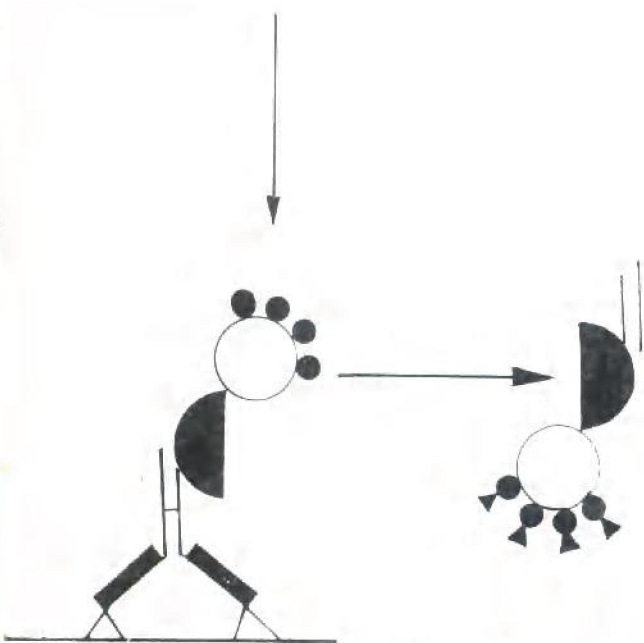
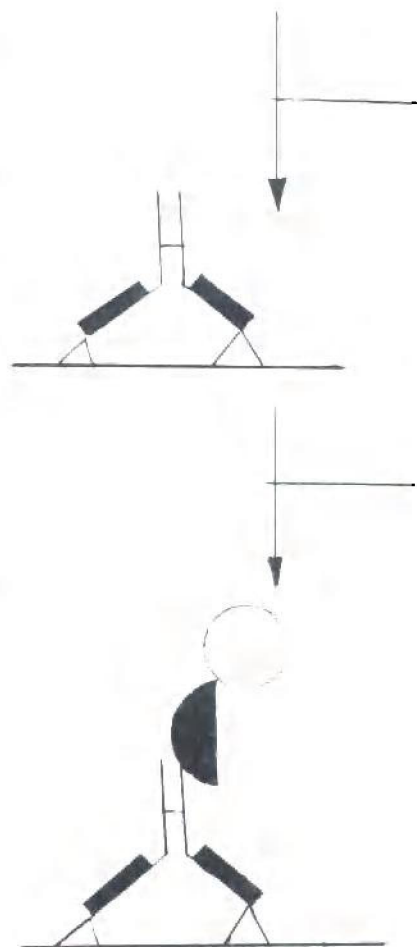
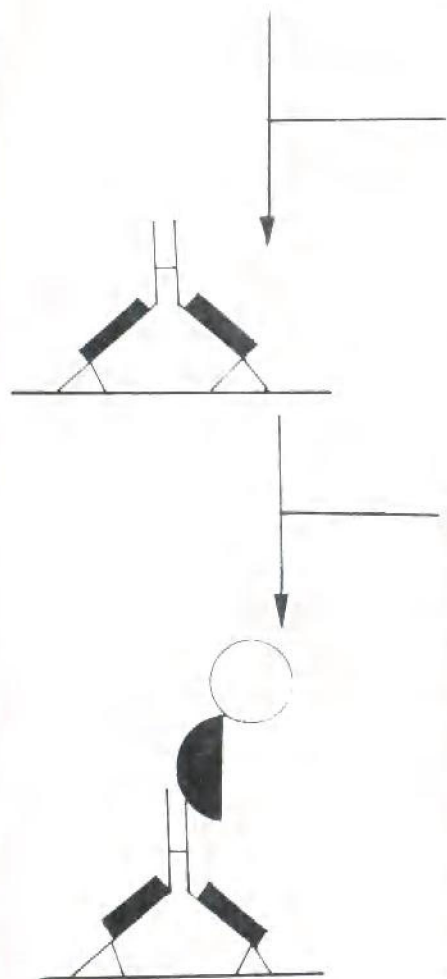


生物学 医学 标记 示踪 技术

王浩丹
周申
主编



人民卫生出版社

生物医学标记示踪技术

王浩丹 周 申 主编

谭天秩 审阅

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物学标记示踪技术/王浩丹, 周申主编. --北京: 人民卫生出版社, 1995
ISBN 7-117-02249-3

I. 生… I. ①王… ②周… III. 生物学-同位素标记-同位素示踪技术
IV. R817.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (95) 第 04290 号

生物学标记示踪技术

王浩丹 周 申 主编

人 民 卫 生 出 版 社 出 版
(北京市崇文区天坛西里 10 号)

人民卫生出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米 16开本 23印张 531千字
1995年12月第1版 1995年12月第1版第1次印刷
印数:00 001—2 000

ISBN 7-117-02249-3/R·2250 定价:38.00 元

[科技新书目 360—204]

编著者（按姓氏笔画排列）

王衍真（中国原子能研究院 副研究员）
王浩丹（山东医科大学 教授）
王维岳（山东医科大学 副教授）
邓树海（山东医科大学 讲师）
白增亮（山东大学 副教授）
孙汶生（山东医科大学 副教授）
刘新泳（山东医科大学 硕士 讲师）
李仁桢（山东医学科学院 研究员）
李大培（山东医科大学 硕士 讲师）
张岫美（山东医科大学 副教授）
张丽宁（山东医科大学 讲师）
侯桂华（山东医科大学 副教授）
徐松德（山东医科大学 教授）
徐丽君（山东医科大学 教授）
曹英林（山东医科大学 讲师）
魏建军（山东医科大学 副教授）

序 言

1923年 Hevesy 首先用天然放射性铅研究铅盐在豆科植物内的分布和转移,建立了放射性核素示踪法。事实上,示踪技术的应用仍早于此。示踪技术有放射性和非放射性之分,近年来均有极大的发展,使医学和生物学发生了革命性的变化。显微镜的发明,人们借助这个工具对性器官、组织、细胞的精细结构有了比较深刻的认识,这对医学和生物学的发展具有划时代的意义。示踪技术的建立、发展和应用,为研究正常和疾病个体中的物质代谢发挥了巨大的作用,包括对代谢转变的化学途径与速度进行定性;对代谢物质进行定位;并能对生物体内生命活性物质进行定量。它还揭开了生物体内和细胞内理化过程的奥秘、阐明了生命基本活动的物质基础,如蛋白质的生物合成、核酸的结构、表达、分布和代谢,基因的活性表达等一些生物学上最根本的问题。因此,示踪技术的广泛应用是继显微镜发明以后,为宏观医学向微观医学发展作出了极为重要的贡献,更具有划时代意义。

医学上传统的观念是医学应该以个别器官为基础,强调源自 Vesalius 时代的解剖学。一种以器官为主的医学,使遗传学、分子生物学、肿瘤学和免疫学等学科无法确立和发展,也无所作用;还无法进行代谢性疾病和感染性疾病的研究。示踪技术是跨越解剖学,从分子水平研究生命活动的重要手段,它的建立和发展也是医学现代化的重要里程碑。控制生命机体每个细胞的主要分子信息是包括在信使 RNA (mRNA) 中, mRNA 能被原位杂交在体外检测到。机体成百成千个基因包括着约 30 亿个单位的四种基本核苷酸,而这些核苷酸对信息进行编码,信息又控制多肽和蛋白质等的合成。用放射性核素示踪法标记 mRNA,就能研究生物活性物质和生命活动的变化,进而可以从分子水平确定疾病的性质。这不仅促使核医学正名为分子核医学,而且还为基础和临床医学有关学科开辟了新途径,为现代医学的发展作出了重要的贡献。

示踪技术已深入到生物学和医学各个领域,系统地阐述各种示踪技术的理论、方法和应用,已非常必要。王浩丹、周申教授有鉴于此,毅然主编《生物医学标记示踪技术》,并邀请多位长期出国工作和学习,为了报效祖国近期返回的中青年专家共同编写这本书。这本专著内容丰富,全面系统地阐述了当今各种示踪技术,在国内属首创,具有较高的科学性、先进性和新颖性。更难能可贵的是每位作者写出自己的实践经验和体会,详尽地叙述了各种示踪法的方法、操作和应用,具有较大的实用性。因此,这是一本从事生物医学研究和临床实践者很有价值的读物。

让我热烈祝贺《生物医学标记示踪技术》的出版问世,并热情地向广大生物医学工作者推荐这本书。

谭天秩

1995年9月

前 言

《生物医学标记示踪技术》一书是根据 90 年代初以来, 标记示踪技术发展迅速, 技术更新快, 应用更广等特点; 并在人民卫生出版社大力支持下, 我们组织以我校为主的有关专业教研室和研究室的副教授以上的中、青年教师, 他们都曾经出国留学或在国外从事过研究工作, 回国以后并从事于各类标记示踪技术的研究和教学工作, 结合各自的实践经验, 分工合作编写了本书。

标记示踪技术几乎在医学、生物学的各个基础学科和临床学科都有它的足迹, 在现代生物医学中有两方面的突出贡献: 一方面表现在领先的开创性, 在生物学、医学各分支学科中成为技术的先导; 另一方面是突出的实用性, 它在样品的测定及制备纯化中成为必不可少的手段和方法; 目前标记示踪技术已成为生物学技术中支柱性的工具之一。

本书主要叙述各类现代标记示踪技术的基本原理和技术方法, 尽力做到内容新、概念清、技术性强; 能较全面地反映 90 年代以来国内外已采用并具有代表性的最基本和最新的技术。本书共分八章 56 万字, 介绍各类标记示踪技术, 是一本技术参考书, 也可作为教学用教材, 本书可供生命科学所有领域科学技术人员专业参考书, 也可供研究生、本科生、临床检验工作者作为技术参考书。

我们殷切的希望, 这本书的出版, 将有助于促进我国标记示踪技术的发展, 将会推动标记示踪技术在生物医学各个领域广泛应用, 并将有助于标记示踪技术教学质量的提高。

本书在编写及出版过程中, 得到了人民卫生出版社及王兵主任和责任编辑姚冰同志大力支持和辛勤的劳动; 我校生化教研室毕文祥老师为本书绘图, 同位素实验室刘德宜高级实验师作了很多技术性工作; 特别要感谢的是我的老师华西医科大学核医学科谭天秩教授在百忙中评阅了本书, 并为本书写了序言。由于编写者经验不足, 知识有限, 错误之处在所难免, 敬请同行及读者不吝指正。

主编于山东医科大学

1995 年 9 月

目 录

第一章 放射性核素示踪技术	1
第一节 放射性示踪剂标记技术	1
一、生物学常用放射性核素	1
二、示踪剂	2
三、放射性核素标记基本技术	3
四、蛋白质、多肽的放射性碘标记技术	9
五、核苷和核苷酸标记技术	14
第二节 放射性核素示踪测量技术	18
一、放射性样品测量类型	19
二、 γ 闪烁测量技术	20
三、液体闪烁测量技术	23
四、契伦科夫辐射测量	27
五、双标记及多标记测量方法	28
第三节 放射性核素示踪方法	29
一、概述	29
二、核素稀释法	33
三、物质转化的示踪方法	35
四、细胞学中的示踪方法	37
第四节 药物动力学示踪技术	42
一、药物动力学的基本理论	42
二、药物动力学示踪技术的基本类型与要求	46
三、药物动力学示踪分析举例	48
第五节 放射自显影术	61
一、放射自显影术的原理	61
二、放射自显影的方法	62
三、放射自显影的特点	66
四、放射自显影的分类	67
第六节 放射免疫分析技术	69
一、基本原理	69
二、基本技术及其进展	71
第七节 免疫放射分析技术	75
一、基本原理	75
二、IRMA 法分类	76
三、IRMA 法基本技术及其进展	78
第八节 受体的放射配体结合分析技术	81
一、基本原理	81

二、基本技术	82
三、数据处理	88
四、受体的判据	91
第九节 酶法放射分析和放射酶促分析法	93
一、基本原理	94
二、基本技术	96
○ 第二章 免疫酶示踪技术	99
第一节 免疫酶示踪技术的实验基础	99
一、示踪酶	99
二、示踪酶的免疫标记	101
三、免疫酶制剂的质量鉴定	103
四、固相载体与固相化处理	104
五、免疫酶最适浓度的选择	105
六、底物及显色反应	105
七、检测结果的判断与分析	106
第二节 免疫酶显微示踪技术	107
一、基础方法的原理与流程	107
二、实际操作中的有关问题	109
三、光镜水平的应用与发展	111
四、电镜水平的应用与发展	112
第三节 免疫酶微量分析技术	116
一、技术原理与类型	116
二、固相酶标免疫测定	117
三、非固相酶标免疫测定	125
第四节 免疫酶标原位杂交技术	128
第五节 酶标免疫传感技术	129
第三章 生物素-亲合素系统示踪技术	131
第一节 生物素-亲合素系统及其特点	131
一、生物素研究趋势与进展	131
二、亲合素及其衍生物	131
三、生物素-亲合素系统的特点	133
第二节 生物素、亲合素的制备纯化与标记技术	133
一、生物素的活化及活性生物素结合物的制备	133
二、亲合素的提取、纯化与标记技术	136
第三节 生物素-亲合素系统的检测方法与原理	140
一、BAB 法 (或 BRAB 法)	140
二、LBA 法 (或 BA 法)	141
三、ABC 法	142
四、影响生物素-亲合素系统检测敏感性的因素	146
第四节 生物素-亲合素系统的实际应用	147
一、抗体形成细胞的 BA-Spot-ELISA 检测法	147
二、BA 微量 ELISA 法测定人血清 IgE	149

三、放大生物素-亲合素免疫荧光技术 (BA-IF) 检测细胞表面标志	151
四、BAS 双染双标记 方法确定组织内酶定位的超微结构研究	152
五、亲合素-生物素乳凝试验检测病毒抗体	153
六、亲合素-葡萄球菌 A 蛋白 ELISA 法检测血清中日本脑炎病毒抗体	154
七、生物素-亲合素增强免疫斑点法检测甲型肝炎 IgM	155
八、生物素标记 Oligo 探针-亲合素磁性球珠分离 mRNA (Poly AT tract ^R mRNA 分离系统)	156
九、人外周血单个核细胞 IL-2R α 的检测	157
第四章 免疫荧光示踪技术	159
第一节 原理	159
第二节 常用荧光物质	159
一、异硫氰酸荧光黄	159
二、四乙基罗丹明	160
三、四甲基异硫氰基罗丹明	160
四、其他荧光物质	160
第三节 常用检测仪器	161
一、荧光显微镜	161
二、荧光显微镜附件的研究进展	162
三、流式细胞分析仪	163
四、荧光分光光度计	164
五、荧光偏振光分析仪 (Abbott TDX 系统)	164
第四节 传统免疫荧光技术及其应用	164
一、免疫荧光抗体的制备	164
二、传统的免疫荧光技术	167
三、传统免疫荧光技术的应用	169
第五节 现代免疫荧光技术及其应用	171
一、免疫荧光分析技术	171
二、免疫荧光数字图象处理系统的应用	173
三、微球浓缩免疫荧光分析技术的应用-血清白色念珠菌抗体的检测	174
四、荧光测定酶免疫分析	175
五、荧光偏振免疫分析技术-检测体内药物浓度	176
六、底物标记荧光免疫分析-检测血清中的药物浓度	176
七、荧光素标记技术检测免疫细胞活性	177
八、免疫荧光分析技术检测细胞 DNA	179
九、荧光原位杂交技术-快速诊断 Down 氏综合征	180
第五章 重金属标记技术	182
第一节 铁蛋白标记抗体法	182
一、原理	182
二、探针制备方法	182
三、免疫铁蛋白标记的染色法	183
第二节 胶体金标记技术	184
一、原理和优点	184

二、金探针的制备	185
三、胶体金探针的应用和前景	187
○ 第六章 核酸标记与分子杂交技术	192
第一节 核酸探针制备	193
一、载体	194
二、重组 DNA	200
三、核酸的纯化和分离	203
第二节 核酸标记	209
一、核酸标记示踪剂—放射性核素	210
二、缺口平移	211
三、随机引物标记	211
四、末端标记	212
五、多聚酶链反应 (PCR) DNA 标记法	213
六、 ^{35}S dCTP 标记 DNA-DNA 测序	216
七、 ^3H dNTP 标记探针与染色体原位杂交	221
八、实验室中几种简便核酸标记检测法	222
九、核酸标记的注意事项	224
第三节 核酸分子杂交	224
一、核酸杂交原理和参数	225
二、液相杂交	226
三、固相杂交	231
第四节 人体基因探针及筛选	240
一、基因组探针及筛选	240
二、cDNA 文库及探针筛选	243
三、显微切割探针库	249
四、限制性片段长度多态 (RFLP) 探针的筛选	251
第七章 稳定核素示踪技术	254
第一节 概述	254
一、生物医学中常用的稳定核素	254
二、稳定同位素标记物质的命名	255
三、同位素示踪技术常用的计算符号	256
第二节 稳定核素的富集和分离	257
一、基本理论	257
二、分离稳定核素的方法	260
第三节 稳定同位素标记化合物的制备	266
一、化学合成法	266
二、同位素交换法	268
三、中间体标记法	268
四、生物合成法	269
第四节 稳定核素及其标记化合物的分析测定	270
一、气相色谱—质谱联用法	270
二、核磁共振光谱法	281

三、红外分光光度法	287
四、发射光谱分析法	294
第五节 稳定同位素在生物学中的应用	289
一、概述	289
二、稳定同位素稀释法	299
三、 ^{13}C 呼气试验	303
四、 ^{15}N 尿试验	309
五、物质代谢转变的研究	312
六、稳定同位素体内示踪动力学研究	316
七、酶的活力测定	328
第八章 其他标记示踪技术	334
第一节 半抗原标记示踪技术	334
一、核酸分子的地高辛标记示踪技术	334
二、蛋白质分子的二硝基苯半抗原标记示踪技术	340
第二节 稀土元素示踪技术	342
一、基本原理	342
二、基本技术	344
三、TRFIA 分析系统	346
四、分析中的注意事项	347
第三节 化学发光免疫法测定技术	347
一、基本原理	347
二、基本技术	350
三、化学发光免疫分析质量控制	356

第一章 放射性核素示踪技术

放射性核素示踪技术就是利用放射性核素或其他标记物作为示踪剂，在生物体内或体外研究各种物质或现象的运动规律，利用辐射检测仪器进行定量或定位分析，追踪物质动态变化规律。随着现代医学生物学的发展和高新技术的开发，标记物的品种及其检测仪器日臻完善，放射性核素示踪技术将得到更广泛的利用。

第一节 放射性示踪剂标记技术

放射性示踪剂 (radioactive tracer) 是以具有放射性为其鉴别特性的示踪剂，它是化合物分子中，同一位置上的稳定的同位素的原子被同一元素的放射性同位素的原子所取代，在分子的性质上，结构上没有任何的变化。

一、生物医学常用放射性核素

通常要根据实验的目的和实验的周期长短选用放射性核素的类型和半衰期。一般 α -粒子很少用于生物示踪剂实验，多选用发射 β 或 γ 射线的核素。体内示踪时，主要选择 γ 射线，易于在体外测量。离体示踪或各种代谢转变的研究多选用发射 β 射线的核素，便于各种示踪分析和探测。选用的半衰期要合适。表 1-1 介绍几种生物医学中常用的放射性核素。

表 1-1 生物医学中常用的放射性核素

核素名称	衰变方式	半衰期	主要射线能量 (Mev)	化学状态	主要用途
^{51}Cr	EC	27.8d	0.324(90%)	$\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$	标记
^{59}Fe	γ β^-	45d	γ 1.29(43%) 1.10(57%) β^- 0.46(54%) 0.27(45%)	$^{59}\text{FeCl}_3$	标记
^{58}Co	EC, β^+	71d	γ 0.805(99.5%) β^+ 0.48(15%)	$^{58}\text{CoCl}_3$	标记
^{125}I	EC	60d	0.035(7%)	Na^{125}I	标记、诊断
^{131}I	β^-	8.04d	β^- 0.605(90.4%) 0.333(6.9%)	Na^{131}I	标记、诊断、治疗
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	β^- IT	6.02h	γ 0.14(90%)	$\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$	标记、脏器显象
^3H	β^-	12.3a	β^- 0.0186(100%)	^3H 水、 ^3H 气	标记、示踪
^{14}C	β^-	5730a	β^- 0.156(100%)	$\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ $\text{Na}^{14}\text{CO}_3$	标记、示踪
^{32}P	β^-	14.3d	β^- 1.71(100%)	$\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$	标记、治疗
^{35}S	β^-	86.7d	β^- 0.167(100%)	$\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$	标记

二、示踪剂

(一) 示踪剂概念

示踪剂(tracer)是指具有某些明显的特性而易于辨认的物质。可以是放射性物质,也可以是非放射性物质。将小量该物质与待测的物质相混合或附着于此物质时,待测物质的分布状况或其所在位置等就能被确定。本章论述的系指放射性示踪剂,以具有放射性为鉴别特性的示踪剂。

(二) 示踪剂分类

核素示踪实验是依靠放射性核素标记的示踪剂和相应的核探测仪器。示踪实验分为两种类型,一种是体内(in vivo)示踪实验,另一种是体外(in vitro)示踪实验,因此示踪剂也被分为体内和体外两种类型。

用于体内示踪实验的放射性核素标记物多采用 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{32}P 和 ^{75}Se 等核素标记,利用这类示踪剂追踪研究某种物质在机体内的生理、生化和病理过程。例如,对生理活性物质示踪分析,可以研究该物质吸收、分布和排泄,探讨物质的动态平衡。对某些表面上看来静止不动的物质(如骨中的钙、磷和胆固醇等)用示踪方法观察它们更新的情况,探讨它们的转移速度和机制。还能观察各种物质在不同组织中的浓聚和释放。

用放射性核素标记药物做示踪剂,用示踪动力学方法研究药物和生理活性物质在体内的动态过程,包括它们的代谢率、更新速度、清除率及不同代谢率间的交换情况等。

放射性核素及其标记的特异性显像剂常用于体外显像的方法研究物质在体内脏器的分布和代谢的变化,以判断脏器的功能状态。

1957年H. O. Anger创制 γ 相机和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的推广应用提高了脏器显像的诊断水平,80年代电子计算机广泛应用于各个领域,医学诊断中出现计算机断层显像仪(PET, SPET),使原来以生理学功能显像为主要特征的核医学向生物化学、药理学的代谢和受体显像过渡,把脏器显像提高到定量和动态核医学的新阶段。

体外示踪实验的放射性示踪剂一般用 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{125}I 等核素进行标记。常用 ^3H -胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR)参入DNA作为淋巴细胞转化的指标,观察细胞免疫情况。用 ^{32}P 和 ^{125}I 标记的各种核苷及核苷酸研究DNA和RNA结构和功能、遗传和变异。利用 ^{125}I 标记的蛋白质及多肽能够定量体外测定微量生物活性物质。60年代建立的放射免疫分析和近期发展的放射受体分析及受体的放射配体结合分析技术等都是体外的示踪应用。

(三) 放射性示踪剂的特点

核素示踪技术就是对被研究的对象(原子、化合物或细胞等)进行核素标记,然后在一定的体系中追踪示踪剂的位置、数量和变化。示踪剂应具备以下特点:

1. 核素应当有合适的半衰期,较好的单能辐射,生物毒性小。
2. 示踪剂应保持研究对象原有的生物和化学性质。
3. 示踪剂应具有结合键型牢固,稳定性好。
4. 示踪剂应具有足够的放射性比活度。

(四) 对放射性示踪剂的要求

由于被研究物质的性能、特点及定量是通过对示踪剂间接获得的,因此对于示踪剂应有严格的要求。

1. 核素标记的位置 核素在化合物分子上标记的位置要根据研究的目的和分子在体内代谢过程中的特点, 选择适当的标记位置, 以便在动力学分析过程中, 示踪原子能牢固地结合在标记分子上。

2. 放射化学纯度 由于被研究物质的检测是通过测定样品中的放射性而间接获得的, 如果示踪剂中含有其他放射性物质, 必然影响数据的准确性, 一般放射化学纯度 > 95%。

3. 放射性比活度 示踪剂的放射性比活度要适当, 根据研究的对象, 以达到生物样品预期的精确度和灵敏度。过高追求放射性比活度, 可能会引起示踪剂生物活性和免疫活性的变化, 影响测定结果。放射性比活度过低, 难以满足实验预期的目的 (灵敏度低)。原则上要求标记化合物每个分子上含有一个放射性原子。放射性比活度的单位是 Bq/mmol。

4. 示踪剂的用量 包括示踪剂的化学量和放射性活度两个方面, 因为示踪剂通常比活度很高, 化学量几乎不考虑。通常是以放射性浓度表示, 单位是 Bq/L。

三、放射性核素标记基本技术

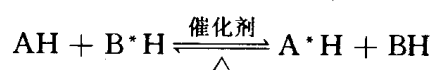
分子中某个原子或几个原子被放射性核素所取代的化合物称为核素标记化合物, 也称标记化合物。根据核素在分子中所处的位置可分为: ①定位标记 (S): 指标记分子中标记原子局限在分子中的指定位置; ②均匀标记 (U): 指标记分子中标记原子均匀分布于分子中; ③全标记 (G): 标记分子内所有相同的原子都被标记原子所取代; ④准位标记 (N): 指标记分子中标记原子从合成方法上预测应在指明某一位置, 但由于未经实验分析证实不能保证只局限于指定位置, 一般定位标记 < 95%; ⑤多标记: 指同一标记分子中含有两种或两种以上不同的标记原子。¹⁴C 和 ³H 标记化合物常用的制备方法有以下几种。

(一) 同位素交换法

有机化合物中某个或某些原子与相应的放射性原子 (标记原子) 之间发生的交换反应。这种交换可以是同一元素之间互相替代, 如 ¹H 与 ³H 交换, 也可以是不同元素之间互相替代, 如 ¹H 与 ¹³¹I (¹²⁵I) 交换。

交换法是 ³H 标记化合物制备常用的方法。它操作简单, 一般实验室均有条件进行标记, 但是不易达到定位标记。标记是要在高温、特定的 pH 和催化剂 (钨和铂等) 等条件下进行的。产品纯化一般比较容易, 也能获得高比度的标记化合物。下面介绍溶液体系中非均相交换法制备 ³H 标记大分子化合物 (中草药有效成份的单体或结晶品) 方法。

【原理】有机化合物或中草药纯品溶解在氚水 [³H₂O] 中, 在一定的 pH 值, 催化剂和适当的温度下, 置特定的真空系统里, 其分子中的氢原子 (¹H) 与氚水中的氚原子 (³H) 产生交换反应, 然后除去不稳定氚原子, 再经提取纯化后获得 ³H 标记化合物。反应式:



【仪器及试剂】液闪仪, 紫外分光光度计, 放射性薄层扫描仪, 电磁搅拌器, 干燥器, 真空泵, 硅胶板, 层析缸, 真空玻璃系统, 氧化铂, 二氧六环, 无水乙醇, 氚水, 闪

烁液（含 0.4%PPO 及 0.01%POPOP 二甲苯液）。

【方法与步骤】

1. 有机大分子与³H 交换标记 在反应瓶中加入约 100mg 中草药的单体或纯品，用 1ml 无水乙醇（或有机溶液）溶解，再加入一定量氚水（1ml， 8×10^{10} Bq），氧化铂（约 80mg），适量二氧六环，然后将反应瓶装置在真空系统上，抽真空到 1.3×10^{-4} kPa，反应瓶置约 100℃ 油液中，在电磁搅拌下反应 16 小时左右，过滤反应液，滤液在低温下减压蒸干，除去氚水及有机溶剂，然后用乙醇溶解，热浴上抽干，重复三次，除去未标记在化合物分子上的不稳定氚（³H），获得粗制的³H 标记产物。

2. 产品纯化 取粗制品少许溶于乙醇（或其他试剂中），用紫外分光光度计测定最大吸收峰，与标准品对照。产品纯化采用有机溶剂重结晶的方法，将粗制品用甲醇溶解并加热，乘热将不溶的杂质过滤除去，滤液冷却后析出结晶，抽滤干燥，除去溶剂，重复操作，将获得标记物纯品。

3. 产品比活度及放射化学纯度测定 ①比活度测定：将一定量的标记物纯品用闪烁液溶解，在闪烁仪上测定放射性活度，然后计算出产品的比活度。②放射化学纯度测定：将标记产品溶于氯仿或其他溶剂中，点样在硅胶板上，凉干，室温下，在适当的展层剂中展开，吹干，在放射性薄层扫描仪上测量，根据各个峰的放射性活度，计算放射化学纯度和 R_f 值。也可将层析板每间隔 1cm 刮下，放在闪烁液里，在闪烁仪上测量每瓶的放射性，然后绘制层析谱，计算放射化学纯度和 R_f 值。放射化学纯度要求 $>95\%$ 。

【结果分析】

1. 液相的催化交换标记法是以氚水为氚化试剂，用钯、铂作催化剂，在溶液中进行氢与氚的交换反应。通常采用此法标记中草药及大分子有机化合物，标记及产品分离纯化都比较简便。也有缺点，如标记物容易发生歧化反应，消旋作用，脱卤反应，降解作用和聚合反应等现象。影响标记物的活性和有效期。

2. 此方法制备的标记物能获得高的比活度的产品，但氚在标记物分子中的分布情况以及每次标记物的比活度都难以重复，对一些比活度及标记位置要求不高的标记化合物均可采用此方法标记。

3. 影响催化交换反应的因素有温度、时间、氚丰度、催化效率等。对不同标记物质要经过预实验选择最佳标记的条件。实验证明通常要求反应的温度在 100℃ 左右，但要根据被标记物质的耐温性质选择适当的温度。反应时间常 20 小时左右，根据被标记物质所需的比活度及其性质确定最佳时间。反应的体系中避免氮、硫和砷等影响催化的毒性物质。氚的丰度通常要求在氚溶剂中为 10% 左右。

4. 比活度计算公式：

$$S(\text{Bq}/\mu\text{g}) = \frac{A}{m} \quad (1-1)$$

式中：A 为标记物的放射性活度，m 为标记物的化学量。

5. 放射化学纯度计算公式：

$$\text{RCP}(\%) = \frac{C_1}{C_1 + C_2 + C_3} \times 100\% \quad (1-2)$$

式中：C₁、C₂、C₃ 为各峰的放射性计数率。

(二) 化学合成法

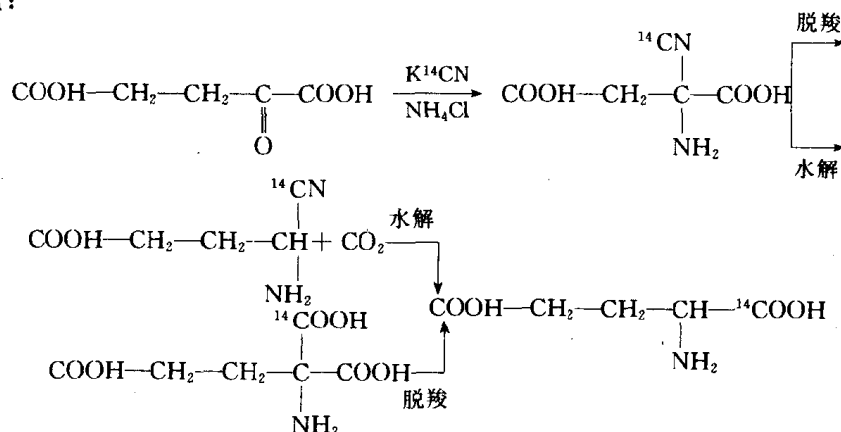
化学合成法是制备 ^{14}C 和 ^3H 标记化合物常用的方法,这类标记化合物已广泛用于药理、代谢和分子的化学结构等方面的研究。采用此方法制备的标记化合物不仅比活度高,而且能够定位标记。放射性碘(^{125}I 、 ^{131}I)标记化合物的标记主要用此方法(本节第四部分详细叙述)。

制备氟标记化合物,常用氟气化学合成法,通常对 ^3H 的丰度和比活度要求很高,一般有催化法,氟卤置换和还原法三种。

^{14}C 标记化合物最常用的制备方法是化学合成法。此方法获得的标记物比活度高、稳定、定位标记,且工艺流程简单容易控制。这类标记物通常是把结构简单的带有核素的前体与化合物进行化学反应而获得的。下面介绍 ^{14}C -谷氨酸的化学合成方法。

【原理】 α -酮戊二酸在 NH_4Cl , ^{14}C -氰化钾系统中缩合成腈,经过水解、脱羧作用形成DL-谷氨酸-1- ^{14}C 。

反应式:



【仪器及试剂】 液闪仪,薄层扫描仪,硅胶板,回流装置,油浴,12×500mm柱,Dowex×50(H^+), K^{14}CN , α -酮戊二酸,HCl,无水乙醇, NH_4OH , NH_4Cl ,苯酚,活性炭。

【方法与步骤】

1. 标记 氰化钾(K^{14}CN) 0.6g, 36.3MBq, 氯化铵 0.5g, 一起投入到 25ml 烧瓶中,加入浓 NH_4OH 1.2ml,摇均匀待全部溶解。取 α -酮戊二酸 1.0g 加入上述反应瓶中,摇均匀,反应液呈柠檬色。静止一小时,然后置冰浴中冷却 10min,再加入浓 HCl 3ml,减压蒸干。

2. 提取 沉淀用 3ml 浓 HCl 再溶解,然后 110℃回流 6h,颜色变成深褐色。回流液再经过减压蒸干,残渣用 5ml 无水乙醇溶解,此时出现不溶解的白色沉淀,再用 5ml 乙醇溶解一次,将二次乙醇液合并浓缩至 5ml,然后再加入 5ml H_2O ,蒸发浓缩至 3ml。

3. 分离 将 3ml 标记溶液放到 Dowex50(H^+)阳离子交换柱上,用水洗到中性,再用 2mol/L NH_4OH 淋洗,收集淋洗液约 14ml,然后减压蒸干。再溶于 2ml 水中。

4. 纯化 将上述溶液点在硅胶板层析纸上(160×220mm 共 6 张),用水饱和的苯酚溶液展开,扫描,用水浸出 $R_f=0.6$ 处标记产品。水溶液中加入少量活性炭脱色,获产品 7ml。总活度为 4.8MBq。

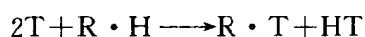
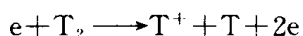
5. 鉴定 按公式 (1-1), (1-2) 分别测定 DL-谷氨酸-1- ^{14}C 的比活度和放射化学纯度。

【结果分析】 化学合成法制备的标记化合物都能达到高比活度,放化纯度 $>90\%$ 。本实验产品比活度为 5.4MBq/mmol。人们已经利用此方法标记 ^{14}C -多糖, ^{14}C -葡萄糖等小分子有机化合物。这是具有实用价值的方法之一。

(三) 氟气曝射法标记中草药有效成份

50 年代中期 Wilzbach 发表了氟气曝射法标记有机物质之后,60 年代建立了放电、紫外线、微波以及加催化剂等方法改进曝射法,其中以放电氟气曝射法的设备最为简单,操作方便,可以在较短的时间内获得需要的氟标记物。70 年代中,随着中草药有效成份的提取和药理研究的开展,已经成功地用此方法制备了大量的中草药氟标记化合物,用于药代动力学的研究。以下介绍放电曝射法制备 ^3H -中草药单体方法。

【原理】 氟 (^3H) 在放电交换瓶中,发生辉光放电,使氟气活化,电离,可以产生高浓度的氟原子和离子,有利于药物的氟交换。



【仪器及试剂】 液闪仪,分光光度计,氟系统,曝射瓶,硅胶薄板 G,中草药单体,甲醇,吡啶,氯仿,乙酸乙酯等。

【方法与步骤】

1. 标记 中草药单体约 10mg 置于放电曝射瓶中,加适量吡啶溶解,并均匀涂布在瓶内壁上,待吡啶完全挥发后,将瓶接到氟系统上(图 1-1),抽真空至 0.13Pa,通入氟

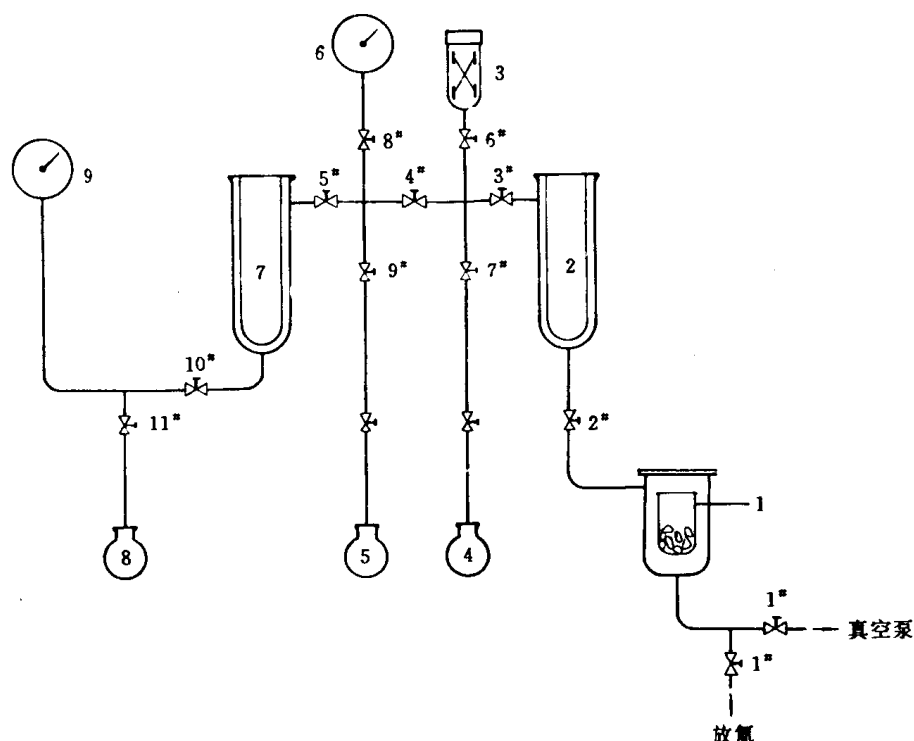


图 1-1 氟标记真空系统图

1. 干燥盒 2, 7. 冷井 3. 热偶管 4. 回收铀粉瓶 5. 氟源铀粉瓶
6, 9. 真空表 8. 氟化反应瓶 1*-11*. 活门