

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/533 G01N 33/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02132910.9

[43] 公开日 2004年3月17日

[11] 公开号 CN 1482459A

[22] 申请日 2002.9.11 [21] 申请号 02132910.9

[71] 申请人 中国科学院大连化学物理研究所
地址 116023 辽宁省大连市中山路457号

[72] 发明人 袁景利 王桂兰

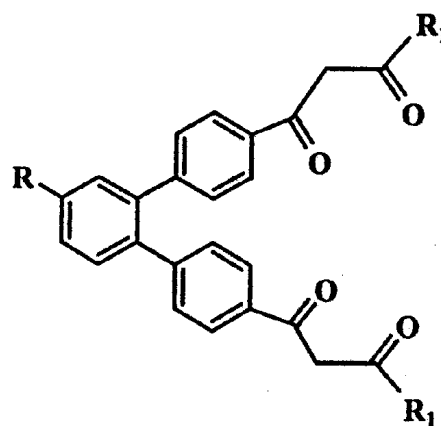
[74] 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司
代理人 许宗富

权利要求书2页 说明书14页 附图5页

[54] 发明名称 三价镧 - β - 二酮荧光标记物及其应用

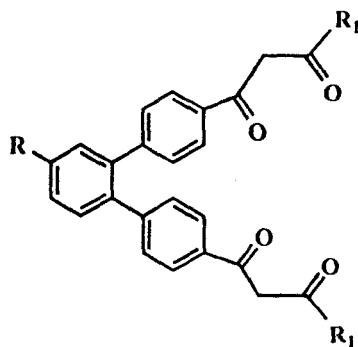
[57] 摘要

本发明公开了三价镧 - β - 二酮荧光标记物及其应用, 其中四齿 β - 二酮类配位体含有双 β - 二酮基取代邻二苯基苯骨架结构和可与生物分子直接键合的功能性取代基, 其 β - 二酮部位和三价镧离子配位后可形成稳定的强荧光性镧配合物。该类配合物可通过其含有的功能性取代基与蛋白质、氨基酸、多肽、核酸、核苷酸、有机化合物等物质共价结合而标记这些物质, 进而用于这些物质的时间分辨荧光测定。



ISSN 1008-4274

1. 一种三价镧-β-二酮荧光标记物，其特征在于：以三价镧离子与含有可直接与生物分子键合的功能性取代基的4齿β-二酮类配位体形成的荧光配合物，其中所述配位体的结构式为：



式中 R 为可与生物分子键合的活性取代基，亦即氯磺酰基、异硫脲基、氨基或肼磺酰基； R_1 为 C_nH_{2n+1} 、 C_nF_{2n+1} 、 C_6H_5 或 C_6F_5 ，其中， $n=1, 2, 3, 4, 5$ 。

2. 权利要求 1 所述的三价镧-β-二酮荧光标记物用于制备各种标记蛋白质，其制备方法如下：

1) 将待标记蛋白质溶于 pH 值 9.0-9.5 的碳酸氢钠缓冲溶液后，加入 4 齿 β-二酮配位体，室温下搅拌反应 1-2 小时；

2) 用透析或柱层析方法除去反应液中未反应的 β-二酮配位体；

3) 收集已标记的蛋白质溶液，加入 $EuCl_3$ 溶液，其中 β-二酮配位体：镧离子的摩尔比=1：1-10，即制得所需的标记蛋白质，加入防腐剂和蛋白质活性稳定剂，然后低温保存待用。

3. 如权利要求 2 所述的三价镧-β-二酮荧光标记物用于制备各种标记蛋白质的制备方法，其特征在于所述的 β-二酮配位体：镧离子=1：1-2。

4. 如权利要求 3 所述的三价镧-β-二酮荧光标记物用于制备各种标记蛋白质的制备方法，其特征在于所述的 β-二酮配位体：镧离子=1：1。

5. 权利要求 1 所述的三价镧-β-二酮荧光标记物在时间分辨荧光测定法中的应用，其特征在于：首先利用三价镧-β-二酮荧光标记物用于制备

标记蛋白质，所述标记蛋白质与待测物反应，分离除去未反应的标记反应原料后，通过时间分辨荧光测定法测定反应生成物的荧光强度来测定待测物的浓度。

6. 如权利要求 5 所述的三价镧- β -一二酮荧光标记物在时间分辨荧光测定法中的应用，其特征在于：其中的时间分辨荧光测定法为时间分辨荧光免疫测定法，时间分辨荧光 DNA 杂交测定法，时间分辨荧光显微镜测定法，时间分辨荧光细胞活性测定法或时间分辨荧光生物芯片测定法。

7. 权利要求 1 所述的三价镧- β -一二酮荧光标记物用于制备基于标记蛋白质的临床诊断用试剂及试剂盒。

8. 如权利要求 2-7 中任意一个所述的三价镧- β -一二酮荧光标记物的应用，其特征在于所述的蛋白质为抗体、抗原、亲合素、链亲合素、牛血清白蛋白或半抗原-BSA 结合体。

三价钬- β -二酮荧光标记物及其应用

技术领域

本发明涉及三价钬与四齿 β -二酮类配位体荧光标记物的制备方法及其在相关的时间分辨荧光生物检测技术领域的应用。

背景技术

作为生物试料（细胞组织、血液、尿等）中微量生理活性物质的测定方法，免疫测定法、DNA杂交测定法等已广泛应用于各种临床测定中。在这些测定中均需使用某种标记物来标记抗体、抗原、核苷酸、核酸等物质。作为标记物使用的物质包括放射性元素、酶、荧光化合物、化学发光化合物等。

使用放射性标记物的方法虽然灵敏度较高，但放射性标记物及其标记产品在储藏、运输、使用、废液处理等方面存在许多的不便和麻烦，并可导致环境污染，另外由于放射性标记物的自身衰减问题，导致其可保存时间较短。

使用酶标记物虽然没有上述问题，由于酶标记物的分子量太大，其活性极易受到温度、保存条件、酸度、杂离子、防腐剂等的影响，导致使用该标记物的测定方法再现性较差。

使用有机荧光标记物虽然不存在上述两种标记物的问题，但使用这种标记物的测定方法在用于生物组织、血清等样品测定时，由于激发光的散乱光和样品产生的强本底荧光的影响，使这种方法的灵敏度较低，只适用于高浓度物质的测定。

为克服上述有机荧光标记物的问题，近年来使用稀土荧光配合物作为标记物的时间分辨荧光测定法已成功地开发出来，并广泛应用于各种测定中。稀土荧光配合物具有荧光寿命极长、Stokes位移大、荧光发光峰尖锐等特点，通过使用时间分辨荧光测定法，可非常有效地消除激发光的散乱光和样品产生的本底荧光对荧光测定的影响，从而极大地提高测定灵敏度。

现已报道的时间分辨荧光测定法及其存在的问题包括如下几个方面。

(1) PerkinElmer Life Sciences 公司开发的溶解增强时间分辨荧光测定法(简称 DELFIA 测定法)(文献 1, E. Soini and T. Lovgren, *CRC. Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1987, 18, 105-154. 文献 2, E. P. Diamandis and T. K. Christopoulos, *Anal. Chem.*, 1990, 62, 1149A-1157A. 文献 3, I. Hemmila, *J. Alloys Compd.*, 1995, 225, 480-485)。DELFIA 测定法使用三价铈与 N¹-(p-异硫脲基苯基)-二乙基三胺四乙酸的配合物作为标记物来标记抗体、抗原等物质,当免疫反应结束后,由于该标记物是非荧光性铈配合物,所以在进行时间分辨荧光测定之前,必须要在反应体系中加入弱酸性的含有 β-二酮类配位体、三辛基氧化膦及表面活性剂的所谓荧光增强溶液,使铈离子转化为强荧光性配合物后才能进行测定。DELFIA 测定法的优点是灵敏度较高,但由于在该法的荧光测定的溶液中含有大过量的 β-二酮类配位体及三辛基氧化膦,所以该测定法的最大缺点是极易受到测定环境、测定样品及测定用溶液等中的金属离子的污染,对测定操作环境及所用试剂要求极其严格。另外,由于该体系只能进行液相荧光测定,使其应用范围受到很大限制。

(2) 加拿大的 Diamandis 等人开发的 FIAgen 测定法(文献 4, E. P. Diamandis, *Clin. Biochem.*, 1988, 21, 139-150. 文献 5, E. F. G. Dickson, A. Pollak and E. P. Diamandis, *Pharmacol. Ther.*, 1995, 66, 207-235)。该测定法使用荧光性铈配合物 4,7-二(氯磺酰基苯基)-1,10-啡罗啉-2,9-二羧酸(简称 BCPDA)与 Eu³⁺的配合物作为标记物来标识抗体、抗原等物质,当免疫反应结束后不需加入荧光增强溶液即可直接对免疫复合物进行时间分辨荧光测定。该法无 DELFIA 法的缺点,但由于 BCPDA 的铈配合物荧光较弱,其缺点是测定灵敏度较低。

(3) 法国的 Mathis 等人开发的 TRACE 测定法(文献 6, G. Mathis, *Clin. Chem.*, 1995, 41, 1391-1397. 文献 7, G. Mathis, *J. Clin. Ligand Assay*, 1997, 20, 141-147)。该法的同时使用铈荧光配合物三(联二吡啶)窝穴体与 Eu³⁺的配合物和蓝藻蛋白(allophycocyanin)作为荧光标记物的均相时间

分辨荧光测定法。其优点是不需使用固相材料、无结合型/游离型分离(B/F分离)操作及洗涤步骤、操作简单且易自动化,缺点是灵敏度较低并且试剂价格昂贵。

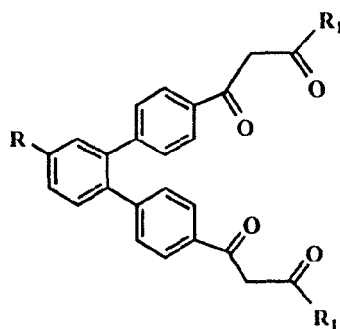
发明内容

本发明的目的是解决上述各种时间分辨荧光测定法中所存在的问题,提供一种可直接用于生物分子标记的三价镧-β-二酮荧光标记物。

本发明的另一目的是提供上述的荧光标记物的应用。

本发明的技术方案是:通过在4齿β-二酮类配位体上导入可直接与生物分子键合的功能性取代基,使之可直接用于生物分子的标记,带有配位体标记的生物分子再与三价镧离子反应,即可形成带有三价镧-β-二酮荧光配合物标记的生物分子,进而用于时间分辨荧光测定。由于三价镧-β-二酮配合物具有非常强的荧光性质(文献8, J. Yuan, K. Matsumoto, Anal. Sci., 1996, 12, 31-36),所以三价镧-β-二酮配合物标记的生物分子用于荧光测定时不需使用任何荧光增强溶液,且测定灵敏度高于现有的时间分辨荧光测定法。

本发明所述4齿β-二酮类配位体的结构式为:



式中 R 为氯磺酰基(-SO₂Cl)、异硫脲基(-NCS)、氨基(-NH₂)、肼磺酰基(-SO₂NHNH₂)等可与生物分子键合的活性取代基, R₁为 C_nH_{2n+1}、C_nF_{2n+1}、C₆H₅或 C₆F₅, 其中, n=1, 2, 3, 4, 5, 即甲基、苯基、五氟苯基、三氟甲基(-CF₃)、五氟乙基(-C₂F₅)、七氟丙基(-C₃F₇)和九氟丁基(-C₄F₉)等脂肪烃、芳香烃取代基。

本发明的荧光标记物能广泛用于各种蛋白质的标记,如抗体、抗原、

亲合素、链亲合素、牛血清白蛋白(简称 BSA), 半抗原-BSA 结合体等。具体标记方法如下:

1) 将待标记蛋白质溶于 pH 值 9.0-9.5 的碳酸氢钠缓冲溶液后, 加入上述 4 齿 β -二酮配位体, 室温下搅拌反应 1-2 小时。

2) 用 Sephadex G-50 柱层析方法除去反应液中未反应的 β -二酮配位体。

3) 收集已标记的蛋白质溶液, 加入 EuCl_3 溶液, 其中 β -二酮配位体: 铕离子的摩尔比=1: 1-10, 优选 1: 1-2, 最佳为 β -二酮配位体: 铕离子=1: 1, 即制得所需的标记蛋白质, 加入防腐剂如 NaN_3 和蛋白质活性稳定剂如 BSA, 然后低温保存待用。

上述的荧光标记物在时间分辨荧光测定法中的应用, 首先利用三价铕- β -二酮荧光标记物用于制备标记蛋白质, 所述标记蛋白质与待测物反应, 分离除去未反应的标记反应原料后, 通过时间分辨荧光测定法测定反应生成物的荧光强度来测定待测物的浓度。

上述的时间分辨荧光测定法为时间分辨荧光免疫测定法, 时间分辨荧光 DNA 杂交测定法, 时间分辨荧光显微镜测定法, 时间分辨荧光细胞活性测定法和时间分辨荧光生物芯片测定法。

上述的荧光标记物还可用于制备基于标记蛋白质的临床诊断用试剂及试剂盒。

与已有方法相比, 本发明具有如下几方面的优点:

1) 本发明的荧光标记物制备及用于标记蛋白质的反应及分离操作简单, 成本低。

2) 本发明的荧光标记物的荧光量子产率及摩尔吸光系数大, 荧光寿命长, 用于时间分辨荧光测定的灵敏度高。

3) 本发明的荧光标记物标记的蛋白质分子用于荧光测定时不需使用任何荧光增强溶液, 可在生化反应(如免疫反应)结束后直接进行时间分辨荧光测定。

4) 不存在 DELFIA 测定法中存在的金属离子污染测定溶液的问题。

附图说明

图 1 是可与三价铕离子配位的 4 齿 β -二酮类配位体的结构式。

图 2 是带有氯磺酰基的 4 齿 β -二酮类配位体 BHHCT 的合成路线。

图 3 是 BHHCT-Eu³⁺标记 BSA 溶液的荧光光谱,其浓度是 2.0×10^{-6} mol/L,溶剂是 pH 值 7.8 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液。

图 4 是 BHHCT-Eu³⁺标记 BSA 系列稀释溶液的时间分辨荧光测定结果。A 线的稀释溶剂是 1.0×10^{-5} mol/L TOPO-0.05% SDS-0.1 mol/L NaHCO₃ 水溶液, B 线的稀释溶剂是 pH 值 9.1 的 0.1 mol/L Tris-HCl 水溶液。

图 5 是使用 BHHCT-Eu³⁺标记抗体的时间分辨荧光免疫测定法测定人血清中甲胎蛋白(AFP)的工作曲线。

图 6 是使用 BHHCT-Eu³⁺标记链亲合素-BSA 结合体的时间分辨荧光免疫测定法测定人血清中免疫球蛋白 E(IgE)的工作曲线。

图 7 是使用 BHHCT-Eu³⁺标记链亲合素-BSA 结合体的时间分辨荧光免疫测定法测定人血清中胰岛素的工作曲线。

图 8 是使用 BHHCT-Eu³⁺标记链亲合素-BSA 结合体的时间分辨荧光免疫测定法测定人血清中前列腺特异抗原(PSA)的工作曲线。

具体实施方式

下面通过实施例对本发明作进一步说明。

实施例 1

4 齿 β -二酮类配位体的合成

(1) 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基)氯磺酰基-邻二苯基苯(简称 BHHCT)的合成。BHHCT 按图 2 所示合成路线合成,具体操作过程如下。

(i) 4,4'-二乙酰基-邻二苯基苯(化合物 I)的合成

外部冰-水浴冷却下,将 14 克无水三氯化铝和 8.1 克乙酰氯溶于 100 毫升干燥的二氯甲烷中,搅拌下滴加入 11.5 克邻二苯基苯溶于 50 毫升二氯甲烷的溶液。反应液在冰-水浴冷却下搅拌 30 分钟后,室温下搅拌 24 小时,然后再回馏 2 小时。将反应液倒入冰与盐酸的混合液中,蒸馏除去二

氯甲烷后，过滤收集沉淀。沉淀用水充分洗涤后，用 125 毫升 2-丁酮重结晶。得目标化合物 12.3 克(78%收率)。元素分析结果(%), 按 $C_{22}H_{16}O_2$ 计算值: C = 84.05, H = 5.77; 实测值: C = 84.06, H = 5.87。 1H NMR (氘代氯仿) 测定结果: 7.83, 7.80 (d, 4H), 7.50-7.40 (m, 4H), 7.24, 7.21 (d, 4H), 2.58 (s, 6H)。

(ii) 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基)-邻二苯基苯(化合物 II) 的合成

将 3.0 克甲醇钠、4.84 克七氟代丁酸乙酯和 3.14 克 4,4'-二乙酰基-邻二苯基苯加入到 70 毫升干燥乙醚中，室温下搅拌反应 36 小时。反应液倒入 100 毫升 15%的硫酸水溶液中，搅拌 15 分钟后，蒸馏除去乙醚。过滤收集沉淀，沉淀用水充分洗涤后，将沉淀加热溶于 200 毫升乙醇中，过滤除去少量的不溶物。乙醇溶液减压浓缩至约 10 毫升后，放入冰箱中冷却结晶。过滤收集析出的结晶，真空干燥。得目标化合物 5.1 克(72%收率)。元素分析结果(%), 按 $C_{30}H_{16}F_{14}O_4$ 计算值: C = 51.00, H = 2.28; 实测值: C = 51.22, H = 2.61。 1H NMR (氘代丙酮) 测定结果: 8.09, 8.06 (d, 4H), 7.60-7.50 (m, 4H), 7.43, 7.39 (d, 4H), 6.99 (s, 2H)。

(iii) BHHCT 的合成

将 2.82 克化合物 II 加入到 10 毫升氯磺酸中，室温下搅拌反应 7 小时后，反应液慢慢滴加入搅拌下的 300 毫升冰-水溶液中，离心收集沉淀。沉淀用冰-水洗涤，过滤后真空干燥。得 BHHCT 2.48 克(75.6%收率)。元素分析结果(%), 按 $C_{30}H_{17}F_{14}O_7ClS$ (BHHCT·H₂O) 计算值: C = 43.78, H = 2.08; 实测值: C = 43.96, H = 2.10。 1H NMR (氘代丙酮) 测定结果: 8.32 (dd, J, 1.98, 8.25 Hz, 1H), 8.23 (d, J, 1.98 Hz, 1H), 8.15 (d, J, 8.25 Hz, 4H), 8.00 (d, J, 8.25 Hz, 1H), 7.57-7.52 (m, 4H), 7.02 (s, 2H)。

(2) 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',-五氟-3'',5''-戊二酮-5''-基)-氯磺酰基-邻二苯基苯的合成。

该化合物的合成反应原理与 BHHCT 的合成相同。首先用五氟代丙酸乙酯与 4,4'-二乙酰基-邻二苯基苯反应制备出 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',-五氟-3'',5''-戊二酮-5''-基)-邻二苯基苯，产

物经元素分析验证, 元素分析结果(%), 按 $C_{28}H_{16}F_{10}O_4$ 计算值: C = 55.46, H = 2.66; 实测值: C = 55.71, H = 2.54。然后再将 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',-五氟-3'',5''-戊二酮-5''-基)-邻二苯基苯与氯磺酸反应即制得目标化合物, 产物经 1H NMR 验证。 1H NMR (氘代丙酮) 测定结果: 8.32 (dd, J, 1.98, 8.25 Hz, 1H), 8.23 (d, J, 1.98 Hz, 1H), 8.14 (d, J, 8.25 Hz, 4H), 8.00 (d, J, 8.25 Hz, 1H), 7.57-7.52 (m, 4H), 7.02 (s, 2H)。

(3) 4,4'-二(1'',1'',1''-三氟-2'',4''-丁二酮-4''-基) 氯磺酰基-邻二苯基苯的合成。

该化合物的合成反应原理也与 BHHCT 的合成相同。首先用三氟代乙酸乙酯与 4,4'-二乙酰基-邻二苯基苯反应制备出 4,4'-二(1'',1'',1''-三氟-2'',4''-丁二酮-4''-基)-邻二苯基苯, 产物经元素分析验证, 元素分析结果(%), 按 $C_{26}H_{16}F_6O_4$ 计算值: C = 61.60, H = 3.19; 实测值: C = 61.68, H = 3.32。然后再将 4,4'-二(1'',1'',1''-三氟-2'',4''-丁二酮-4''-基)-邻二苯基苯与氯磺酸反应即制得目标化合物, 产物经 1H NMR 验证。 1H NMR (氘代丙酮) 测定结果: 8.32 (dd, J, 1.98, 8.25 Hz, 1H), 8.23 (d, J, 1.98 Hz, 1H), 8.12 (d, J, 8.25 Hz, 4H), 8.00 (d, J, 8.25 Hz, 1H), 7.57-7.52 (m, 4H), 6.95 (s, 2H)。

实施例 2

使用 BHHCT-Eu³⁺ 标记蛋白质

(1) 使用 BHHCT-Eu³⁺ 标记 BSA

将 5 毫克 BSA 溶于 1 毫升 pH 值为 9.3 的 0.1 mol/L 碳酸氢钠缓冲溶液中, 搅拌下滴入 3.5 毫克 BHHCT 溶于 200 微升 DMF 的溶液。室温搅拌 1 小时后, 用 Sephadex G-50 凝胶柱分离标记的 BSA 与未反应的 BHHCT, 用 0.05 mol/L 的碳酸氢铵溶液展开。测定标记 BSA 溶液在 330 nm 的吸光度, 利用 BHHCT 在 330 nm 的摩尔吸光系数 ($3.41 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) 计算标记 BSA 溶液中 BHHCT 的浓度, 然后计算标记率 (BHHCT 浓度与 BSA 浓度的比值)。该法制得的标记 BSA 的标记率为 35。溶液中加入与 BHHCT 等摩尔量的 EuCl_3 后,

即得到荧光标记 BSA 溶液 BSA (BHHCT-Eu³⁺)₃₅。溶液中加入 NaN₃ (0.1%) 后用盐酸调整 pH 值为 6.5, 然后放入冰箱中保存。

(2) 使用 BHHCT-Eu³⁺ 标记链亲合素 (简称 SA)

将含有 4 毫克 BHHCT 的 0.2 毫升乙醇溶液加入到 33 毫升含有 5 毫克 SA 的 pH 值 9.1 的 0.1 mol/L 碳酸氢钠缓冲溶液中, 室温搅拌 1 小时后, 4 °C 下用 4 升含有 0.25 克 NaN₃ 的 0.1 mol/L NaHCO₃ 溶液对溶液透析 2 次, 每次 24 小时。通过测定标记后溶液在 330 nm 的吸光度, 测定出透析后溶液中 SA 的标识率为 21, 即所得产物为 SA (BHHCT)₂₁。加入与 BHHCT 等摩尔量的 EuCl₃ 后, 再加入 50 毫克 BSA, 20 毫克 NaN₃ 并用 1 mol/L 盐酸调其 pH 值为 6.5, 放置 -20 °C 冷冻保存。使用时用含有 0.2% BSA-0.1% NaN₃-0.9% NaCl 的 pH 值 7.8 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (缓冲溶液 1) 稀释 500 倍。

(3) 利用 BHHCT-Eu³⁺ 标记 SA-BSA 结合体

将 5 毫克 SA 和 5 毫克 BSA 同时溶解于 2 ml pH 值 7.1 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液中, 并加入 0.1 毫升 1% 的戊二醛, 4 °C, 24 小时反应后, 加入 2 毫克 NaBH₄, 进一步反应 2 小时后, 用 0.9% NaCl 水溶液, 4 °C, 24 小时透析 2 次。透析后溶液用纯水稀释至 15 毫升并加入 126 毫克 NaHCO₃, 用 1 mol/L NaOH 调其 pH=9.1 后, 加入含有 10 毫克 BHHCT 的 0.3 毫升无水乙醇溶液, 室温反应 1 小时。反应后离心除去微量不溶物, 溶液过柱分离, 固定相为 Sephadex G-50, 流动相为 0.05 mol/L NH₄HCO₃。通过测定标记后溶液在 330nm 的吸光度, 测定出标记蛋白质的组成为:

SA (BSA)_{0.9} (BHHCT)₄₆。所收集的标记蛋白质中加入与 BHHCT 等摩尔量的 EuCl₃ 后, 再加入 50 毫克 BSA, 20 毫克 NaN₃ 并用 1 mol/L 盐酸调其 pH 值为 6.5, 放置 -20 °C 冷冻保存。使用时用缓冲溶液 1 稀释 700 倍。

(4) 利用 BHHCT-Eu³⁺ 标记山羊抗人 AFP 抗体

2 毫升 (0.5 mg/ml) 山羊抗人 AFP 抗体 (Nippon Bio-Test Laboratories, Inc.) 用 3 升 0.9% NaCl 水溶液在 4 °C, 24 小时 2 次透析后, 稀释到 10 毫升, 加入 84 毫克 NaHCO₃ 并用 0.1 mol/L NaOH 调其 pH 值为 9.1, 加入含有 3 毫克 BHHCT 的 180 微升无水乙醇溶液, 室温搅拌 1 小时后, 用 Sephadex G-50 凝胶柱分离, 分离条件同上。所收集标记蛋白质部分加入与 BHHCT 等

摩尔量的 EuCl_3 后, 再加入 30 毫克 BSA, 20 毫克 NaN_3 并用 1 mol/L 盐酸调其 pH 值为 6.5, 放置 -20°C 冷冻保存。使用时用缓冲溶液 1 稀释 600 倍。

实施例 3

BHHCT- Eu^{3+} 标记 BSA 溶液的荧光性质测定结果

如图 3 所示, BHHCT- Eu^{3+} 的最大荧光激发波长在 330 nm, 最大发光波长是 614 nm, 其发光峰形状为镧配合物特征的尖锐形发光峰。使用 BHHCT- Eu^{3+} 标记 BSA 溶液测得 BHHCT- Eu^{3+} 在 pH 值 7.8 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液中的荧光寿命为 380 微秒, 荧光量子产率为 0.27, 在含有 1.0×10^{-5} mol/L 三辛基氧化磷及 0.05% 十二烷基磺酸钠的 0.1 mol/L 碳酸钠溶液中的荧光寿命为 641 微秒, 荧光量子产率为 0.76。

BHHCT- Eu^{3+} 标记 BSA 系列稀释溶液的时间分辨荧光测定结果如图 4 所示, 用本底信号标准偏差的 2 倍计算最低检出下限, 得 BSA(BHHCT- Eu^{3+})₃₅ 的最低检出下限为: 在 1.0×10^{-5} mol/L TOPO-0.05% SDS-0.1 mol/L NaHCO_3 水溶液中, 6.5×10^{-15} mol/L; 在 pH 值 9.1 的 0.1 mol/L Tris-HCl 水溶液中, 2.4×10^{-14} mol/L。说明使用 BHHCT- Eu^{3+} 作为标记物的时间分辨荧光测定具有非常高的灵敏度。

实施例 4

使用 BHHCT- Eu^{3+} 标记抗体的时间分辨荧光免疫测定法测定人血清中的甲胎蛋白(简称 AFP)

1) 96 微孔板的包被

将含抗人 AFP 单克隆抗体(Biostride, Inc., 5 g/ml)的 0.1 mol/L, pH 值 9.6 的 NaHCO_3 缓冲溶液 100 μl 分注于 96 微孔板的各孔中, 4°C , 24 小时包被后, 用含有 0.05% Tween 20 的 0.05 mol/L, pH 值 7.8 的 Tris-HCl 缓冲溶液(缓冲溶液 2)洗两次, 再用 0.05 mol/L, pH 值 7.8 的 Tris-HCl 缓冲溶液(缓冲溶液 3)洗 1 次, 此包被后的微孔板 -20°C 下可保存 1 个月以上。

2) 人血清中 AFP 的免疫分析测定

用含有 5% BSA-0.9% NaCl-0.1% NaN_3 的 pH 值 7.8 的 0.05 mol/L Tris-HCl

缓冲溶液（缓冲溶液4）稀释人AFP（Dakopatts, Denmark）制得AFP标准溶液。将此标准溶液和血清样品分别50 μl注入上述包被后的微孔板的各孔中，37℃，1小时反应后，用上述缓冲溶液2（2回），缓冲溶液3（1回）洗净，然后加入50 μl BHHCT-Eu³⁺标记的抗AFP抗体溶液。37℃，1小时反应后，用pH值9.1，含有0.05% Tween 20的0.05mol/L Tris-HCl缓冲溶液（缓冲溶液5）洗4次，然后进行固相时间分辨荧光测定。测定用仪器为WALLAC VICTOR 1420多标记计数仪，测定条件为：激发波长，340 nm；检测波长，615nm；延迟时间，0.2 ms；窗口时间，0.4 ms；循环时间，1.0 ms。

3) 测定结果

如图5所示，用零浓度时的荧光信号（本底）的标准偏差（SD）的3倍计算AFP测定的最低检出下限，得本法的最低检出下限为0.07 ng/ml。工作曲线上限可达100 ng/ml。

表1给出了该法测定血清样品中AFP的精密度。由表可见，该法的相对标准偏差（CV%）不大于8%，平均小于5%，说明该法具有较高的精密度。

表1 人血清样品中AFP测定的精密度

浓度 (ng/ml)	SD (n = 4)	CV (%)
1.68	0.12	7.14
2.26	0.056	2.49
3.38	0.22	6.37
9.30	0.44	4.72
18.4	0.94	5.14
39.6	1.53	3.87

表2给出了该法测定AFP血清样品的回收率，其在95-105%范围内，满足一般微量分析的要求。

表2 标准AFP溶液加入人血清样品中的回收率测定结果

加入量 (ng/ml)	测得量 (ng/ml)	回收率 (%)
0.00	7.60	-----
5.00	12.4	96.0
2.50	10.0	96.0
0.00	16.9	-----
50.0	67.5	101.2
25.0	40.8	95.6
5.00	21.9	100.0

实施例 5

使用 BHHCT-Eu³⁺标记 SA-BSA 的时间分辨荧光免疫测定法测定人血清中的免疫球蛋白 E (简称 IgE)

1) 96 微孔板的包被

将山羊抗人 IgE 多克隆抗体 (Vector Laboratories) 用 0.1mol/L, pH 值 9.6 的 NaHCO₃ 缓冲溶液稀释后 (10 g/ml) 的抗体溶液 100 μl 分注于 96 微孔板, 4°C, 24 小时包被后, 用缓冲溶液 2 洗两次, 再用缓冲溶液 3 洗 1 次, 此包被后的微孔板 -20 °C 下可保存 1 个月以上。

2) IgE 的免疫分析测定

用缓冲溶液 4 稀释人 IgE (Behring, Germany) 制得 IgE 标准溶液。将此标准溶液和血清样品分别 50 μl 注入上述包被后的微孔板, 37 °C, 1 小时反应后, 用上述缓冲溶液 2 (2 回), 缓冲溶液 3 (1 回) 洗净。加入 50 μl 用缓冲溶液 1, 400 倍稀释的兔抗人 IgE 抗体 (Nordic Immunologic Laboratories) 溶液, 37 °C 1 小时反应后, 用上述缓冲溶液 2 (2 回), 缓冲溶液 3 (1 回) 洗净后, 加入 50 μl 用缓冲溶液 1, 500 倍稀释的生物素标记山羊抗兔 IgG (H+L) 抗体 (Vector Laboratories, Inc., 1.5mg/ml), 37 °C, 1 小时反应后, 用上述缓冲溶液 2 (2 回), 缓冲溶液 3 (1 回) 洗净后, 再加入 50 μl 的 BHHCT-Eu³⁺ 标记 SA-BSA 溶液, 37 °C, 1 小时反应后, 用缓冲溶液 5 洗 4 次, 然后进行固相时间分辨荧光测定。

3) 测定结果

如图 6 所示,用零浓度时的荧光信号(本底) 的标准偏差(SD)的 3 倍计算 AFP 测定的最低检出下限,得本法的最低检出下限为 1.5×10^{-3} IU/ml (3.6 pg/ml), 与已报道的放射性免疫测定法、酶标记免疫测定法相比,本发明的方法其测定灵敏度要比已有的方法高 2-3 个数量级。

表 3 给出了该法测定血清样品中 IgE 的精密度。由表可见,该法的相对标准偏差不大于 7 %, 平均小于 5 %, 说明该法具有较高的精密度。

表 3 人血清样品中 IgE 测定的精密度

浓度(IU/ml)	SD (n = 4)	CV (%)
0.72	0.031	4.45
2.38	0.14	6.00
6.36	0.074	1.16
27.4	1.16	4.25
32.3	1.47	4.56
127.7	8.32	6.52

表 4 给出了该法测定 IgE 血清样品的添加回收率, 其范围在 85-105% 内, 满足一般微量分析的要求。

表 4 标准 IgE 溶液加入血清样品中的回收率测定结果

加入量(IU/ml)	测得量(IU/ml)	回收率(%)
0.00	0.55	----
2.40	2.65	87.5
0.00	0.94	----
2.40	3.02	86.8
0.00	14.0	----
3.47	17.5	102.0
0.00	23.3	----
3.47	26.7	99.0

实施例 6

使用 BHHCT-Eu³⁺标记 SA-BSA 的时间分辨荧光免疫测定法测定人血清中的胰岛素(简称 Ins)

1) 生物素标记小鼠抗人 Ins 抗体的制备

1.3 ml 的小鼠抗人 Ins 抗体 (0.3 mg/1.3 ml, International Reagents Co.) 在 4°C, 24 小时对 3L 水两次透析后, 加入 9.4 mg 的 NaHCO₃ 和 3 mg 的 NHS-LC-biotin(Pierce Chemical Co.), 室温搅拌 1 小时后, 4°C 下 24 小时放置。反应液在 4°C, 24 小时对 3L 含有 0.25 g NaN₃ 的 0.1 mol/L NaHCO₃ 水溶液两次透析后加入 5 mg 的 BSA 和 5 mg 的 NaN₃, 放置 -20°C 备用。当用于免疫测定时, 用缓冲溶液 1 稀释 200 倍后使用。

2) 96 微孔板的包被

将小鼠抗人 Ins 单克隆抗体 (International Reagents Co.) 用 0.1 mol/L, pH 值 9.6 的 NaHCO₃ 缓冲溶液稀释后 (10 μg/ml) 的抗体溶液 50 μl 分注于 96 微孔板, 4°C, 24 小时包被后, 用缓冲溶液 2 洗两次, 再用缓冲溶液 3 洗 1 次, 此包被后的微孔板 -20 °C 下可保存 1 个月以上。

3) Ins 的免疫分析测定

用缓冲溶液 4 稀释人 Ins (Sigma) 制得 Ins 标准溶液。将此标准溶液分别 50 μl 注入上述包被后的微孔板, 37 °C, 1.5 小时反应后, 用上述缓冲溶液 2 (2 回), 缓冲溶液 3 (1 回) 洗净。加入 50 μl 生物素标记的小鼠抗人 Ins 单克隆抗体, 37 °C, 1 小时反应后, 用上述缓冲溶液 2 (2 回), 缓冲溶液 3 (1 回) 洗净后, 再加入 50 μl 的 BHHCT-Eu³⁺标记 SA-BSA 溶液, 37 °C, 1 小时反应后, 用缓冲溶液 5 洗 4 次, 然后进行固相时间分辨荧光测定。

4) 测定结果

如图 7 所示, 用零浓度时的荧光信号(本底) 的标准偏差(SD) 的 3 倍计算 Ins 测定的最低检出下限, 得本法的最低检出下限为 31 pg/ml。

实施例 7

使用 BHHCT-Eu³⁺标记 SA-BSA 的时间分辨荧光免疫测定法测定人血清中的前列腺特异抗原(简称 PSA)

1) 生物素标记山羊抗人 PSA 抗体的制备

1.0 ml 的山羊抗人 PSA 抗体 (0.5 mg/ml, OEM Concepts Co.) 在 4°C, 24 小时对 3L 水两次透析后, 加入 8.4 mg 的 NaHCO₃ 和 3 mg 的 NHS-LC-biotin(Pierce Chemical Co.), 室温搅拌 1 小时后, 4°C 下 24 小时放置。反应液在 4°C, 24 小时对 3L 含有 0.25 g NaN₃ 的 0.1 mol/L NaHCO₃ 水溶液两次透析后加入 5 mg 的 BSA 和 5 mg 的 NaN₃, 放置 -20°C 备用。当用于免疫测定时, 用缓冲溶液 1 稀释 300 倍后使用。

2) 96 微孔板的包被

将小鼠抗人 PSA 单克隆抗体 (OEM Concepts Co.) 用 0.1 mol/L, pH 值 9.6 的 NaHCO₃ 缓冲溶液稀释后 (10 μg/ml) 的抗体溶液 50 μl 分注于 96 微孔板, 4°C, 24 小时包被后, 用缓冲溶液 2 洗两次, 再用缓冲溶液 3 洗 1 次, 此包被后的微孔板 -20 °C 下可保存 1 个月以上。

3) PSA 的免疫分析测定

用缓冲溶液 4 稀释人 PSA (Biogenesis Ltd.) 制得 PSA 标准溶液。将此标准溶液分别 50 μl 注入上述包被后的微孔板, 37 °C, 1.5 小时反应后, 用上述缓冲溶液 2 (2 回), 缓冲溶液 3 (1 回) 洗净。加入 50 μl 生物素标记的山羊抗人 PSA 抗体, 37 °C, 1 小时反应后, 用上述缓冲溶液 2 (2 回), 缓冲溶液 3 (1 回) 洗净后, 再加入 50 μl 的 BHHCT-Eu³⁺ 标记 SA-BSA 溶液, 37 °C, 1 小时反应后, 用缓冲溶液 5 洗 4 次, 然后进行固相时间分辨荧光测定。

4) 测定结果

如图 8 所示, 用零浓度时的荧光信号 (本底) 的标准偏差 (SD) 的 3 倍计算 PSA 测定的最低检出下限, 得本法的最低检出下限为 6 pg/ml。

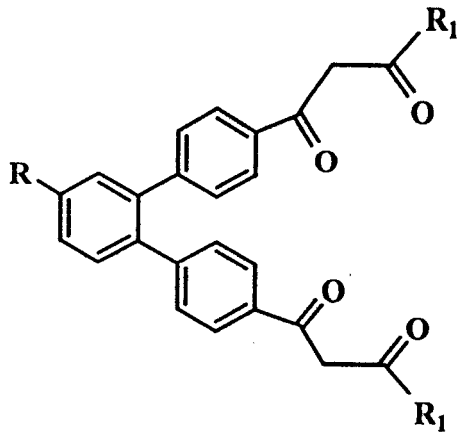


图 1

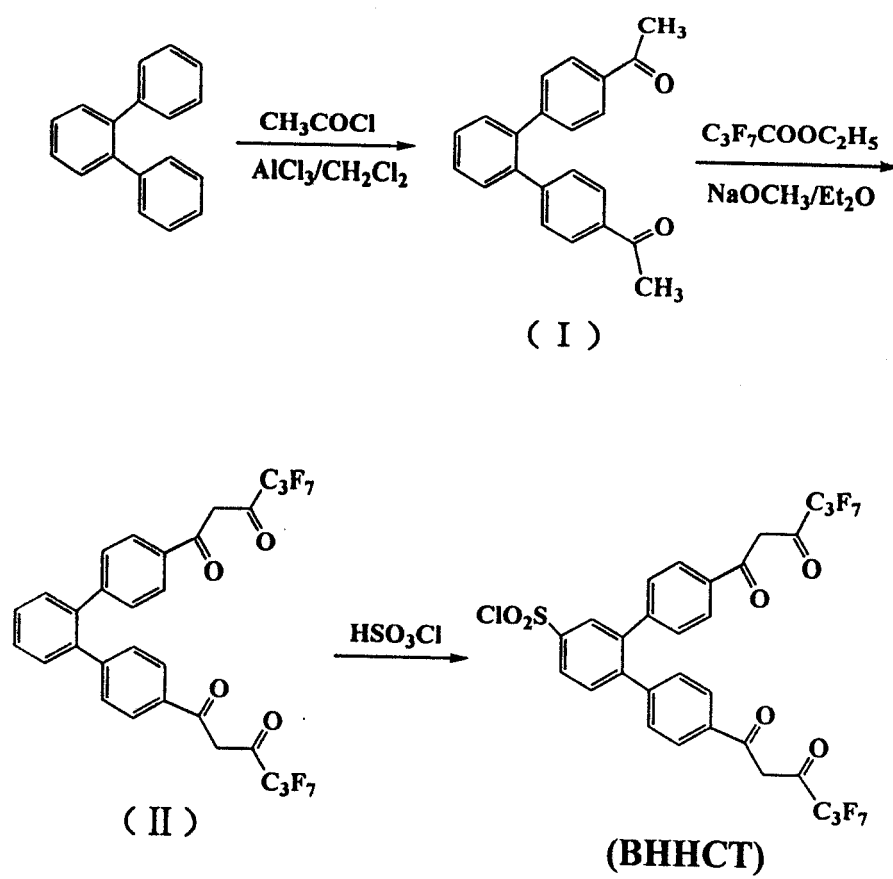


图 2

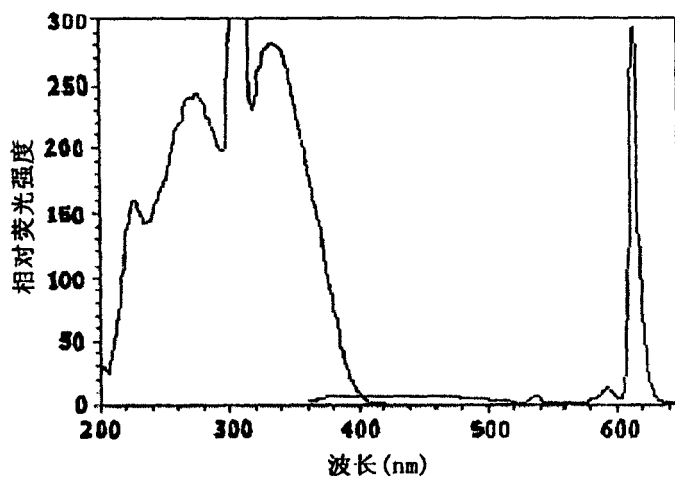


图 3

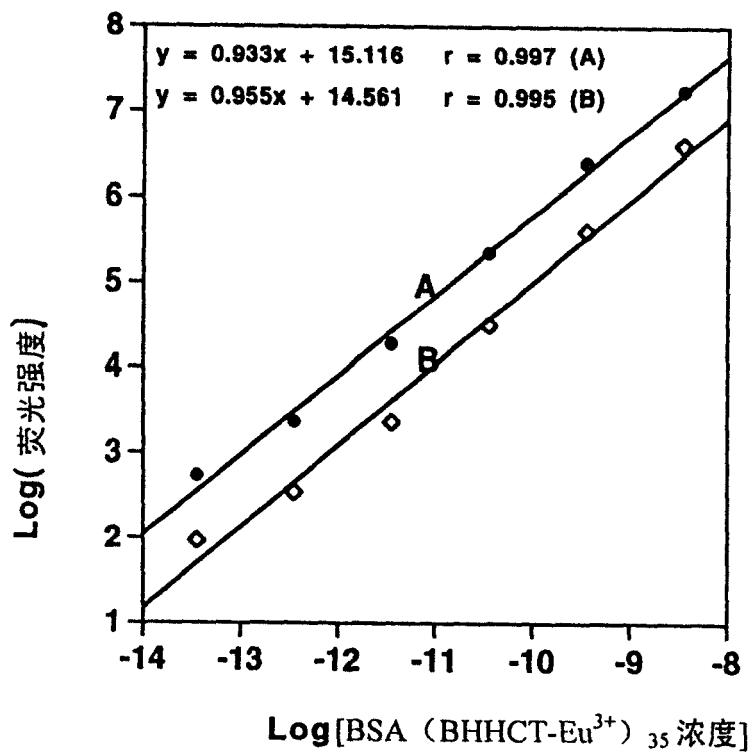


图 4

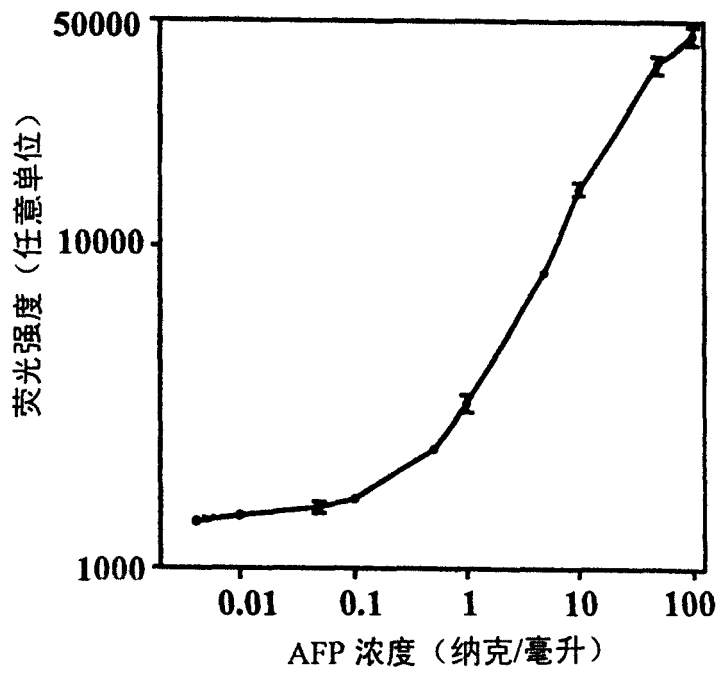


图 5

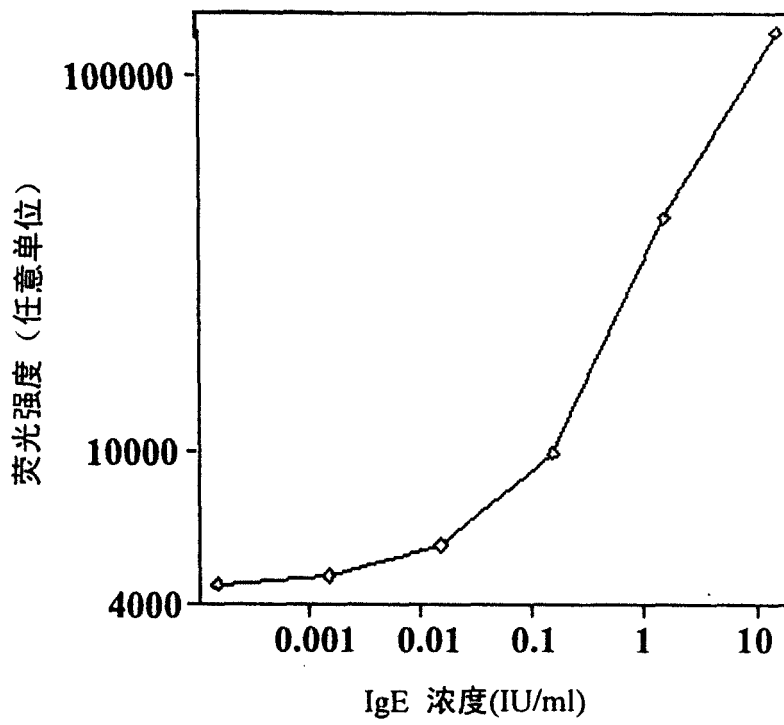


图6

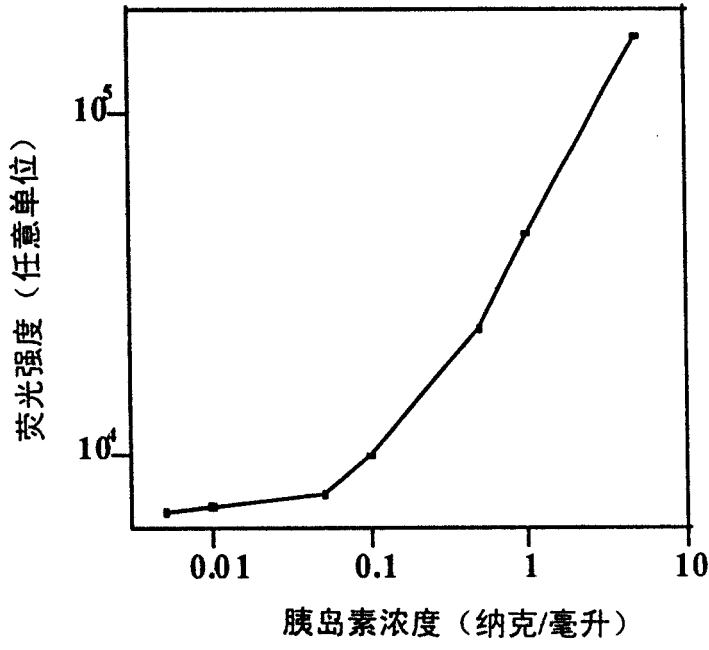


图7

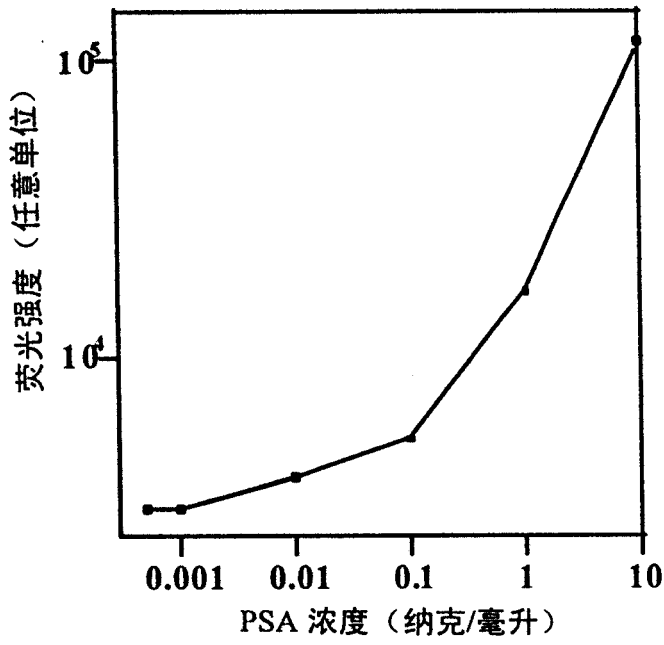


图8

专利名称(译)	三价镧 - β - 二酮荧光标记物及其应用		
公开(公告)号	CN1482459A	公开(公告)日	2004-03-17
申请号	CN02132910.9	申请日	2002-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
[标]发明人	袁景利 王桂兰		
发明人	袁景利 王桂兰		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/68		
代理人(译)	许宗富		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了三价镧 - β - 二酮荧光标记物及其应用，其中四齿 β - 二酮类配位体含有双 β - 二酮基取代邻二苯基苯骨架结构和可与生物分子直接键合的功能性取代基，其 β - 二酮部位和三价镧离子配位后可形成稳定的强荧光性镧配合物。该类配合物可通过其含有的功能性取代基与蛋白质、氨基酸、多肽、核酸、核苷酸、有机化合物等物质共价结合而标记这些物质，进而用于这些物质的时间分辨荧光测定。

