

核技术及其在生物医学中的应用丛书

# 时间分辨荧光分析 技术与应用

李振甲 陈泮藻 编著  
高平 颜光涛  
科学出版社

核技术及其在生物学中的应用丛书

# 时间分辨荧光分析 技术与应用

李振甲 陈泮藻 编著  
高平 颜光涛

科学出版社

1996



增刊

(京)新登字 092 号

## 内 容 简 介

时间分辨荧光分析技术是以稀土离子标记抗原或抗体等而建立的一种超微量检测技术。本书比较全面地介绍了这一技术。全书共 8 章,内容除概述了基本原理、稀土离子标记技术、抗原提取、抗体制备与纯化、时间分辨荧光测量外,还具体介绍了蛋白质、多肽、小分子、DNA 探针、药物、细胞活性等的时间分辨荧光分析方法实例。

可供生物化学、生理学、免疫学、医学检验及生物医学研究工作者参考。

核技术及其在生物医学中的应用丛书  
**时间分辨荧光分析技术与应用**

李振甲 陈泮藻  
高 平 颜光涛 编著

责任编辑 王爱琳

**科 学 出 版 社 出 版**

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

香河县第二印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1996年3月第一版 开本:787×1092 1/32

1996年3月第一次印刷 印张:7 3/4

印数:1—1500 字数:164 000

ISBN 7-03-005003-7/Q·613

定 价: 17.80 元

## 序 言

核技术的应用是医学生物学现代化的重要标志之一。国际原子能机构的一份公报指出：“从对技术影响的广度而论，可能只有现代电子学和数据处理才能与同位素相比。”同位素在生物医学中的应用尤其广泛。一方面，它深入到实验医学的各个领域，从分子水平动态地观察生命现象的本质与生命活动的物质基础。另一方面，它又为临床诊断与治疗开辟了新的途径。至于核技术，无疑不限于同位素的应用，核射线也是科研与医疗的重要手段。

我国核技术的应用已有 20 多年的历史，专业队伍不断扩大，工作也不断深入。当前亟须总结国内外应用核技术的经验。为此，我们组织编写一套“核技术及其在生物医学中的应用丛书”，供生物医学工作者参考。我们希望，这套丛书能为实现四化做出一点点贡献，对我国核医学及核生物学的发展起一定的促进作用。

本丛书拟分专题介绍核技术及其在生物医学中的应用。每一分册包括一个专题。各分册之间，既有联系，又相对独立。读者可以收集全套丛书，也可根据需要选购其中部分分册。

丛书每一分册都邀请对有关专题有丰富经验的同志撰写。这套丛书主要是他们辛勤劳动的成果，也得到他们所在单位的有力支持，特此向这些作者和所在单位表示衷心的感谢。

主编 王世真

# 核技术及其在生物医学中的应用丛书

## 已出版分册

- |               |                       |
|---------------|-----------------------|
| 稳定同位素分析法      | 赵墨田 编著                |
| 闪烁照相与临床应用     | 董惟誉 编著                |
| 放射自显影技术       | 刘鼎新 编著                |
| 激素和药物的代谢示踪动力学 | 杨守礼 编著<br>黄胜利         |
| 甲状腺核医学        | 江 骥 等编著<br>周 前<br>林祥通 |
| 核医学中的辐射防护     | 汪桂江 编著<br>郑钧正         |

## 序

放射免疫分析,以其高度的特异性、灵敏度和实用性,吸引着各国的生物医学工作者。为了在更大范围内推广应用体外微量分析,许多实验核医学及临床化学工作者都希望研制放射性同位素以外的标记物,于是酶标记、化学发光、生物发光标记等新标记物不断涌现;其中以 80 年代初期提出的稀土离子荧光标记最为引人注目。这种时间分辨测量新技术,克服了一般荧光标记受环境干扰的难点,使非特异性信号降低到可以忽略的程度,达到了极高的信噪比,从而大大超过了放射性同位素所能达到的测定灵敏度。学者们高度评价这成功的创举。时间分辨荧光免疫分析已高速地步入应用阶段,成为继放射免疫分析之后标记物发展的一个新里程碑。

免疫分析的另一个动向是早在 10 年前 Ekins 就提出的一次测定若干目的物的“免疫探测器”。这种探测器是一个微型棒,其顶端定位分布着若干种不同抗体,插入被测液后以固相抗体捕捉相应抗原,然后再暴露于标记抗体。可以预期,未来的这种标记抗体的首选标记物最可能是稀土离子荧光标记的示踪抗体;因为它可以被一个微量脉冲光束以时间分辨的方式进行精密的扫描定位探测,一次对多种被测物准确定量,而放射性同位素标记、酶标记、化学发光等其他标记物均不适于在如此狭小的密集区域内精密定位探测。一旦上述设想得以实现,它必将成为生命科学技术上的又一个重大突破。

王世真

1995. 5.

• iii •

## 前 言

时间分辨荧光分析(TRF)是以稀土离子标记抗原或抗体、核酸探针和活细胞等为特征的超灵敏度检测技术,具有标记物制备简便、有效期长、不污染环境、操作流程短、标准曲线量程宽、应用范围十分广泛等优点,虽然问世仅 10 余年的历史,但在方法学研究 and 应用方面均发展甚速。国外已有商品化试剂盒 30 余种,荧光测量仪研制已进入第三代,分析技术已实现高度自动化。我国于 80 年代末期,开展了对这一技术的研究,已在方法学研究、螯合剂合成、测量仪器生产上取得了初步成果,并于 1992 和 1994 年召开过两届全国性医用时间分辨荧光学术研讨会,受到多学科领域研究工作者的重视,但至今尚未见有一本介绍这一崭新技术的著作问世。为加速国内对该技术的研究和推广应用,以适应当代生物医学研究发展的新形势,我们参考国内外最新文献报告,并结合作者的初步工作经验,编写了这本读物。

本书内容较为系统、完整,可供生化、生理、药理、免疫学工作者及高等院校师生参考。

由于该技术是一门跨学科新兴专业,而作者的经验和水平有限,书中有不可避免的缺点和不足,殷切地希望读者和同行们批评指正。

李振甲 陈泮藻

1995. 2. 于北京

# 目 录

<b>第一章 稀土离子时间分辨荧光分析</b> .....	(1)
第一节 稀土离子荧光光谱及传能机理.....	(1)
第二节 时间分辨荧光分析法 .....	(16)
<b>第二章 时间分辨荧光免疫分析</b> .....	(21)
第一节 时间分辨荧光免疫分析的基本原理和特点 .....	(21)
第二节 稀土离子螯合剂和标记原理 .....	(26)
第三节 增强液的荧光增强原理 .....	(39)
第四节 时间分辨荧光分析仪及测量方法 .....	(46)
第五节 时间分辨荧光免疫分析和时间分辨免疫荧 光分析检测类型 .....	(55)
第六节 时间分辨荧光免疫分析的灵敏度 .....	(62)
第七节 时间分辨荧光免疫分析的影响因素和若干 问题 .....	(68)
<b>第三章 抗体纯化及稀土离子标记</b> .....	(75)
第一节 抗血清制备 .....	(75)
第二节 抗体的纯化 .....	(85)
第三节 抗原或抗体的稀土离子标记 .....	(93)
<b>第四章 竞争性时间分辨荧光免疫法测定半抗原</b> .....	(102)
第一节 血清孕酮测定.....	(102)
第二节 血清雌二醇测定.....	(105)
第三节 血清睾酮测定.....	(108)
第四节 血清甲状腺激素测定.....	(111)
第五节 血浆前列腺素类化合物测定.....	(114)



第六节	血清地高辛测定·····	(117)
<b>第五章</b>	<b>非竞争性时间分辨免疫荧光分析法测定蛋白质类化合物</b> ·····	(121)
第一节	促甲状腺激素测定·····	(121)
第二节	血清泌乳素测定·····	(123)
第三节	血清促滤泡激素测定·····	(125)
第四节	血清绒毛膜促性腺激素测定·····	(127)
第五节	血清胰岛素测定·····	(129)
第六节	血清 $\beta_2$ 微球蛋白测定 ·····	(131)
第七节	血清癌胚抗原测定·····	(134)
第八节	血清甲胎蛋白测定·····	(136)
第九节	血清乙型肝炎病毒标志物测定·····	(138)
<b>第六章</b>	<b>时间分辨荧光核酸探针分析</b> ·····	(145)
第一节	概述·····	(145)
第二节	抗原抗体免疫检测技术·····	(146)
第三节	生物素-亲合素检测技术 ·····	(150)
第四节	水杨酸化学偶联检测技术·····	(157)
第五节	时间分辨荧光核酸探针直接固相扫描检测 技术·····	(161)
第六节	稀土离子直接标记 DNA 探针检测技术 ·····	(167)
第七节	时间分辨荧光核酸探针与 PCR 联合检测 技术·····	(170)
第八节	时间分辨荧光核酸探针检测灵敏度·····	(174)
<b>第七章</b>	<b>时间分辨荧光细胞活性分析</b> ·····	(179)
第一节	基本原理·····	(179)
第二节	效应细胞和靶细胞·····	(181)

第三节	稀土离子标记靶细胞·····	(183)
第四节	时间分辨荧光细胞活性分析方法·····	(185)
第五节	时间分辨荧光细胞活性分析的影响因素 ·····	(187)
<b>第八章</b>	<b>时间分辨荧光免疫分析技术研究的现状和进     展·····</b>	<b>(191)</b>
第一节	两大时间分辨荧光免疫分析系统的特点和 发展概况·····	(191)
第二节	方法学研究进展·····	(196)
第三节	BAS-时间分辨荧光免疫分析技术 ·····	(210)
第四节	在生物医学领域中的应用·····	(220)

# 第一章 稀土离子时间分辨荧光分析

## 第一节 稀土离子荧光光谱及传能机理

稀土元素属于元素周期表中 III B 族。稀土元素由于性质十分相似,常共生于一矿物中,分离和提纯难度很大。最初是从相当稀少的矿物中,以氧化物的形态发现的。以前常把氧化物称为土,由此而得名。稀土。

稀土元素包括钪(Sc)、钇(Y)两元素和镧系元素在内,一共有 17 种元素。镧系元素有镧(La)、铈(Ce)、镨(Pr)、钕(Nd)、钷(Pm)、钐(Sm)、铕(Eu)、钆(Gd)、铽(Tb)、镝(Dy)、钬(Ho)、铒(Er)、铥(Tm)、镱(Yb)和镱(Lu)。它们位于周期表的第六周期。镧系中 15 种元素,在化学性质、物理性质和地球化学性质上,既有非常相似之处,又存在某些差异<sup>[1]</sup>。故将它们又分为轻、重稀土元素两种:镧至铕等称为轻稀土元素;钆至镱等 8 种和钇称重稀土元素。表 1-1 列举了稀土元素的理化性质。

其实稀土元素既不“稀”也不“土”。整个稀土元素在地壳中丰度比一些普通元素还要多,如比锌大 3 倍,比铅大 9 倍,比金大 3 万倍。稀土元素在自然界分布相当广泛,我国就是富含稀土的国家之一,稀土储量占世界首位。由于我国具有独特丰富的稀土资源和坚实的稀土研究队伍,为开展稀土及稀土有机配合物发光研究和在国民经济中广泛的应用,提供了有利条件。

表 1-1 稀土元素理化性质一览表<sup>[1]</sup>

原子 序号	元素 符号	元素汉 语名称	原子量	原子外层 电子构型	三价离子外 层电子构型	化 学 性 质
21	Sc	钪	44.9	$3d^14s^2$	[Ar]	与热水作用,易溶于酸,化合价+3
39	Y	钇	88.9	$4d^15s^2$	[Kr]	溶于稀酸和氢氧化钾溶液,与热水起作用,化合价+3
57	La	镧	138.9	$5d^16s^2$	[Xe]	活泼,能与水作用,溶于酸,化合价+3
58	Ce	铈	140.1	$4f^26s^2$	$4f^1$	活泼,溶于酸,不溶于碱,能与沸水作用
59	Pr	镨	140.9	$4f^36s^2$	$4f^2$	溶于酸,与水作用放出氢气,易氧化,化合价+3
60	Nd	钕	144.2	$4f^46s^2$	$4f^3$	有顺磁性,易氧化,与水,酸作用放出氢气,化合价+3
61	Pm	钷	145	$4f^56s^2$	$4f^4$	有放射性元素,质量数 147 的半衰期是 2.64 年
62	Sm	钐	150.4	$4f^66s^2$	$4f^5$	在空气中变暗,能燃烧成氧化物,由氧化钐用钡还原,而得化合价+2 或+3
63	Eu	铕	151.9	$4f^76s^2$	$4f^6$	与水作用放出氢气,氧化物近乎白色,化合价+2 和+3
64	Gd	钆	157.2	$4f^75d^16s^2$	$4f^7$	不溶于水,溶于酸,盐类无色,化合价+3
65	Tb	铽	158.9	$4f^96s^2$	$4f^8$	盐类无色,氧化物白色,用作磷光体活化剂,化合价+3
66	Dy	镝	162.5	$4f^{10}6s^2$	$4f^9$	与水缓缓起作用,溶于稀酸,化合价+3,盐类黄色
67	Ho	铈	164.9	$4f^{11}6s^2$	$4f^{10}$	与水缓缓起作用,溶于稀酸,化合价+3
68	Er	铒	167.2	$4f^{12}6s^2$	$4f^{11}$	不溶于水,溶于酸,盐类和氧化物呈粉红色,化合价+3
69	Tm	铥	168.9	$4f^{13}6s^2$	$4f^{12}$	与水缓缓起作用,溶于酸,化合价+2 和+3,用作磷光体活化剂
70	Yb	镱	173.0	$4f^{14}6s^2$	$4f^{13}$	与水缓缓起作用,溶于稀酸和液氨,化合价+2 和+3
71	Lu	镥	174.9	$4f^{14}5d^16s^2$	$4f^{14}$	与水缓缓起作用,溶于稀酸化合价+3

目前稀土元素和其化合物,已成为现代尖端科学技术不可缺少的特殊材料。例如超导材料、电子元件、合金材料、玻璃陶瓷、石油化工。我国科技工作者已将开发利用稀土资源列为重要的研究课题。

稀土以及稀土有机配合物已越来越广泛地应用于手工业、农业、医药、临床检验以及生命科学高技术产业。

正因为稀土元素具有特殊的物理、化学性质,为稀土金属和化合物的广泛应用奠定了基础。如稀土化合物是一类荧光材料,既可作为基质的组成部分,又可作为激活离子;钕和钇等稀土化合物是固体激光器的重要材料;稀土金属具有较高的磁矩和有价值的磁学性质;稀土元素的铁氧体还是一类重要的磁性材料;钐、铕、镱、镥具有高的热中子俘获截面,是核工业中重要材料之一。稀土元素还在超导材料、合金材料、玻璃陶瓷、石油化工等方面得到应用。另外稀土元素还广泛应用于农业,可促进植物的生长发育;应用于医学研究,生物大分子结构研究等。

## 一、稀土元素外层电子结构

稀土元素外层电子结构<sup>[1]</sup>,以镧系为例。镧系元素自由原子的基态电子组态,有两种基本类型: $[\text{Xe}]4f^n6s^2$ 和 $[\text{Xe}]4f^{n-1}5d^16s^2$ 。15种镧系元素取那种电子组态,主要决定于元素组态的能量。以 $[\text{Xe}]4f^{n-1}5d^16s^2$ 的基态原子电子组态有La、Ce、Yb的元素;以 $[\text{Xe}]4f^n6s^2$ 有Tb元素; $[\text{Xe}]4f^145d^16s^2$ 有Lu元素;以 $[\text{Xe}]4f^n6s^2$ 为其余所有元素,见表1-1。

镧系元素的离子价态可有二价、三价或者四价。但多数为三价。例如 $\text{Eu}^{2+}$ 、 $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Sm}^{3+}$ 、 $\text{Dy}^{3+}$ 、 $\text{Ce}^{3+}$ 和 $\text{Yb}^{3+}$ 。其三价离子,也随原子序数递增,其“原子实”的有效核电荷也依次

增加。

## 二、稀土离子的荧光光谱

稀土离子的吸收光谱范围比较宽,它由下列三个方面组成的:

(1)  $f^n$ 组态内的能级间的跃迁:主要是  $f^n$ 的基态向激发态的跃迁造成的。

(2) 组态间的能级跃迁:自  $4f^n$ 向  $4f^{n-1}5d^1$ 跃迁。一般在紫外区出现,谱带较宽。

(3) 配位体向稀土离子跃迁:即电荷离子发生的电荷密度从配位体的分子轨道向稀土离子轨道进行重新分配的结果。例如镧系络合物电荷跃迁,取决于配位体和稀土离子的氧化还原性。谱带具有较强的强度和较宽的宽度。

稀土元素的三价态是稀土离子特征氧化态,除钪、钇、镧外,均有  $4f$  电子及  $4f$  亚层的 7 个可填充电子的轨道。其能量关系相当复杂,为此对稀土离子可能存在的组态中,常常只考察  $4f$  组态的能级。同时稀土离子存在或单的  $4f$  电子和  $4f$  亚层内的  $f-f$  电子跃迁,这样的电子构型决定稀土离子具有:① 顺磁性;② 吸收能量;③ 发光等这三种性质。它们均由  $4f$  亚层填充有电子而引起。稀土离子的  $f-f$  跃迁谱带的分裂为  $100\text{cm}^{-1}$ 左右, $f-f$  跃迁的吸收光谱是类线状的光谱。 $f-f$  跃迁引起的发光是研究最多的课题,其光谱的类线状,随配位环境的变化而变化。这一性质决定了稀土元素是作为发光材料、发光探针、荧光和激光工作物质的一族重要元素。

除了钪、钇、镧和镨以外的稀土元素都含有未充满的  $4f$  电子。例如  $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$  在开壳层  $4f$  轨道电子结构含有不同数目的电子数, $\text{Eu}^{3+}$  的电子组态为  $4f^6$ ,而  $\text{Tb}^{3+}$  的电子组态为

$4f^8$ , 所以它们具有荧光和激光性能。这是由于  $4f$  组态内的跃迁而产生荧光光谱。荧光光谱或激光光谱, 属于稀土离子的发射光谱。稀土离子的荧光与其它物质的荧光一样, 当受紫外光或激光、X 射线和电子射线等激发后, 会以荧光形式发射。激发光的波长和发射荧光的强度, 均随稀土离子不同而异。

在溶液中, 稀土离子或者它们的化合物, 在紫外线等高能射线的激发下, 可以从基态跃迁到激发态, 在返回到能级低的能态时, 就会发射出荧光。其中  $\text{Sm}^{3+}$ 、 $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Dy}^{3+}$  等能产生强的荧光。例如  $\text{Eu}^{3+}$  和  $\text{Tb}^{3+}$  在水溶液中都能发荧光, 它们与螯合剂、络合剂及生物大分子结合后, 仍保留发荧光的特性。

同时, 对稀土离子的激光活性也进行了研究。具有激光活性的稀土离子有:

二价稀土离子:  $\text{Sm}^{2+}$ 、 $\text{Dy}^{2+}$ 、和  $\text{Tm}^{2+}$ ;

三价稀土离子:  $\text{Pr}^{3+}$ 、 $\text{Nd}^{3+}$ 、 $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Dy}^{3+}$ 、 $\text{Ho}^{3+}$ 、 $\text{Er}^{3+}$ 、 $\text{Tm}^{3+}$ 、 $\text{Yb}^{3+}$  等 9 个。上述二价、三价稀土离子也均可作为激光材料。

在稀土有机配合物发光体中, 稀土离子的电子跃迁, 来自三个方面的跃迁:  $f \rightarrow f$  跃迁;  $4f \rightarrow 5d$  跃迁; 电荷跃迁。

$f \rightarrow f$  跃迁: 主要是  $f^n$  的基态向激发态的跃迁形成的。稀土离子  $4f$  轨道分裂成不同能量的能态。 $f \rightarrow f$  跃迁就是稀土离子在同一个  $f$  层的不同能态之间的跃迁。如  $\text{Eu}^{3+}$  的荧光从  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$  的跃迁。 $f \rightarrow f$  跃迁光谱也是一种类线性的光谱。 $\text{Eu}^{3+}$  除了基态  $\text{Eu}^{3+}$  的  $^7\text{F}_0$  向激发态跃迁外, 还有第一、第二激发态 ( $\text{Eu}^{3+}$  的  $^7\text{F}_1$ 、 $^7\text{F}_2$ ) 更高能态的跃迁, 这是由于  $\text{Eu}^{3+}$  的  $^7\text{F}_1$ 、 $^7\text{F}_2$  态与基态的能差较小。对  $f \rightarrow f$  跃迁, 主要的稀土离子有  $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Sm}^{3+}$ 、 $\text{Dy}^{3+}$ 、 $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Ho}^{3+}$ 、 $\text{Er}^{3+}$ 、 $\text{Tm}^{3+}$ 、 $\text{Pr}^{3+}$ 。

正由于  $f \rightarrow f$  跃迁的吸收光强度很低,使得上述稀土离子能与吸光系数高的有机配体结合在一起,经分子内能量传递,获得发光效率很高的三价稀土有机配合物。

**4f→5d 跃迁:**4f→5d 跃迁的荧光光谱与稀土离子的电子壳层的填充情况有关。例如  $Gd^{3+}$  ( $4f^7$ , 半充满)的激发态在较高能级; $Tb^{3+}$  ( $4f^8$ , 半充满加一个电子), $4f^8 \rightarrow 4f^7 5d^1$  跃迁的能量较低。

**电荷跃迁:**电荷跃迁所需的能量较低,容易获得电荷跃迁的荧光光谱。例如  $Eu^{3+}$  的 ( $4f^8$ , 半充满减去一个电子)4f壳层容易接受一个电子。属这类跃迁的稀土离子有  $Eu^{2+}$ 、 $Yb^{2+}$  等。

### 三、稀土离子的荧光特点

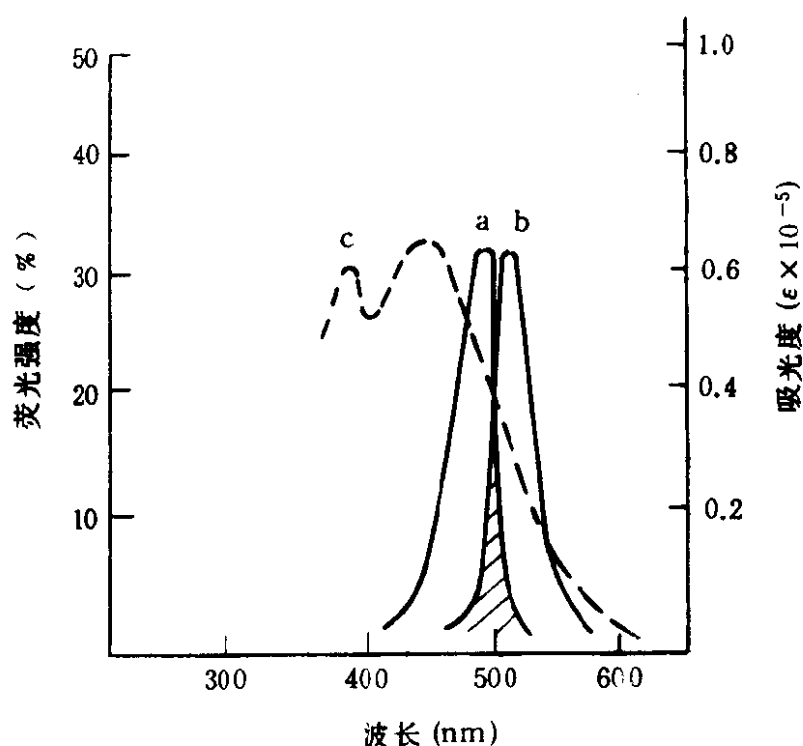


图 1-1 异硫氰酸荧光素的荧光光谱  
a. 异硫氰酸激发光谱; b. 异硫氰酸发射光谱;  
c. 血清样品的荧光光谱。(引自 Soini E.)



普通物质的荧光光谱分为两部分：激发光谱和发射光谱。普通物质的荧光光谱 Stokes 位移较小，如荧光素的 Stokes 位移仅为 28nm。因此，激发光谱和发射光谱通常有部分重叠，互相干扰严重(图 1-1)。加之影响因素较多，荧光寿命短(小于 100ns)，易猝灭。例如血清样品被激发光激发后，发射的荧光光谱与用来作标记待测物质的异硫氰酸荧光素的激发荧光光谱，与异硫氰酸荧光素的发射光谱有相当部分的重叠(见图中斜线部分)。如果用异硫氰酸荧光素作为标记物，来检测血清某一种物质时，本底荧光受激发荧光的干扰相当严重。

稀土离子的荧光光谱也包括激发光谱和发射光谱。通常游离的稀土离子荧光信号是相当微弱的，但当稀土离子与有机配位体形成配合物时，产生分子内和分子间能量传递，使稀

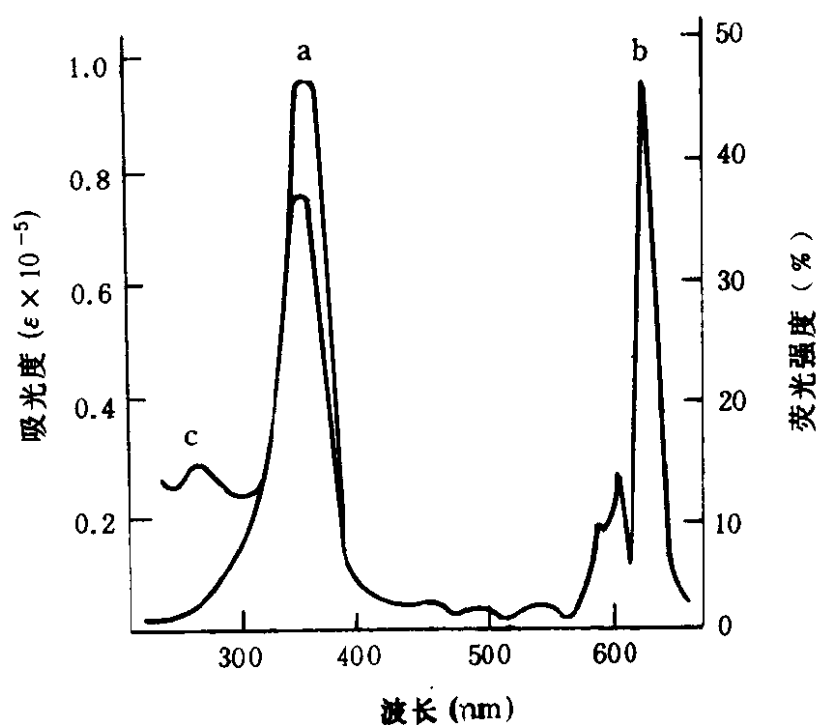


图 1-2 稀土离子  $\text{Eu}^{3+}$  螯合物荧光光谱

a.  $\text{Eu}^{3+}$  激发光谱; b.  $\text{Eu}^{3+}$  发射光谱;

c.  $\text{Eu}^{3+}$  吸收光谱。(引自 Soini E.)