不仅克服了放射性核酸探针的放射性污染、衰变时间短，试剂昂贵、操作不易自动化等缺点，而且克服了其它非放射性核酸探针灵敏度较低、稳定性差、影响因素多等缺点。随着标记方法及测定手段的不断改进，已日益显示其优越性和广泛的应用价值。本文简要介绍该技术原理、方法及应用前景。

1 镧系元素标记探针技术的原理

某些镧系元素如铕（Eu）、铽（Tb）、钐（Sm）、镝（Dy），与螯合剂结合经紫外光激发后能发出特征性荧光，其中 Eu^{3+} 应用最广。以既能与 Eu^{3+} 螯合又能与核酸或蛋白质游离氨基共价结合的双功能螯合剂将 Eu^{3+} 标记到核酸、抗体或链亲合素（SA）分子上形成荧光标记物，经核酸杂交反应或免疫亲合反应结合后，分离结合与游离的荧光标记复合物分子，利用 Eu^{3+} 螯合物所具有的激发波长范围宽、发射波长范围窄、Stokes 移位大（约 290nm）、荧光衰变时间长（10—1000μs）等特点，应用时间分辨荧光仪，以紫外光（314nm）为激发光，在每个激发脉冲过后，延迟一定的时间，避开短寿命的荧光，测定结合物中 Eu^{3+} 发射的长寿命特征性荧光强度，有效地排除由血清成分、试剂、器材等导致的短寿命非特征性本底荧光的干扰，大大提高了测量灵敏度[1,2]。

2 螯合剂的分类及特点

选择合适的螯合剂是制备高质量的镧系元素标记核酸探针的关键所在。常用螯合剂主要有以下三种。

2.1 聚羧酸类螯合剂 主要有1-(*p*-苯二氮)-EDTA[3]，异硫氰酸苯基-EDTA[4]，异硫氰酸苯甲基-二乙三胺四乙酸[5,6]，二乙三胺五乙酸(DTPA)[7]。它们是具有双功能基团的螯合剂，一端可螯合 Eu^{3+}，另一端可与蛋白质等的游离氨基共价结合。这类螯合剂螯合 Eu^{3+} 能力强，溶解度高，稳定性好，制备方法简便。但它们与 Eu^{3+} 形成的螯合物在高 pH（pH 7—9）

收稿日期：1991-07-17 修回日期：1991-11-07

的水溶液中发出的能量向水中扩散而使荧光变弱，达不到测量要求，因此不能直接测量，必须采用酸性的增强溶液解离 Eu^{3+}，解离出的 Eu^{3+} 再与增强溶液中的 β-二酮类螯合剂结合形成可产生强荧光的新螯合物，使荧光强度增强近 100 万倍.

2.2　4,7-二氯磺基苯-1,10-菲罗啉-2,9-二羧酸（BCPDA）. BCPDA 是 Evangelista[8] 等 1988 年合成的一种新的螯合剂. BCPDA 有二个磺酰氯基团可在温和条件下与核酸或蛋白质的氨基共价结合，有二个杂芳香氮和二个羧基可与 Eu^{3+} 螯合形成稳定的螯合物. 这种螯合剂稳定性好，不需增强溶液，可固相测量，多采用氮激光为激发光源，避免了聚羧酸类螯合剂的弱点.

最近的研究表明 BCPDA 是一种很有前途的 Eu^{3+} 螯合剂. Khosravl[9] 及 Chan[10] 等成功地用 BCPDA 标记 SA. Eu^{3+}-BCPDA-SA 有很高的生物活性，可与生物素稳定结合，有放大荧光作用，制备简便并可作为通用试剂. 其标记率（BCPDA/SA）以 15:1 为最佳，过高会影响 SA 的生物活性. Diamandis 等用 BCPDA 标记甲状腺球蛋(TG)，将 BCPDA-TG 与 SA 结合成 SA-TG-BCPDA-Eu^{3+}，其各成分构成比为 1:1:160，即一个 TG 可结合 160 个 BCPDA 而不影响 SA 的生物活性，从而提高了测量灵敏度[11]. SA-TG-BCPDA-Eu^{3+} 可作为通用试剂，4℃可保存一年以上.

2.3　W_{2014}　W_{2014} 由芬兰 Wallac 实验室合成[12]. 它是异硫氰酸盐类似物，含有既能与游离氨基共价结合又可与 Eu^{3+} 螯合的双功能基团. 可用于直接标记核酸分子. 标记物非常稳定，可耐受核酸的煮沸变性及核酸杂交整个过程，是目前唯一能用于直接标记 DNA 的 Eu^{3+} 螯合剂.

3　镧系元素标记核酸方法

镧系元素标记核酸方法主要有直接标记和间接标记两种方法. 直接标记即用螯合剂将 Eu^{3+} 直接与作为探针的核酸片段连接形成 Eu^{3+}-核酸探针标记物. 间接标记法是用半抗原或生物素与核酸结合形成半抗原或生物素-核酸探针，再用 Eu^{3+} 标记的特异性抗体或 SA 对核酸杂交体进行检测.

目前唯一的 Eu^{3+} 螯合物直接标记 DNA 方法由芬兰 Wallac 实验室建立[1,12]. 其基本原理是在酸式亚硫酸钠（sodium bisulfite）及乙烯胺（ethyleneamine）存在条件下，单链 DNA 的胞嘧啶残基被修饰形成含有初级脂肪氨基的 DNA，然后，被修饰的 DNA 与 W_{2014}-Eu^{3+} 共价结合成 Eu^{3+}-DNA 荧光标记物（图 1）[12]. DNA 分子的 1—10% 的核苷酸可被 Eu^{3+} 标记. 此法的特点是标记方法简便，影响因素少，灵敏度高（10pg），价格便宜，标记探针稳定.

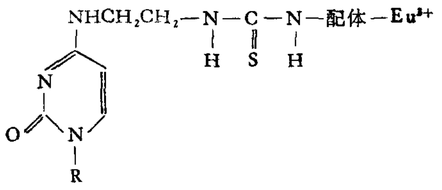

图 1　Eu^{3+} 标记核酸的结构

间接标记有多种方法. 一种方法是先在 DNA 上连接半抗原，再用 Eu^{3+} 标记的能与半抗原特异结合的蛋白对其进行检测. 生物素是一种最常用的半抗原，一般通过"缺口平移"或化学方法进行标记. 用 Eu^{3+} 螯合物标记 SA 形成 Eu^{3+}-SA，Eu^{3+}-SA 可与生物素化的 DNA 杂交体特异结合，用时间分辨荧光仪(TR-荧光仪)测定荧光强度. Eu^{3+} 螯合物标记 SA 方法是：取 1mgSA，溶于 0.5ml 0.05mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液中，加入相当于 100 克分子当量的异硫氰酸苯基-EDTA-Eu^{3+} 螯合物，4℃过夜，反应液经 Sephadex G_{50} 纯化，计算 Eu^{3+}/SA 比值. 由于 SA 的引入，荧光强度得到放大，标记方法比较简单，标记物稳定，灵敏度可达 10pg[13].

Syvänen 等[14] 用半抗原（huorene 或 sulfone）修饰 DNA 探针，杂交反应后用抗半抗原抗体与核酸杂交体上半抗原结合，再用 Eu^{3+} 标记的第二抗体进行检测. 与前述方法

相比，这种方法的灵敏度不够理想（20pg）.

另一种间接标记方法是将重组质粒 DNA 的特异性插入片段部分酶切成单链，载体质粒仍保持双链. 通过光化学反应将带有硫醇基的 psoralen 衍生物插入到质粒双链部分，然后将 DTPA 连结的多聚赖氨酸（DTPA-PLL）与质粒上修饰的硫醇基结合成 DTPA-PLL-DNA 探针. 杂交反应后用 Eu^{3+} 与 DTPA 螯合，用 TR-荧光仪检测荧光强度. 这种方法有许多优点. 标记物仅修饰非特异质粒双链部分，特异性单链插入片段保持原来的生物活性. 这避免了分离插入片段及 DNA 变性等繁琐步骤，保证了杂交反应的高效率及专一性，减少样品中由质粒产生的假阳性杂交，使测量灵敏度达 5pg[15]. 此外，标记方法简单，标记物 Psoralen 衍生物及 DTPA-PLL 合成简便，稳定性好，可作为通用试剂用于其它金属离子、生物素、荧光染料的标记. 标记好的 DNA 探针相当稳定，可大量制备，冷冻保存.

4 镧系元素标记核酸探针的性质

在 Eu^{3+} 标记核酸探针技术中，标记探针的性质及检测系统的性能是对灵敏度和专一性影响较大的主要因素. 因此在合成标记探针时必需考虑标记反应对核酸分子的影响. Hurskainen 等[1] 发现 Eu^{3+} 螯合物修饰 DNA 可导致 DNA 性质的改变. 在双链 DNA 中，胞嘧啶的 N^4 氨基与鸟嘌呤互补形成氢键，而 Eu^{3+} 螯合物的直接标记正好修饰胞嘧啶 N^4 位置而降低了 DNA 双螺旋的热稳定性. Eu^{3+} 标记率为 5%和 10%的 λ DNA 解链温度均低于未经修饰 λ DNA 的解链温度. 将靶 λ DNA 固定于硝酸纤维滤膜，用 Eu^{3+}-λ DNA 进行杂交，Eu^{3+} 标记率为 5%及 10%的 Eu^{3+}-λDNA 的杂交效率分别为 11%及 8%. 两种探针在相同杂交时间内获得最佳荧光信号. 生物素标记 DNA 探针也使 DNA 热稳定性降低. 而用 Psoralen 介导的间接标记法由于仅标记非特异双链质粒部分，特异性单链部分未被标记而保持其原来的生物活性，提高了测量灵敏度.

5 镧系元素标记核酸探针的标记率

检测方法的灵敏度与核酸探针中 Eu^{3+} 的多少有直接关系，较高的标记率有利于提高灵敏度. 但提高标记率受多种因素限制，如较高的标记率对探针的专一性及稳定性影响很大，严重时不能有效地进行杂交. 此外，标记率的提高也受标记方法本身的限制. 在直接标记法中，Eu^{3+} 标记率 5%最合适，标记率为 10%时使杂交效率下降. 在间接标记法中，Eu^{3+}/SA 为 10 最合适，其荧光信号与噪声比为 25，当 Eu^{3+}/SA 大于 10 时，荧光信号与噪声比降至 18. 而由 psoralen 介导的间接标记法中，标记率仅受标记方法本身的限制，较高的标记率不会影响核酸的专一性和稳定性.

6 镧系元素标记核酸探针的灵敏度

由于 Eu^{3+} 标记物的特殊荧光性质及时间分辨荧光测定技术的应用，使测量灵敏度大大提高. 在各种标记方法中，无论是以硝酸纤维滤膜还是以聚苯乙烯微滴度条为固定相，以 psoralen 介导的标记方法灵敏度最高. Dahlen 等发现以液相夹心杂交方法代替普通杂交方法可提高测量灵敏度[15]. 他们用 Eu^{3+}-SA 及夹心杂交法检测大肠杆菌使灵敏度达 1.9pg. 夹心杂交法是将未标记的捕获 DNA 固定于固相，将待测 DNA 与互补的捕获 DNA 杂交，再用生物素或其它物质标记的 DNA 探针（不与捕获 DNA 互补）与待测 DNA 杂交，形成捕获 DNA-待测 DNA-生物素标记 DNA 夹心结构，再用 Eu^{3+}-SA 等检测系统进行检测. 反应在液相中进行，不仅可缩短反应时间，提高灵敏度，而且使待测样品不必经严格纯化处理，使检测方法快速、简便、稳定、灵敏，尤其适合于临床快速诊断感染性疾病. 其不足之处是须进行复杂的亚克隆工作.

7 镧系元素标记核酸探针应用展望

与放射性核素核酸探针及其它非放射性核酸探针相比，镧系元素标记核酸探针技术在灵

敏度、稳定性、测定线性范围及测定速度、安全性等方面都有较大优越性. 目前国外科技工作者正从方法学的角度在螯合剂的选择、标记技术及杂交方法的改进等方面进行广泛的研究. 在螯合剂选择方面，已用于核酸探针标记的螯合剂都需要增强溶液，不能固相测量，这既增加了污染机会及测量步骤，又限制了方法的应用. 如果能将最新合成的螯合剂 BCPDA 应用于核酸探针标记，研究出新的固相测定方法，将会克服上述之不足并扩大其应用范围. 在标记方法方面，直接标记法简便，影响因素少，测定步骤简单. 在杂交方法方面，液相杂交可缩短杂交时间，避免样品复杂的纯化处理，提高灵敏度. 如果将直接标记、液相杂交、固相测量与时间分辨荧光技术相结合，那么镧系元素标记核酸探针技术将逐渐在许多方面取代放射性核酸探针应用于快速诊断遗传性疾病、感染性疾病、恶性肿瘤等，并可广泛应用于基因工程等分子生物学研究领域.

参 考 文 献

1 Hurskainen P *et al.* *Adv Exp Med Biol*, 1990; **263**: 123
2 Hemmilä I. *Scand J Clin Lab Invest*, 1988; **48**: 389
3 Kuo J E *et al.* *Clin Chem*, 1985; **31**(1): 50
4 Hemmilä I *et al.* *Anal Biochem*, 1984; **137**: 355
5 Toivonen E *et al.* *Clin Chem*, 1986; **32**(4): 637
6 Helsingius P *et al.* *Clin Chem*, 1986; **32**(9): 1767
7 Dechaud H *et al.* *Clin Chem*, 1986; **32**(7): 1323
8 Evangelista R A *et al.* *Clin Biochem*, 1988; **21**: 173
9 Khosravl M J *et al.* *Clin Chem*, 1987; **33**(11): 1994
10 Chan M A *et al.* *Clin Chem*, 1987; **33**(11): 2000
11 Diamandis E P *et al.* *Anal Chem*, 1989; **61**: 48
12 Dahlen P *et al.* *J Clin Microbiol*, 1988; 26(11): 2434
13 Dahlen P. *Anal Biochem*, 1987; **164**: 78
14 Syvänen A C *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1986; **14**(2): 1017
15 Oser A *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1988; **16**(3): 1181
16 Dahlen P *et al.* *Molecular and Cellular Probes*, 1987; **1**: 159

书　讯

欢迎订阅
《中风的预报和预防》

«中风的预报和预防»一书由上海医科大学施永德、唐镇生教授主编. 上海科学技术文献出版社出版(书号: ISBN7-80513-089-2/R·10). 出版时间: 1991 年 9 月第 2 次印刷.

本书共 114 页，从生物物理学的角度阐明了中风预报和预防的基本原理. 全书共分七章:

第一章　中风预危害及其发病原因. (唐镇生、施永德)

第二章　各种中风危险因子分析. (施永德、唐镇生)

第三章　中风预报方法: 从统计数学、概率论的角度概括了家属史、体重、性格、女性生育史、副食品习惯、抽烟史、饮酒史、高血压、心脏病、慢支、糖尿病、高血脂、手术史、甲皱微循环、球结膜微血管、眼底动脉、动静脉交叉压迫、紫舌、血压血粘比值、既往脑血管病史，8 项血液流变学指标及其分析结果、血栓病史、职业、体育文娱活动、家庭和工作环境、免疫性和肿瘤性病史、吃药史和其它因素等 31 个项目. 73 个亚项目的检测结果利用电脑计算处理，获得 3 种概率: 缺血性中风概率，出血性中风概率和不发生中风概率. 揭示了当前中风预报研究中存在的某些问题，以及中风预报和预防之间的联系. (施永德)

第四章　中风的首次发作与复发. (秦芝九)

第五章　预防中风的医疗措施. (李其松)

第六章　老年人的体育运动对预防中风的作用. (张雪成)

第七章　老年人的营养和饮食对预防中风的作用. (郑仙梅)

本书系根据上海医科大学以上教授当前第一资料写出，各地新华书店均有经销，如各书店无库存，可写信给上海医科大学生物物理教研室中风预报协作组施永德教授订阅(邮码: 200032)，每册 5 元(含邮费).