

## 知识介绍

# 高通量药物筛选中的荧光微球

胡 杰 刘白玲 汪地强

(中国科学院成都有机化学研究所, 四川 成都 610041)

**摘要:** 简要介绍了邻近闪烁分析技术及由其发展而来的 Alphascreen 分析技术, 对其中使用的荧光微球的要求、特点作了介绍, 并按荧光物质在微球中所处的位置对荧光微球的制备方法作了较为详细的讨论。

**关键词:** 高通量药物筛选; 荧光微球; 邻近闪烁分析; 制备

中图分类号: O657

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2003)06-0059-04

## Fluorescent particles in high-throughput screening assay

HU Jie, LIU Bai-ling, WANG Di-qiang

(Chengdu Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** The scintillation proximity assay and Alphascreen, which developed from it, are briefly introduced. The requirements and features of fluorescent particles used in this technology are also described. The preparation methods of fluorescent particles are reviewed in details by the positions of fluorescent compounds in the particles.

**Key words:** high-throughput screen; fluorescent particles; scintillation proximity assay; preparation

传统的药物筛选方法是采用药理学的方法, 通过体内、体外多种试验, 评价药用样品的药学活性。直到 20 世纪 70 年代中期, 动物实验一直是药物筛选的主要方法, 但动物实验存在需时长、劳动强度大、操作技术要求高、受试样品需要量大等缺点<sup>[1]</sup>。现代科技的发展为高效率的筛选药物提供了技术条件<sup>[2]</sup>, 高通量药物筛选技术 (HTS)<sup>[3-6]</sup> 就是将多种技术方法有机结合而形成的一种新的技术体系, 它以分子水平或细胞水平的实验方法为基础, 以微板形式作为工具载体, 以自动化操作系统执行实验过程, 以灵敏快速的检测仪器采集实验数据, 以计算机对实验数据进行分析处理, 并以相应的数据库支持整个技术系统的正常运转。从而可在同一时间对许多样品进行检测, 在一天内可检测多达数万个样品。

20 世纪 70 年代中期, 同位素标记和检测方法的建立, 特别是 80 年代邻近闪烁分析技术 (SPA) 的应用<sup>[7-8]</sup>, 使药物筛选技术有了极大的提高。而在这项技术中, 荧光微球作为一种必不可少的试剂, 起着非常重要的作用: 荧光微球能够携带许多荧光分

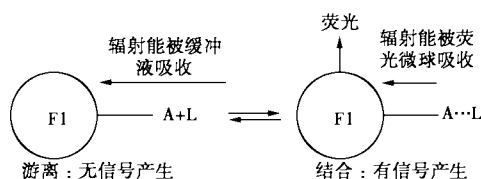
子, 可以达到单个粒子荧光可见, 较弱的刺激就可以引发较强的信号, 使检测的灵敏度有了很大提高, 检测所需样品量更加微量化; 同时荧光微球只需少量的低能辐射刺激, 避免了使用传统的放射性微球造成的辐射危险<sup>[9-12]</sup>, 并在不损失检测灵敏度的前提下降低了成本。

## 1 邻近闪烁分析技术

近年来放射性免疫分析及配体连接分析取得了很大的成功, 并已成为目前生物医学上应用最广泛的分析手段之一。然而这 2 种方法需要在检测前将没有反应的自由配体与已反应的配体完全分离。这一过程既费时、费力, 又容易导致非特异性结合的增加, 而且使分析过程不能实现自动化。这 2 种分析过程中使用的闪烁液常常是易燃、有毒的, 不但价格昂贵, 而且难以处理。运用邻近闪烁分析技术, 可以克服以上 2 种分析方法的不足。

邻近闪烁分析技术是高通量药物筛选的重要筛选模型, 它无须对游离和结合的标记物进行分离, 从

而使自动化操作成为可能,大大缩短检测时间,节省人力物力。邻近闪烁分析通常在常规的分析缓冲液中即可进行,分析用物质包括:表面物理吸附或化学键合了抗体或受体分子的荧光微球;可发射低能辐射的同位素标记的抗原或配体。用作标记的同位素要求其放射出的低能辐射能够很容易地在较短的距离内就被液相介质吸收,生命科学中常用的 2 种同位素—— $^3\text{H}$  和  $^{125}\text{I}$  都具有理想的放射特性。



只有标记配体(L)与荧光微球(F1)上的受体分子(A)结合后才有荧光信号产生

图 1 邻近闪烁分析原理

当表面包覆有抗体或受体的荧光微球与同位素标记后的抗原或配体混合在一起时,抗原/抗体,或配体/受体之间发生特异性反应而结合在一起,从而使标记后的配体与荧光微球之间的距离足够近,因此放射性同位素发射出的  $\beta$  粒子或俄歇电子能够到达荧光微球,并激发出荧光。而绝大多数没有结合上的标记配体与荧光微球之间的距离太远,放射性同位素辐射出的能量在没有到达荧光微球前,就已经被溶液所吸收。通常在邻近闪烁分析检测中,缓冲溶液在 0.4 mL 左右,其中荧光微球的含量仅在毫克级水平上,有时甚至几十微克就已足够了。所以只有结合了的标记配体才能激发出荧光,成为能被检测到的信号。而游离的标记配体不能激发出荧光,从而避免了复杂、费时的分离过程。

近年来,又出现了一种类似的、但完全避免使用放射性同位素的所谓 Alphascreen 法。这种分析与邻近闪烁分析的不同在于它使用了两种微球:供体微球和受体微球。当两种微球特异性的结合在一起时,供体微球中的光敏感剂被激光激发,使其周围的氧转变为激发态的单线态氧,激发态的单线态氧进一步激发受体微球中的荧光物质,产生荧光信号。如果两种微球没有结合在一起,激发态的单线态氧就因两种微球间的距离不够近,而不能激发出荧光信号。此方法使激光激发代替了放射性同位素激发,就其机理而言它仍可视作为一种邻近闪烁分析技术。

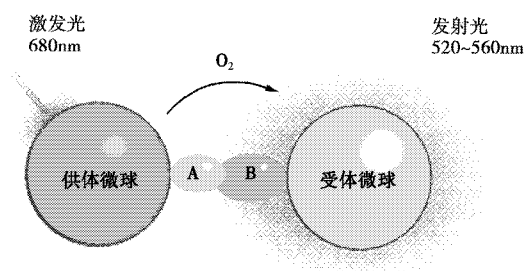


图 2 Alpha 筛选的原理

但是,如果荧光微球的表面是非活化的,受体分子对微球的包覆仅仅依靠物理吸附完成,这样的结合不很稳定,长期存放会导致稳定性下降,而且包覆效率也不高,造成价格昂贵的受体物质的浪费。因此包覆之前,荧光微球的功能化十分重要,使活化的荧光微球表面带上一系列的官能团,如羟基、羧基、氨基和环氧基等,受体分子就可在温和的条件下与荧光微球发生化学连接,从而牢固地结合在一起。

微球的表面功能化有 2 种方式:先制得聚合物微球或相应的前体,再进行化学改性,常用的方法有接枝、嵌段、交联及表面功能化(氯甲基化、磺化、磺酰化等);或者将聚合单体与一定量的功能单体共聚。加入功能单体的目的是使高分子微球带上反应性的官能团,这些官能团可与荧光分子化学键合,然后剩余的官能团可继续与生物分子键合;或荧光分子物理吸附于微球表面后,表面官能团能与生物分子键合。实践中可选择带不同活性基团的单体作为功能单体,如带羧基的丙烯酸、衣康酸,带羟基的甲基丙烯酸羟乙酯,带醛基的丙烯醛以及带环氧基的甲基丙烯酸缩水甘油酯等。

在存放和测试过程中,荧光微球可能从溶液中沉降下来,由于光学系统难以检测到试管底部发射出来的荧光信号,从而引起检测结果的偏差。为了避免这种情况,可在分散介质中加入适量的表面活性剂或保护性胶体,使荧光微球稳定地分散在介质中形成均一的悬浮液。

## 2 荧光微球的制备

邻近闪烁分析技术在高通量药物筛选中成功应用的关键就是表面功能化的荧光微球的制备。从荧光分子在微球中所处的位置而言,荧光微球的制备可分为 2 种方式:荧光分子物理吸附或化学结合于微球表面;荧光分子包埋于微球内部。

### 2.1 荧光分子物理吸附或化学结合于微球表面

采用预先制得聚合物微球,再在其上吸附荧光

物质的方法,可通过优化聚合条件,从而合成出具有理想物理、化学性能及表面性能的均匀聚合物微球。同时聚合物微球的制备方法已比较成熟和完善,因此荧光分子物理吸附或化学结合于微球表面是制备荧光微球的一种相当具有吸引力的方法。国内外的多数研究报道也从这种方法着手<sup>[13-17]</sup>,而这其中的一个重要工作就是表面功能化微球的制备。

表面功能化微球的制备有多种方法:乳液聚合<sup>[18-19]</sup>、种子聚合<sup>[20]</sup>、分散聚合<sup>[21-22]</sup>、无皂乳液聚合<sup>[23]</sup>等。聚合可选用的单体也是多种多样的,如丙烯酸或丙烯酸酯系列、苯乙烯及它们之间几种单体的共聚等。因为聚苯乙烯微球具有生物惰性、不被一般的溶剂溶解或溶胀、粒子大小可控、比表面积大、吸附性强、凝聚性好、表面反应活性高,对一些诸如蛋白质、染料、亲配位体等物质具有好的结合能力,很适合用作邻近闪烁分析中荧光物质的载体。国外一些产品也选用了苯乙烯为单体制备荧光微球。根据国内外一些工作者的研究,发现微球的尺寸控制在微米数量级是比较合适的。在这个数量级下,荧光微球的表面积可以固定足够多的荧光分子及受体分子,最大限度地吸收辐射能量,从而产生能够为仪器所检测到的光信号;同时,又不至于因为微球过大、过重而沉降出来,此时微球表面积与质量的比率达到了一个较好的平衡。因此制得微米级的聚合物微球就是目标。

制得聚合物微球后,将其加入荧光物质的有机溶液中,在一定温度下搅拌,使荧光分子物理吸附或化学键合到微球表面,然后分离除去未吸附的荧光分子、少量的游离乳化剂和引发剂碎片离子,最后将产物重新分散到溶液中即可。

表面物理吸附或化学键合了荧光分子的聚合物微球,其上剩余的官能团可与生物分子上的官能团发生化学键合反应,从而产生牢固的结合。例如微球上的氨基可用戊二醛偶合,再与蛋白上的氨基键合;微球上的羟基可与生物分子上的羟基反应,或与溴化氰生成亚胺,再与生物分子上的氨基键合,等等。需要时,已接上荧光分子的高分子微球也可接上一段较长的连接臂,使荧光微球与生物分子连接时不会因臂短而产生构象障碍或导致失活<sup>[14]</sup>。

为了提高检测的灵敏度,希望微球表面结合的荧光分子尽可能多一些,以提高荧光强度。然而这样荧光分子会占据微球表面过多的活性位置,使后续的配体分子与微球的结合效率不高。微球表面若不能带上足够的配体分子,检测灵敏度难以得到真

正的提高。为了解决这一矛盾,可以采用先在纳米级的聚合物小微球上结合荧光分子,然后将此种荧光小微球结合到微米级的大微球上,以实现荧光信号的放大。同时,结合到同一大微球上的纳米小微球可用不同数量和种类的荧光分子对其进行染色,从而可以控制荧光微球的激发波长、发射波长和荧光强度,进而使在同一混合物中进行多靶点筛选成为可能<sup>[16]</sup>。

## 2.2 荧光分子包埋于微球内部

如前所述,荧光物质直接物理吸附或化学键合于微球表面,虽然制备方法比较简单、成熟,但荧光分子有可能占据过多的活性位置,使生物活性大分子难以结合到微球表面或导致生物活性大分子失活。此外,荧光分子暴露在外,容易受到外界环境及介质的影响,使检测的准确性及重现性不佳,而将荧光分子包埋于微球内部可以提高检测效果。

### 2.2.1 荧光物质直接包埋于微球内部

如果所用的荧光材料为惰性,那么可利用聚合反应、天然或合成高聚物形成微胶囊或分子自组装等方法将均匀分散在介质中的荧光物质包埋于聚合物中,制备出荧光微球。Xerox公司<sup>[24]</sup>及Molecular Probes公司<sup>[25]</sup>都对这种合成荧光微球的方法作了一些研究,制备出的荧光微球的特点是其中包含了多种荧光材料,可发射出多个荧光信号。而通过原位包埋方式可将稀土铕(III)离子作为荧光探针引入一种含纳米级管状空腔的新型有机聚硅氧烷中,形成超分子包埋体系。这种结构使其能发生一种典型的能量转移过程,即有机聚硅氧烷吸收的光能可转化为铕(III)离子的可见荧光而发射出来<sup>[26]</sup>。

### 2.2.2 荧光材料与单体共聚形成微球

若荧光分子上带有可聚合基团,那么它能与一些合适的单体共聚以制备荧光微球<sup>[27]</sup>。如丹酰烯丙基胺就是这样一种可聚合的荧光物质,它可与丙烯酸酯类等单体共聚形成高荧光量子产率、稳定的荧光微球。另外,也可利用种子聚合合成具有核/壳结构的荧光微球,其中核层共价键合了荧光材料。

## 3 结束语

随着国际药物研究形势的发展,开发具有自主知识产权的新药已迫在眉睫。我国自然资源丰富,应用高效的药物筛选方法,利于从海洋生物、中药材植物资源中开发出具有自主知识产权的新药。鉴于荧光微球在高通量筛选中的重要作用,通过对荧光微球的制备方法及其载体与荧光物质的相互作用的研

究,制备出更稳定及具有更高量子效率和光谱范围的荧光微球,扩展荧光微球的品种,使药物筛选朝更微量、自动化、灵敏化方向发展。

### 参考文献

- [1] Watling K J, Milius R A, Williams M. [J]. *Neurotransmissions*, 1997, 13:1-7.
- [2] Broach J R, Thorner J. [J]. *Nature*, 1996, 384(Suppl):6604-6606.
- [3] Ivanov I, Schaab C, Planitzer S, *et al.* [J]. *Pharmacogenomics*, 2000, 1(2):169-178.
- [4] 黄家学, 胡娟娟, 杜冠华. [J]. *中国药理学通报*, 1999, 15(5):401-403.
- [5] 杜冠华, 胡娟娟, 夏丽娟. [J]. *药学报*, 1998, 33(11):876-879.
- [6] Jaramillo T F, Ivanovskaya A, McFarland F W. [J]. *J Comb Chem*, 2002, 4(1):17-22.
- [7] Bosworth N, Towers P. [J]. *Nature*, 1989, 341:167-168.
- [8] Sidney U, Louise G, Nathan N. [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 161:494-497.
- [9] Immunex Corporation. Immediate ligand detection assay [P]. US 4568649, 1986-02-04.
- [10] Deveci D, Egginton S. [J]. *Experimental Physiology*, 1999, 84(4):615-619.
- [11] Raab S, Thein E, Harris A G, *et al.* [J]. *American Journal of Physiology (Heart and Circulatory Physiology)*, 1999, 276(5):1806-1810.
- [12] Kevin H S, Paul K, John F H. [J]. *Journal of American Chemistry Society*, 1999, 121:2123-2132.
- [13] 史国利, 马建标, 何炳林. [J]. *离子交换与吸附*, 1995, 11(5):431-435.
- [14] 赵艺强, 高海峰, 杨武利. 荧光标记的高分子微球及其制备方法 [P]. CN 1278534, 2001.
- [15] 中国科学院上海原子核研究所. 生物芯片检测中的分子放大 [P]. CN 1313404, 2001-09-19.
- [16] Luminer Corporation, *et al.* Microparticles attached to nanoparticles labeled with fluorescent dye [P]. US 6268222, 2001-07-31.
- [17] Cheung. Fluorescent microspheres and methods of using them [P]. US 5132242, 1992-06-23.
- [18] 戴李宗, 刘凯卫. [J]. *高分子材料科学与工程*, 2000, 16(1):102-105.
- [19] 冯小兵, 李已明. [J]. *高技术通讯*, 1995, 5(1):43-47.
- [20] Shim Sang-Eun, Cha Yong-Jong. [J]. *Polymer Preprint*, 1997, 38(1):434-435.
- [21] Cao Kun, Li Bo-Geng, Pan Zu-Ren. [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1999, 153:179-187.
- [22] Bamnolker H, Margel S. [J]. *Journal of Polymer Science, Part A*, 1996, 34:1857-1871.
- [23] 邱东, 杨振忠. [J]. *高等学校化学学报*, 2002, 23(2):327-329.
- [24] Xerox Corporation. Core and shell matrix compositions and processes [P]. US 6214500, 2001-04-10.
- [25] Molecular Probes, Inc. Microspheres with fluorescent spherical zones [P]. US 5786219, 1998-07-28.
- [26] 许辉, 郑敏, 曹明. [J]. *中国科学(B辑)*, 1999, 29(3):273-278.
- [27] California Institute of Technology. Protein specific fluorescent microspheres for labelling a protein [P]. US 4326008, 1982-04-20. ■

(上接第 58 页)

发和应用。

沙特阿拉伯 King Fahd 石油矿业大学(KFUPM)与日本石油协作中心(JCCP)合作联合开发高苛刻度催化裂化(HS-FCC)工艺。该工艺在高苛刻度(高温)、短接触时间、高剂/油比下操作,采用特种催化剂和择形添加剂以及下流式反应器,已完成 0.2 桶/d 的中试。

Sabir 将于 2003 年在朱拜勒建成 Sabir 技术研发中心(STC-J)。该公司已开发了采用经磷改性的钼-铈-钒酸盐催化剂的乙烷联产乙烯和醋酸的新工艺。Sabir 已在延布建设 3 万 t/a 装置,于 2003 年开工。生产 20 万 t/a 醋酸的装置也可望 2004 年投产,以为 35 万 t/a 对苯二甲酸装置提供醋酸溶剂。

Sabir 公司还开发成功生产  $\alpha$ -烯烃的 Alpha-Sabir 工艺,并推向市场。截至 2002 年, $\alpha$ -烯烃生

产技术还掌握在少数几家公司(BP、壳牌化学、雪佛龙菲利浦斯化学、萨索尔和出光石化)手中,现在, Sabir 线性  $\alpha$ -烯烃(LAO)技术将参与世界竞争。Sabir 第一套 15 万 t/a LAO 装置正在沙特阿拉伯朱拜勒建设中,预计 2004 年上半年投产。 $C_{4-6}$  LAO 产品将供应给 Sabir 的子公司应用,其余提供给国内和国际市场需要。

中东地区石油和天然气出口到世界市场的潜力仍将增大,大力发展石油化工,石化产品瞄准世界尤其是亚洲和中国市场的态势也在不断增强,中国进口中东原油正在逐年增多,进口中东原油所占比例将由 2001 年的 56.2% 上升到 2010 年的 95%,由于中东石化产品成本价格较低,中国进口量也将增多。中东地区各国面向新世纪的发展战略将为中东经济的可持续发展创造机遇。■