

于炎症粘连等病理改变,可能在手术时造成肝外胆管损伤而术中未及时发现,故术后容易发生胆汁漏及胆汁性腹膜炎。腹腔引流管放置不当也会引起胆汁在腹腔积聚。核素肝胆显像可诊断胆汁漏及淤积的部位。据文献报道,一例女性患者因胆囊炎行单纯胆囊切除术后4天出现黄染、微热,抗炎治疗无效,B超示盆腔少量积液,无明显腹膜刺激症状,急诊行 ^{99m}Tc -E HIDA肝胆动态显像,显示左右肝管扩张,胆囊(切除)、胆总管、肠腔未显影,肝右叶上、膈肌下、肝右叶下、胆囊窝处有明显核素浓聚;当病人体位由卧位到立位时,肝右叶上和胆囊窝处的放射性沿着右侧腹部逐渐向下扩散直到盆腔,下腹部呈现片状核

素浓聚,显像结果确认为胆汁漏。手术探查见胆囊上角处胆汁溢出,腹腔淤积胆汁300ml左右,胆总管横断引起梗阻。

参考文献

- 1 小泉 洁.核医学,1996,33(9):
 - 2 工藤俊 他.画像诊断,1994,14:14-30
 - 3 Nadel H R. Semin Nucl Med, 1996; 26(1): 25-42
 - 4 Shakuntala Krishnamurthys et al. Semin Nucl Med, 1996; 26(1): 16-24
 - 5 多田 明 他.核医学,1984,21:19-26
 - 6 油野民雄 他.核医学,1983,20:253-260
 - 7 长谷川义尚 他.核医学,1983,20:1355-1359
- (收稿日期:1997-09-12)

铽在生物活性分析中的应用

解放军总医院实验仪器中心(北京,100853) 周春喜综述 陈泮藻* 金林培** 王黎明审校

摘要:介绍了铽(Tb^{3+})的理化性质、发光机理及其配体。综述了近年来 Tb^{3+} 在酶放大镧系发光法(EALL)、多标记的时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)、直接固相TRFIA核酸分子杂交分析、生物大分子结构检测等方面的应用。

关键词:铽 时间分辨荧光免疫分析 荧光探针

稀土离子铽(Tb^{3+})的配合物具有独特的荧光性能,在生物化学、分子生物学及临床医学等领域有广泛的应用,其标记技术已成为一项重要的生物技术。本文就近年来的进展作一简要介绍。

1 Tb^{3+} 的有关性质

Tb 在元素周期表中位于III B族,是稀土元素家族的一员。 Tb^{3+} 的电子构型是 $4f^8$,电子间的相互作用和自旋轨道偶合作用,使 Tb^{3+} 的电子能级逐级分裂,产生119个光谱项和295个光谱支项。

Tb^{3+} 属于硬酸型离子,与氧、氮等硬碱有较强的结合能力,与配体的结合力以静电作用力为主,成键方向性不强,主要取决于空间效应。在晶体场作用下, Tb^{3+} 的能级会进一步分裂为许多Starks能级,Starks能级的数目与周围的配位环境有关。因此,其光谱能够提供有关配位环境的信息。

2 Tb^{3+} 络合物的发光原理和荧光特性

处于高能态的 Tb^{3+} 在向低能态发生辐射跃迁时,即可产生荧光。但由于 Tb^{3+} 的 $f \rightarrow f$ 跃迁是禁阻跃迁,其跃迁几率很小,自由

* 解放军总医院生化研究室(北京,100853)

** 北京师范大学化学系(北京,100875)

Tb^{3+} 很难吸收紫外线而跃迁到高能态,所以荧光很弱。当 Tb^{3+} 和有机配体络合时,如果配体的三重态能级和 Tb^{3+} 激发态能级相匹配,则由于“天线效应”(Antenna effect)^[1],配体可以通过分子内能重传递将能量传给 Tb^{3+} 而使之激发到高能态, Tb^{3+} 向低能态跃迁即释放能量产生荧光。

由于 Tb^{3+} 的 4f 电子受外层 5s、5p 电子的屏蔽,其晶体场分裂能受外场的影响很小,因而 Tb^{3+} 的发射光谱带比较锐利,谱带位置也比较固定,随周围化学环境变化不大,一般只有数个纳米。但是,各谱带的相对强度因超灵敏跃迁等原因,对周围环境比较敏感。

Tb^{3+} 络合物荧光具有以下优点:① 激发波长范围宽,有利于能量的吸收;② 发射波长范围窄,荧光特异性强;③ Stokes 位移大,有利于光谱的分辨;④ 荧光寿命长,易于短寿命荧光分开。如果采用时间分辨荧光技术,当光源激发后延迟一段时间,待短寿命衰减后再进行测量,就可以有效地排除由血清成分、试剂、器材等引起的短寿命、非特异本底荧光的干扰,大大提高测量的灵敏度。由于 Tb^{3+} 络合物荧光具有上述优点,因此在荧光分析中有广泛的应用前景。在免疫分析中,稀土离子标记物有取代放射性核素标记和酶标记物的趋势。

3 Tb^{3+} 的配体

3.1 水杨酸衍生物

有些水杨酸衍生物,在协同配体 EDTA 的作用下,可以和 Tb^{3+} 形成强荧光配合物。Britain 等人^[2] 研究了一系列 5-取代的水杨酸(5-XSA, X = -F, -Cl, -Br, -I, -NO₂, -CH₃, -OCH₃, -OSO₃)和 Tb^{3+} 、EDTA 形成的三元配合物 $[Tb(EDTA)(5-XSA)]$ 的荧光性质,发现当 5-XSA 为 5-氟水杨酸和 5-甲基水杨酸时荧光较强。他们还研究了这些三元配合物的荧光强度和荧光寿命与 pH 值的关系,提出了三元配合物的分子内能量传递机理。

该机理认为,在较强的碱性 (pH = 11) 条件下,酚羟基氧通过 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁吸收辐射能并传给 Tb^{3+} 。

Diamandis^[3] 研究了很多与水杨酸结构相似的配体,将其磷酸酯作底物用于酶标记 TRFIA。例如,4-羟基-7-三氟甲基喹啉-3-羧酸磷酸酯 (HTQCAP) 经碱性磷酸酶 (AP) 水解,生成的 4-羟基-7-三氟甲基喹啉-3-羧酸 (HTQCA) 和 $Tb(EDTA)$ 可形成荧光螯合物,因而可作 AP 的底物用于 TRFIA。

3.2 聚氨基多羧酸酐与氨基芳香羧酸加合物

这类配体一端是环状酸酐,可以和生物分子偶联,另一端是芳香羧酸,可以敏化 Tb^{3+} 的荧光。分子中还含有多个氮原子和氧原子,可以和 Tb^{3+} 形成多个螯合环,故能和 Tb^{3+} 牢固结合。

Shi 等^[4] 用二乙三胺五乙酸酐 (DTPAA)、乙二胺四乙酸酐 (EDTAA) 与对氨基水杨酸 (pAS)、对氨基苯甲酸 (pAB) 反应制得 DTPA-pAS、EDTA-pAS、DTPA-pAB、EDTA-pAB,研究了这些配体与 Tb^{3+} 形成的络合物的荧光性质,并用 Tb^{3+} -DTPA-pAS 作标记物测定了人血清白蛋白 (HSA)。

有些氨基芳香酸(如 5-氨基间苯甲酸、3-氨基邻苯二甲酸、4-氨基邻苯二甲酸、5-氨基水杨酸、间氨基苯甲酸等)与 DTPAA 生成的配体,和 Tb^{3+} 形成的螯合物荧光不强,但荧光寿命很长^[5]。

3.3 β -二酮配体

这类配体中有的能和 Tb^{3+} 形成具有强荧光的络合物,如 β -萘酰三氟丙酮 (β -NTA) 和噻吩甲酰三氟丙酮 (TTA),但这些络合物在低浓度时不稳定,也难于和生物分子偶联,故常用来配制增强液。不过经过修饰,也可以用作标记试剂,如 Ci 等^[6] 用 ClSO₃ 和 TTA 反应制得 5-氯磺酰基-2-噻吩甲酰三氟丙酮 (CTTA),他们用 CTTA 标记并测定了白蛋

白 (HSA BSA)。

新戊酰三氟丙酮 (PTA) 和 Tb^{3+} 形成的络合物有较强的荧光, 可用作 Tb^{3+} 标记的荧光增强液。其配方为: 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH=4.5) 中含 50 μ mol/L PTA, 50 μ mol/L 三正辛基氧化膦 (TOPO) 和 0.2% Triton X-100。

3.4 聚氨基多羧酸类配体

这类配体含有多个氮原子和氧原子, 与 Tb^{3+} 有很强的结合力, 再加上螯合效应, 结合更加牢固。如果在其上引入一个能和生物分子反应的官能团, 使之既能和 Tb^{3+} 结合, 又能和生物分子偶联, 那么就可以用于 Tb^{3+} 的标记。但这类配体和 Tb^{3+} 形成的配合物荧光不强, 使其应用受到限制。常用的这类配体有: 异硫氰酸苯-EDTA, 对重氮苯-EDTA, N^1 -(对-异硫氰基苄基)-DTTA, DTPAA 等。

4 Tb^{3+} 的应用

4.1 酶放大时间分辨荧光免疫分析

有些配体, 它本身和 Tb^{3+} 形成的配合物荧光不强, 但在某些酶的作用下, 经过适当修饰后形成的新配体和 Tb^{3+} 生成的配合物具有很强的荧光。根据这一现象, Guilblyt 建立了 EALL。这种方法结合了酶的放大作用和镧系元素荧光的高特异性, 可用于酶放大的时间分辨荧光分析, 也可用于酶标记分析。如 Yu 等^[7] 根据该法用碱性磷酸酶测定了人血清前列腺特异抗原 (PSA), 最低检测限可达 0.002 mg/L, 对早期监测前列腺癌术后的复发或残留有重要临床意义。

除了碱性磷酸酶外, 还有些酶也可用于 EALL^[8]。比如, β 半乳糖苷酶可以水解水杨酰 β 半乳糖苷成水杨酸, 黄质氧化酶可以氧化水杨醛成水杨酸。因此, 如果用 5-氟水杨酰 β 半乳糖苷和 5-氟水杨醛作底物, 就可以分别建立 β 半乳糖苷酶和黄质氧化酶的 EALL。

4.2 多标记 TRFIA

在免疫分析和细胞活性分析中, 常需要在一份样品中同时测定两种或两种以上的待测物。为达此目的, 需用不同的稀土离子分别标记多种抗原, 但由于各种稀土离子的能级结构不同, 很难找到一种能和多种稀土离子能级匹配的配体, 因此, 一般只限于 Tb^{3+} 和 Eu^{3+} 、 Eu^{3+} 和 Sm^{3+} 的双标记。在 1992 年, Xu 等^[9] 研究出共荧光增强液 (CFFS), 能同时增强 Tb^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Dy^{3+} 四种离子的荧光。由于这四种离子的最大发射峰分别位于 544、647、612 和 574 nm, 延迟时间分别是 323 μ s、88 μ s、820 μ s 和 27 μ s, 用这四种离子分别标记四种抗原或抗体, 发生免疫反应后加入增强液, 利用其最大峰位置及延迟时间的不同, 可以逐个测定其荧光。他们用该法进行促甲状腺素 (TSH)、17 α -羟孕酮 (17 α -OHP)、免疫反应胰蛋白酶 (IRT)、激酶 MM (CK-MM) 等四种样品的同时测定^[10], 检测限分别为 0.1 mU/L、2 nmol/L、2 μ g/L、4 U/L。

4.3 直接固相时间分辨荧光免疫分析

用 DTPA-pAS 类配体作标记物, 可以建立直接固相时间分辨荧光免疫分析: 在三乙胺存在下, 先让 DTPAA 和等摩尔的对氨基水杨酸钠 (pASNa) 在无水 DMSO 中反应, 生成 DTPA-pAS, 然后和 SA (或抗体) 反应, 即可制得 SA-DTPA-pAS, 在免疫完成后, 加入 Tb^{3+} , 使 Tb^{3+} 与 SA 上的 DTPA-pAS 形成荧光复合物, 测量其荧光即可。该法的优点是: ① SA-DTPA-pAS 可作为通用标记物; ② 不用加增强液, 不受环境中稀土离子的干扰。

4.4 核酸分子杂交分析

可以用 EDTA-pAS、DTPA-pAS 标记目的基因片段, 经杂交反应后加入 Tb^{3+} 再测定。也可以用碱性磷酸酶标记目的基因片段, 杂交反应后加入 5-FSAP, 水解后加入 Tb^{3+} -EDTA 再测定。和 Eu^{3+} 标记杂交探针相比, 该法虽然灵敏度较低, 但不需要加增强液, 不受环境中稀土离子的干扰, 如 Saavedra 等^[11] 用 DTPA-pAS- Tb^{3+} 标记了 DNA。先让 DT-

PAA和等摩尔的对氨基水杨酸钠在无水DM SO中反应,然后与寡核苷酸反应

还可以利用一对标记的寡核苷酸探针与靶DNA同时进行双位点杂交^[12]。原理是:在一个寡核苷酸上连接pAS,而在另一寡核苷酸上连接DTPA-Tb³⁺,前者作为能量给体,后者作为能量受体。一旦pAS接受激发能并将其传递给DTPA-Tb³⁺,Tb³⁺即可发射特征波长的长寿命荧光,可用时间分辨荧光仪记录下来。因为只有同时和两个探针杂交的DNA才会产生信号,所以检测的特异性好。

4.5 生物大分子结构研究

Tb³⁺用作生物大分子结构探针,是基于下列原因:①很多大分子和Tb³⁺有较强的亲和力,Tb³⁺能够取代并占据生物大分子中金属离子的位置;②Tb³⁺具有光谱学活性,很多含有酪氨酸残基等芳香族基团的生物大分子和Tb³⁺结合后可敏化Tb³⁺的荧光^[13],而且不同的大分子或同一大分子的不同结合部位对Tb³⁺有不同的荧光敏化作用,这些信息有助于判断生物大分子的结合金属离子的部位数,各结合部位是否等同,哪些是强结合部位和弱结合部位等等;③Tb³⁺和Ca²⁺、Mg²⁺等金属离子性质相近,这有利于Tb³⁺取代这些离子后较好地保留生物分子原有的功能和结构,从而可利用Tb³⁺探针研究含Ca²⁺、Mg²⁺等离子的生物大分子的结构

关于Tb³⁺在生物大分子结构研究中的应用,杨斌盛等(1989年)已作过综述

4.6 时间分辨荧光细胞活性分析

这是一种非放射性的细胞活性测量技术,其原理是:经三价稀土离子标记的靶细胞,在效应细胞的作用下,发生细胞破裂,用TRFIA技术测定靶细胞所释放的三价稀土离子的荧光强度,从而确定细胞活力。

以前多用Eu²⁺络合物标记靶细胞。1994年,Lovegren等^[14]推出Tb³⁺标记靶细胞新

方法,即先让Tb³⁺和6,6'-双[N,N-双(羧甲基)氨基甲基]-4'-苯-2,2';6',2'-三吡啶(简称CAPT)形成络合物Tb³⁺-CAPT,再用它标记靶细胞。其主要过程如下:将靶细胞悬浮于完全介质(又称A液)中培养,在细胞的指数生长期,加入1~10mmol/LTb³⁺-CAPT,接着加入100μl含硫酸葡聚糖5g/L的A液,置室温孵育,然后加入3ml含2mmol/LCa-Cl₂,10mmol/L葡萄糖A液,继续保温5分钟以上,以便修复靶细胞和终止标记反应。用A液培养2~4小时,离心,取上清液用时间分辨荧光仪测量其荧光强度(CPS)。根据公式计算靶细胞的比释放率,即表示细胞的活性

目前还可以对一种效应细胞的两株不同的靶细胞,分别采用Tb³⁺-CAPT和Eu³⁺-CAPT进行双标记,以同时测定效应细胞对两种靶细胞的活性^[14]。

参 考 文 献

- 1 Sabbatini N et al. *Coord Chem Rev*, 1993; 123: 201
- 2 Britian HG et al. *Inorg Chem Acta*, 1985; 110: 35
- 3 Diamandis E P. *Analyst*, 1992; 117: 1879
- 4 Shi HH et al. *J Alloys Comp*, 1994; 207/208: 29
- 5 Bailey MP et al. *Analyst*, 1985; 110: 603
- 6 Ci YX et al. *J Immunol Methods*, 1995; 179: 233
- 7 Yu H et al. *Clin Chem*, 1993; 39(10): 2108
- 8 Evangelista RA et al. *Anal Biochem*, 1991; 197: 213
- 9 Xu YY et al. *Anal Chim Acta*, 1992; 256: 9
- 10 Xu YY et al. *Clin Chem*, 1992; 38(10): 2038
- 11 Saavedra SS, Picozza EG. *Analyst*, 1989; 114: 835
- 12 Oser A et al. *Anal Biochem*, 1990; 191: 295
- 13 Ringer DP et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; 168(1): 267
- 14 Lovgren J et al. *J Immunol Methods*, 1994; 173: 119

(收稿日期: 1996-10-30)