

时间分辨荧光分析技术的研究进展及应用

周伟玲 赵启仁

【摘要】 时间分辨荧光分析 (TRFA) 技术是一种以镧系元素螯合物为标记物, 测量其发射荧光的超灵敏的无放射性污染的标记分析技术, 在生物分析中得到了广泛的应用。在近些年, 研究发展了酶放大时间分辨荧光分析、时间分辨猝灭分析和分子信标等分析系统, 其灵敏度更高, 满足了不同的需求, 使 TRFA 技术在临床诊断和科学研究中得到了更广泛的应用。

【关键词】 荧光免疫测定; 稀土元素; 荧光共振能量转移

【中图分类号】 R446.62 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)02-0103-04

The development and application of time-resolved fluorescence assay

ZHOU Wei-ling, ZHAO Qi-ren

(Department of Experimental Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

【Abstract】 Time-resolved fluorescence assay is a new nonisotopic and ultrasensitive detection method of using lanthanide chelate as detectable label and detect lanthanide chelate fluorescence, having a great prospect. In recent years, a serial of assay systems have been developed quickly and have more sensitivity, such as enzyme-amplified time-resolved fluorescence assay, time-resolved quenching assay and molecular beacon. They fit for more different requirement, and have been gotten a broader application in clinical diagnosis and science research.

【Key words】 Fluoroimmuno assay; Lanthanide series elements; Fluorescence resonance energy transfer

由于放射性核素标记分析技术的某些局限性, 限制了其进一步发展应用, 近些年来, 非同位素标记分析技术应运而生。非同位素标记分析技术主要有酶标记分析技术、发光分析技术、荧光分析技术和时间分辨荧光分析 (time-resolved fluorescence assay, TRFA) 技术, 而 TRFA 技术被公认为最有发展前途的一种非同位素标记分析技术。

1 TRFA 技术的原理及特点

TRFA 技术是以镧系元素螯合物为标记物, 同时利用波长分辨和时间分辨两种测量技术, 有效排除非特异荧光, 以时间分辨技术测量特异荧光, 对待检物质进行定量分析。

TRFA 技术的许多优点是来自镧系元素螯合物的固有特点。镧系离子被适宜的紫外光吸收配位体

螯合形成螯合物, 受到紫外光、氮激光或氙灯等光源的激发而发射荧光时, 有以下特点^[1,2]:

(1) 激发光与发射光之间的 Stokes 位移大, 易利用干涉滤光片进行波长分辨, 前者的散射光对后者的干扰可以基本排除。

(2) 激发光谱带较宽, 可以增加激发能, 提高灵敏度。

(3) 发射光谱带很窄, 50%发射谱带约为 10nm, 可以利用通带滤光片, 只允许峰值波长 ± 5 nm 谱段通过供测量, 在如此窄的谱段内, 非特异荧光很少, 可有效降低本底荧光, 且能量损失也不大。

(4) 镧系离子螯合物的荧光寿命很长, 约 1ms, 在时间分辨荧光仪上测量时, 脉冲光源激发后, 可适当延迟一段时间, 待其他短半衰期(1~10ns)的非特异荧光完全衰变后再测量, 从而极大地降低了本底荧光, 实现了时间分辨, 灵敏度大大提高。

(5) 镧系离子由激发态跃迁到基态时发射荧光, 在测量时间内可反复激发镧系离子, 相当于大大提高了标记比活性。

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目(043610211)

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院 中国协和医科大学放射医学研究所实验核医学室

通讯作者: 周伟玲 (E-mail: zwling@gmail.com)

此外, TRFA 技术的分析动态范围宽, 可达 4~5 个数量级; 标记物制备简单, 稳定性好, 有效使用时间长, 不受半衰期影响; 标记蛋白质时反应条件温和, 蛋白质活性受损少; 测量快速, 易于自动化。

2 TRFA 技术的主要分析系统

自 1983 年 Pettersson 等和 Eskola 等先后报告了用 TRFA 技术测定人绒毛膜促性腺激素和胰磷脂酶 A₂ 在临床医学研究中的应用以来, TRFA 技术获得迅速发展, 形成了几种主要分析系统^[1]。

(1) 解离增强镧系元素荧光分析系统: 它利用双功能螯合剂把镧系离子标记在抗原、抗体或探针上, 在免疫反应或核酸杂交反应完成后, 低 pH 条件下加入增强液, 使镧系离子解离下来, 并与增强液中的另一种螯合剂形成高荧光产额的螯合物, 在液相下测量荧光。其核心是把镧系离子的标记和荧光测量分开处理, 以实现最优化^[1,2]。

(2) FIAgen 分析系统 (Cyber Fluor 公司): 它利用一种新的双功能螯合剂 4, 7-双(氯磺酰基苯基)-1,10-菲咯啉-2, 9-二羧酸, 并把生物素-亲和素系统引入 TRFA 系统, 实现生物放大。其核心是去掉解离增强步骤, 并可以在固相下测量荧光^[1,2]。

(3) 酶放大 TRFA (enzyme-amplified TRFA, EATRFA) 系统: 在该系统中碱性磷酸酶作用于 5-氟水杨酸磷酸酯生成 5-氟水杨酸, 5-氟水杨酸可以与发展溶液中的铽三价离子 (Tb³⁺) 和乙二胺四乙酸在 pH 12~13 时形成 5-氟水杨酸:Tb³⁺: 乙二胺四乙酸三元复合物, 在激发光源激发下, 能发射高产额长寿命的荧光。其核心是把生物素-链霉亲和素的高亲和力和放大作用、酶放大作用、镧系元素螯合物的优点与时间分辨测量技术结合, 不用增强液, 在液相下测量荧光^[3-5]。

(4) 均相 TRFA (homogeneous TRFA, HTRFA) 系统: 该系统的建立是基于时间分辨荧光共振能量转移 (time-resolved fluorescence resonance energy transfer, TR-FRET) 理论^[6]。FRET 理论是指一对合适的荧光物质可以构成一个能量供体 (donor) 和能量受体 (acceptor) 对, 当两个荧光发色基团在足够靠近时, 供体分子吸收一定频率的光子后被激发到更高的电子能态, 在回到基态前, 通过偶极间相互作用, 实现能量向邻近的受体分子转移。Eu³⁺-三-2,2'-二吡啶二胺 [Eu³⁺-tris bipyridine diamine, TBP

(Eu³⁺) 和别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 这个能量供体/受体对是迄今发现的能量转移效率最高的配对。测量前不必分离结合标记物和游离标记物, 可直接测量液相或固相中的荧光强度, 具有快速、方便等优点^[6]。但需要双波长测量时间分辨荧光仪。

3 TRFA 系统的研究进展

3.1 EATRFA 系统

Steinkamp 等^[7]发现了新的增敏剂双(2-吡啶基甲基)-(2-羟基苄基)胺, 该增敏剂能将其激发能量传递至镧系三价离子, 用于 EATRFA 测定猪肝细胞酯酶活性, 其灵敏度可达 10⁻⁹mol/L。

3.2 二次 EATRFA 系统

Ioannou 等^[8]在 EATRFA 技术基础上又提出二次 EATRFA 系统, 本方法使用了辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶两种酶进行放大作用, 两次生物素-链霉亲和素的亲和放大作用, 增加放大倍数, 提高分析灵敏度。此系统的特异信号可增加 30 倍, 信/噪比可改进 10 倍, 灵敏度可达 3×10⁻¹⁶mol/L。

3.3 时间分辨猝灭分析技术

该技术的建立也是基于 FRET 理论, 只是其受体基团是荧光猝灭基团。Karvinen 等^[9,10]使用该技术进行了 caspases 活性测定: 将镧系离子螯合物及荧光猝灭基团分别标记在待检 caspases 相应底物上的 caspases 作用位点两侧, caspases 没有作用于底物时, 激发光激发后, 因为荧光猝灭基团的存在且距离足够近, 发生荧光猝灭, 没有荧光可供检测; 当 caspases 作用于底物后, 荧光猝灭基团脱离, 激发光激发时, 镧系离子螯合物可以发射供测量荧光, 然后可对 caspases 活性进行计算定量。Karvinen 等^[11]也建立了多标记测量时间分辨猝灭分析技术。

Ylikoski 等^[12]将该技术应用于核酸杂交分析: 使用双链 DNA 探针, 其中一条单链 5'端标记镧系离子螯合物, 另一条单链 3'端标记有荧光猝灭基团, 当标记有镧系离子螯合物的单链与靶基因结合后, 游离的单链与标记有荧光猝灭基团的单链结合, 减小了背景荧光, 提高了灵敏度。此法主要应用于检测 PCR 产物。

3.4 纳米颗粒在 TRFA 中的应用

近年来, 纳米颗粒被应用到 TRFA 技术中。每个纳米颗粒可以容纳数千镧系离子螯合物, 这样可以提高标记比活性。在 HTRFA 中, 使用纳米颗粒

技术, 激发光激发时, 大量增加的镧系离子螯合物作为能量供体将能量传递给能量受体, 传递的能量增加, 激发的荧光强度也相应增加^[13, 14]。Harma 等^[13]用此技术测量了前列腺特异抗原。Kokko 等^[14]使用钆螯合物标记纳米颗粒作为均相免疫分析中的能量供体检测了雌二醇。

3.5 分子信标(molecular beacon)技术

分子信标是根据核酸碱基配对原则和 FRET 理论设计的^[15]。分子信标为一段与特定核酸互补的寡核苷酸探针, 在空间结构上呈茎环结构, 其中环序列是与靶核酸互补的探针, 茎则由与靶序列无关的互补序列构成, 茎的一端连上一个荧光分子, 另一端连上一个猝灭分子。当无靶序列存在时, 分子信标呈茎环结构, 茎部的荧光分子与猝灭分子非常接近(7~10 nm), 即可发生 FRET, 荧光分子发出的荧光被猝灭分子吸收并以热的形式散发, 此时检测不到荧光信号; 当有靶序列存在时, 分子信标的环序列与靶序列特异性结合, 形成的双链体比分子信标的茎环结构更稳定, 荧光分子与猝灭分子分开, 此时荧光分子发出的荧光不能被猝灭分子吸收, 可检测到荧光^[15]。Root 等^[16]用镧系离子螯合物作为荧光标记分子进行了 HTRFA。

3.6 实时荧光定量 PCR 技术

实时荧光定量 PCR 技术是一种在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[17]。Nurmi 等^[18]用镧系元素标记探针和双温杂交分析技术进行了实时定量 RT-PCR 反应, 测量了前列腺特异抗原的 mRNA, 实验中使用了两种探针: 探针 1 与模板 mRNA 的 5' 端碱基互补, 该探针 5' 端由荧光报告基因镧系离子螯合物标记, 且在其 3' 端加入不与模板 mRNA 互补的两种碱基, 以避免这种探针在 RT-PCR 反应过程中起模板作用; 探针 2 与探针 1 碱基互补, 且 3' 端标记荧光猝灭基团; 两种探针杂交形成的双链结构的熔点温度低于 50 °C, 在 61 °C 时不干涉探针 1 与模板 cDNA 的杂交。测量时模板 mRNA、PCR 引物和探针 1 于 95 °C 变性, 退火至 61 °C, 反应体系中过量的引物和探针 1 分别与模板 mRNA 局部杂交。选用具有 5'→3' 外切酶活性的 DNA 合成酶, 催化以引物为起始点的 5'→3' 的 cDNA 链延伸反应, 并消化结合于模板 5' 端的探针 1, 每合成一条新链就

会消化一条探针 1 而且释放出一个镧系离子螯合物, 游离的镧系离子螯合物的荧光强度远远高于结合在单链探针上的镧系离子螯合物的荧光强度。RT-PCR 反应结束后, 温度冷却到 35 °C 时, 探针 2 与过量的探针 1 杂交, 使结合在探针 1 上的镧系离子螯合物发生荧光猝灭, 不能被仪器检测, 降低了背景荧光, 提高信/噪比。在该温度测量镧系离子螯合物荧光强度, 经校正计算后可得初始模板的数量^[18, 19]。

3.7 其他进展

Wu 等^[20]报道, 利用银纳米结构可大幅度增强镧系离子荧光强度, 同时荧光寿命有显著降低, 有可能用于发展新型的具有特殊光谱特征的镧系离子标记探针。这种探针拥有更高的标记比活性, 由于镧系离子荧光寿命降低, 在同样时间内, 可以大大增加荧光激发次数。

Kemper 等^[21]报道了一种新型蛋白质染料 Sypro Rose Plus Protein Blot Stain, 这是一种中等灵敏度的染料, 可以对硝酸纤维素或聚偏二氟乙烯转膜蛋白质染色, 对蛋白质没有共价修饰, 可被 254 nm、302 nm 或 365 nm 的紫外光激发, 在 612 nm 有最大发射峰, 可用 TRFA 技术或质谱分析技术检测。其缺陷是对核酸也可以像对蛋白质一样进行染色。

4 TRFA 技术的应用

4.1 蛋白质定量分析

Albrecht 等^[22]利用生物素-链霉亲和素的高亲和力将 Eu³⁺ 标记 β-淀粉样蛋白分泌抑制因子的单克隆抗体来测量稳定转染的人神经胶质瘤细胞系 H4 细胞分泌的 β-淀粉样蛋白分泌抑制因子。Claret 等^[23]测量了组胺。Enomoto 等^[24]使用 HTRFA 技术测量了 NK3.3 细胞分泌的人白细胞介素-13。

4.2 酶活性的检测

Gabourdes 等^[6]用 HTRFA 技术测量了端粒酶活性。Ferrer 等^[25]利用该分析系统高效检测羧肽酶 B 活性。Karvinen 等^[11]利用多标记时间分辨猝灭分析技术实现了对 caspases 家族多参数活性检测。

4.3 基因分析

Nurmi 等^[26]使用镧系离子螯合物标记等位基因特异探针来筛选新的基因标志。Root 等^[16]利用分子信标技术和 HTRFA 技术检测单个核苷酸变异。

4.4 蛋白质相互作用研究

Moore 等^[27]用该技术筛选新的肿瘤坏死因子受

体及配体。Maurel 等^[28]报道, 使用 HTRF 检测肝细胞表面膜蛋白之间的相互作用, 灵敏度很高, 且重复性好。Zhou 等^[29]报道了利用 TR-FRET 分析系统测量核受体激活系统。

TRFA 技术优点突出, 研究工作活跃, 发展迅速, 应用日益广泛。国外已有多种商品化试剂推出, 在国内也正逐步研发推出检验试剂盒。随着生物技术的发展和对微量检测要求的提高, 具有多种特殊优点的 TRFA 技术将在更多领域内得到应用和发展。

参 考 文 献

- 1 赵启仁. 时间分辨荧光免疫分析及其应用前景. 国外医学·放射医学核医学分册, 1992, 16(4): 182-188.
- 2 沈健, 林德球, 徐杰. 时间分辨荧光免疫分析技术研究现状及进展. 生命科学, 2004, 16(1): 55-59.
- 3 Steinkamp T, Karst U. Detection strategies for bioassays based on luminescent lanthanide complexes and signal amplification. Anal Bioanal Chem, 2004, 380(1): 24-30.
- 4 Campbell CN, Gal D, Cristler N, et al. Enzyme-amplified amperometric sandwich test for RNA and DNA. Anal Chem, 2002, 74(1): 158-162.
- 5 Meyer J, Karst U. Enzyme-linked immunosorbent assays based on peroxidase labels and enzyme-amplified lanthanide luminescence detection. Analyst, 2001, 126(2): 175-178.
- 6 Gabourdes M, Bourguin V, Mathis G, et al. A homogeneous time-resolved fluorescence detection of telomerase activity. Anal Biochem, 2004, 333(1): 105-113.
- 7 Steinkamp T, Schweppe F, Krebs B, et al. A tripod ligand as new sensitizer for the enzyme amplified lanthanide luminescence determination of esterase. Analyst, 2003, 128(1): 29-31.
- 8 Ioannou PC, Christopoulos TK. Two-round enzymatic amplification combined with time-resolved fluorometry of Tb³⁺ chelate for enhanced sensitivity in DNA hybridization assay. Anal Chem, 1998, 70(4): 698-702.
- 9 Karvinen J, Hurskainen P, Gopalakrishnan S, et al. Homogeneous time-resolved fluorescence quenching assay (LANCE) for caspase-3. J Biomol Screen, 2002, 7(3): 223-231.
- 10 Karvinen J, Laitala V, Mäkinen ML, et al. Fluorescence quenching based assays for hydrolyzing enzymes. application of time resolved fluorometry in assays of caspase, helicase and phosphatase. Anal Chem, 2004, 76(5): 1429-1436.
- 11 Karvinen J, Elomaa A, Mäkinen ML, et al. Caspase multiplexing: simultaneous homogeneous time-resolved quenching assay (Tru-Point) for caspases 1, 3, and 6. Anal Biochem, 2004, 325(2): 317-325.
- 12 Ylikoski A, Elomaa A, Ollikka P, et al. Homogeneous time-resolved fluorescence quenching assay (TruPoint) for nucleic acid detection. Clin Chem, 2004, 50(10): 1943-1947.
- 13 Harma H, Soukka T, Lovgren T, et al. Europium nanoparticles and time-resolved fluorescence for ultrasensitive detection of prostate-specific antigen. Clin Chem, 2001, 47(3): 561-568.
- 14 Kokko L, Sandberg K, Lovgren T, et al. Europium (III) chelate-dyed nanoparticles as donors in a homogeneous proximity-based immunoassay for estradiol. Anal Chim Acta, 2004, 503: 155-162.
- 15 Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nat Biotech, 1996, 14(3): 303-308.
- 16 Root DD, Vaccaro C, Zhang Z, et al. Detection of single nucleotide variations by a hybridization proximity assay based on molecular beacons and luminescence resonance energy transfer. Biopolymers, 2004, 75(1): 60-70.
- 17 欧阳松应, 杨冬, 欧阳红生, 等. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用. 生命的化学, 2004, 24(1): 74-76.
- 18 Nurmi J, Wikman T, Karp M, et al. High-performance real-time quantitative RT-PCR using lanthanide probes and a dual-temperature hybridization assay. Anal Chem, 2002, 74(14): 3525-3532.
- 19 Rudi K, Moen B, Dromtorp SM, et al. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(2): 1018-1024.
- 20 Wu M, Lakowicz JR, Geddes CD. Enhanced lanthanide luminescence using silver nanostructures: opportunities for a new class of probes with exceptional spectral characteristics. J Fluoresc, 2005, 15(1): 53-59.
- 21 Kemper C, Berggren K, Diwu Z, et al. An improved, luminescent europium-base stain for detection of electroblotted proteins on nitrocellulose or polyvinylidene difluoride membranes. Electrophoresis, 2001, 22(5): 881-889.
- 22 Albrecht H, Zbinden P, Rizzi A, et al. High throughput screening of beta-amyloid secretion inhibitors using homogeneous time-resolved fluorescence. Comb Chem High Throughput Screen, 2004, 7(8): 745-756.
- 23 Claret EJ, Ouled-Diaf J, Seguin P. Homogeneous time resolved fluorescence assay to measure histamine release. Comb Chem High Throughput Screen, 2003, 6(8): 789-794.
- 24 Enomoto K, Araki A, Nakajima T, et al. High-throughput miniaturized immunoassay for human interleukin-13 secreted from NK3.3 cells using homogeneous time-resolved fluorescence. J Pharm Biomed Anal, 2002, 28(1): 73-79.
- 25 Ferrer M, Zuck P, Kolodin G, et al. Miniaturizable homogeneous time-resolved fluorescence assay for carboxypeptidase B activity. Anal Biochem, 2003, 317(1): 94-98.
- 26 Nurmi J, Kiviniemi M, Kujanpää M, et al. High-throughput genetic analysis using time-resolved fluorometry and closed-tube detection. Anal Biochem, 2001, 299(2): 211-217.
- 27 Moore KJ, Turconi S, Miles-williams A, et al. A homogeneous 384-well high throughput screen for novel tumor necrosis factor receptor: ligand interactions using time resolved energy transfer. J Biomol Screen, 1999, 4(4): 205-214.
- 28 Maurel D, Kniazeff J, Mathis G, et al. Cell surface detection of membrane protein interaction with homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer technology. Anal Biochem, 2004, 329(2): 253-262.
- 29 Zhou G, Cummings R, Hermes J, et al. Use of homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer in the measurement of nuclear receptor activation. Methods, 2001, 25(1): 54-61.

(收稿日期: 2005-06-13)