

BCPDA 的合成及其在玻片表面的修饰

周灵君¹, 贺全国², 刘正春², 何农跃², 杨春¹

(1. 南京师范大学化学与环境科学学院, 210097, 南京)

(2. 东南大学教育部分子与生物分子电子学重点实验室, 210096, 南京)

[摘要] 合成了 4,7-二氯磺基苯-1,10-菲罗啉-2,9-二羧酸(BCPDA), 产物和中间产物均用红外光谱、核磁共振谱、元素分析进行了表征, 并将 BCPDA 联接到经过修饰的玻片表面, 结果表明 BCPDA 能够较好地与玻片表面的氨基偶联, 而且与 Eu^{3+} 形成了稳定的螯合物 Eu^{3+} -BCPDA, 表明其可对固相表面的分子进行标记, 通过捕获液相中的 Eu^{3+} 离子, 实现表面的可寻址定量时间分辨荧光分析。

[关键词] BCPDA, 螯合剂, 铕, 时间分辨荧光, 固相

[中图分类号] O626.3, **[文献标识码]** B, **[文章编号]** 1672-1292(2002)04-0001-04

0 引言

时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)是 20 世纪 80 年代初发展起来的一种新型非放射性超微量分析技术, 它灵敏度高、稳定性好、分析速度快、操作简便、无放射性污染, 可用于免疫分析、核酸分析及受体分析等分子生物学领域, 是目前生物医学研究和临床超微量生化检验中一项很有发展前途的实验手段^[1-4]。固相 TRFIA 是最新一代的 TRFIA 方法, 它以国外最新合成的 4,7-二氯磺基苯-1,10-菲罗啉-2,9-二羧酸(4,7-bis(chlorosulfonyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid, BCPDA)作为 Eu^{3+} 螯合剂, 以氮激光为激发光源, 所产生的荧光不仅具有很好的时间分辨性, 而且具有很高的光强度, 克服了原来的液相 TRFIA 需增强液、易受环境 Eu^{3+} 污染、只能液相测量等缺点, 简化了测量步骤, 提高了测量灵敏度。

基因芯片是最近几年兴起的一场多学科交叉的新的科学技术革命。利用集成电路平面微加工技术和组合化学原理, 东南大学分子与生物分子电子学实验室近年在 DNA 芯片的原位合成和应用方面取得了进展^[5-9], 但在应用所制备的基因芯片对荧光染料标记的靶序列进行分析时, 常常因背景干扰而严重影响分析结果的可靠性。这种干扰主要来自于基片及所含杂质对激发光的反射和散射, 随不同材质或批次而不同, 与激发光同步存在。因此, 若能实现时间分辨检测将可去除背景, 显著提高分析结果的信噪比, 从而保证结果的可靠性。为此, 我们试图将固相 TRFIA 技术应用于基因芯片分析, 以实现基片表面的多位点可寻址时间分辨并行分析, 提高对靶序列高通量分析的可靠性。实现这一目标的途径是将可与 Eu^{3+} 形成具有时间分辨荧光特性螯合物的多环配体螯合剂联接到 DNA 靶序列上, 当基因芯片上的 DNA 探针微阵列与靶序列结合后, 靶序列上联有的螯合剂就可捕获溶液中的 Eu^{3+} 离子, 经洗涤除去非特异性吸附的 Eu^{3+} 离子后, 通过检测基因芯片上具有时间分辨荧光特性位点的位置和相应的荧光强度, 便可实现基因芯片的时间分辨定性和定量分析。

然而, 要建立基因芯片上的固相 TRFIA 分析方法及相应的测量系统, 前提是需要选用合适的具有

收稿日期: 2002-09-25.

基金项目: 教育部国家重点实验室访问学者资助项目(2000)和江苏省高新技术资助项目(BG2001010).

作者简介: 周灵君, 女, 1977-, 南京师范大学化学与环境科学学院硕士研究生, 主要从事物理化学的学习与研究。

通讯联系人: 杨春, 女, 1959-, 博士, 南京师范大学化学与环境科学学院研究员, 主要从事物理化学的教学与研究。

时间分辨荧光功能的整合剂以及有效地将其共价连接在靶序列上. 为此, 本文参照文献^[4~6,13]报道的方法并作了条件优化, 合成了稀土离子整合剂 BCPDA, 并成功地把 BCPDA 联接到了经过修饰的玻璃片表面, 为实现玻璃片表面核酸标记和寡核苷酸微阵列对靶序列的时间分辨荧光分析提供了可能.

1 实验部分

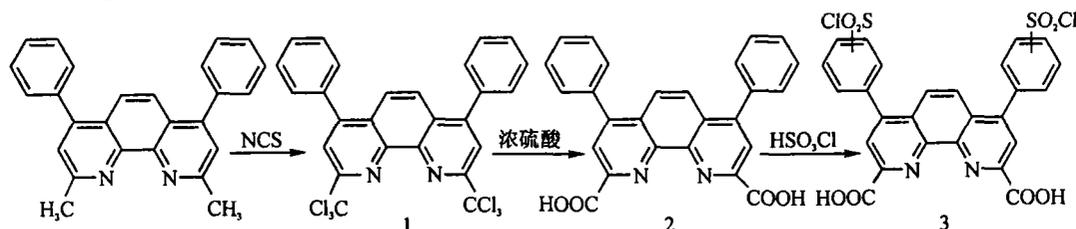
1.1 主要试剂与仪器

主要试剂: 2,9-二甲基-4,7-二苯基-1,10-菲罗啉, Acros 公司; N-氯代琥珀酰亚胺 (NCS), Avocado 公司; 氯磺酸, 上海亭新化学试剂厂; 氨丙基三甲氧基硅烷 (505 型氨基硅烷), 南京化学试剂厂; 戊二醛, 25% 水溶液, 中国医药(集团)上海化学试剂公司; 帆船牌国产载玻片 (25.4 × 76.2 mm); 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PB) 自制; NaBH₄ 溶液 (0.4 g NaBH₄, 38 mL 0.01 mol/L PB, 12 mL 95% 乙醇) 自制; 其它均为市售分析纯试剂.

主要仪器: X-4 显微熔点测定仪 (数显), 北京泰克仪器有限公司; AVATAR 360 型傅立叶变换红外光谱仪 (溴化钾压片法), Nicolet 公司; Perkin-Elmer 2000 元素分析仪; FX-90Q 核磁共振仪; PHI-550 型多功能电子能谱仪 (XPS), 美国 PHI 公司.

1.2 BCPDA 的合成

稀土离子整合剂 BCPDA 参照文献^[3,4]合成, 合成路线如下:



1.3 BCPDA 在玻片表面的联接

1.3.1 玻片清洗及表面的修饰

1:1 浓盐酸: 甲醇浸泡 30 min, 蒸馏水充分清洗, 吹干; 浓硫酸浸泡 2 h, 去离子水洗涤, 150℃ 干燥 8 h; 2% 氨丙基三甲氧基硅烷丙酮溶液水浴回流 2 h, 丙酮、95% 乙醇和蒸馏水充分清洗, 115℃ 干燥 6 h; 5% 戊二醛的 0.01 mol/L PB 溶液浸泡 2 h, 蒸馏水清洗 4 次, 吹干; 10% 乙二胺 (或己二胺) 无水乙醇溶液浸泡 2 h, 蒸馏水清洗 4 次, 吹干; NaBH₄ 溶液还原 40 min, 蒸馏水充分洗涤, 吹干, 得到表面修饰有氨基的玻璃基片.

1.3.2 BCPDA 在玻片表面的联接

上述修饰的玻璃基片用 6.5×10^{-4} mol/L BCPDA 的 DMF 溶液浸泡 3 h, 吹干; 1×10^{-5} mol/L Eu³⁺ 水溶液 37℃ 温育 100 min, 0.05% Tween 20 洗涤, 蒸馏水清洗, 吹干. 联接 BCPDA 后的玻片进行 XPS 表征分析.

2 结果与讨论

2.1 整合剂 BCPDA 的合成与表征

实验中发现, 制备的产物 3 极易水解, 在 40℃ 条件下保温 2 h 即可完全水解. 这是其含有氯磺酰基的缘故, 也初步表明成功得到了目的产物. 为了防止水解, 反应完成后我们立即对产物进行了低温快速抽滤并真空干燥, 然后避光保存在 -20℃ 备用. 为了证实产物 1、2、3 的结构, 我们进行了多种结构表征分析.

表 1 列出了合成产物 1、2、3 的熔点实测值和它们的元素分析结果, 均与理论值一致.

表1 各产物熔点及元素分析结果

产物	熔点/℃		元素分析结果/%	
	实测值	文献值 ^[3]	实测值	理论值
1	268~274	268~273	C 55.52, H 2.47, N 5.02	C 55.06, H 2.49, N 4.94
2	202~206	204~210	C 74.35, H 3.74, N 6.54	C 74.28, H 3.84, N 6.66
3	>300	>300	C 50.11, H 2.30, N 4.26	C 50.58, H 2.28, N 4.54

表2给出了产物1、2、3红外光谱特征吸收带的频率.由表可见,对于中间产物1由于尚未引入羧基,因而其红外光谱中没有出现表征羧基当中羟基和羰基的 3450 cm^{-1} 和 1740 cm^{-1} 特征吸收带;而在相应于中间产物2的红外光谱中观察到了 3450 cm^{-1} 和 1740 cm^{-1} 特征吸收带,表明羧基已经引入;在相应于终产物3的红外光谱中出现了表征氯磺酰基特征吸收的 1175 cm^{-1} 吸收带,证实了终产物3中氯磺酰基的存在.这些特征吸收带的频率与文献报道的结果是一致的.

表2 红外吸收光谱

产物	羟基特征吸收/ cm^{-1}		羧基特征吸收/ cm^{-1}		氯磺酰基特征吸收/ cm^{-1}	
	实测值	文献值 ^[4]	实测值	文献值 ^[3]	实测值	文献值 ^[3]
1	-	-	-	-	-	-
2	3450	3450	1740	1740	-	-
3	3450	3450	1731	1730	1175	1180

为进一步验证中间产物和终产物的结构,我们测定了产物1、2、3的 ^1H 核磁共振图谱,相应的化学位移值列于表3,并与文献值进行了对比.结果表明,各产物图谱上 ^1H 共振峰的化学位移值和强度与文献报道的结果一致,进一步证实了产物1、2、3为预期产物.

表3 ^1H -核磁共振 $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}]$ 结果

产物	化学位移实测值/ $(\times 10^{-6}\text{ m})$			化学位移文献值 ^[3] / $(\times 10^{-6}\text{ m})$		
	7.54(m,10H)	7.96(s,2H)	8.24(s,2H)	7.56(m,10H)	7.98(s,2H)	8.27(s,2H)
1	7.54(m,10H)	7.96(s,2H)	8.24(s,2H)	7.56(m,10H)	7.98(s,2H)	8.27(s,2H)
2	7.62(m,10H)	7.96(s,2H)	8.22(s,2H)	7.63(m,10H)	7.99(s,2H)	8.25(s,2H)
3	7.60~7.65(m,4H)	7.80~7.86(m,4H)	8.02~8.13(m,2H)	7.61~7.67(m,4H)	7.83~7.87(m,4H)	8.30~8.33(m,2H)

2.2 玻片表面 BCPDA 的连接

产物3(BCPDA)能否有效地联接于固体基片上,是实现基因芯片可寻址定性定量时间分辨荧光分析的关键步骤,为此我们模拟 BCPDA 与寡核苷酸片段-NH₂间的反应,考察了 BCPDA 与-NH₂修饰的玻璃基片之间的联接和捕获溶液中 Eu³⁺离子形成稳定螯合物的情况,并用 XPS 进行了分析表征.表4列出了相应的 XPS 谱带特征峰中心的结合能(即 B. E. /eV)及所得到的元素百分含量.由表4可知,对只经过氨丙基三甲氧基硅烷修饰的载玻片(参见表4中“未处理”方法),经 BCPDA 处理后并未检测到元素 S 和 Eu. 如果对经氨丙基三甲氧基硅烷修饰过的玻片再进行戊二醛和乙二胺或己二胺分子改性(参见表4中“乙二胺”和“己二胺”处理方法),经 BCPDA 处理后表面皆可检测到 S 与 Eu 的存在.

表4 玻片表面 BCPDA 的 XPS 结果

玻璃基片处理方法	原子百分数与结合能	C _{1s}	O _{1s}	N _{1s}	Si _{2p}	S _{2p}	Eu _{3d5/2}	Cl _{2p}
未处理	Atom/%	26.52	51.98	0.84	20.65	0	0	0
	B. E. /eV	284.30	530.75	398.70	101.55	NA*	NA	NA
乙二胺	Atom/%	35.44	44.34	2.54	16.07	0.60	0.30	0.69
	B. E. /eV	283.69	530.76	397.94	101.06	167.74	1134.0	197.99
己二胺	Atom/%	36.80	43.30	2.67	15.48	0.67	0.23	0.85
	B. E. /eV	284.34	531.65	398.78	102.27	167.51	1133.6	197.85

* NA: No absorption was detected.

上述结果表明,如果只经过氨丙基三甲氧基硅烷修饰,氨基的空间活动范围小,而 BCPDA 分子又

较大,受空间阻碍的影响,BCPDA 不能与玻璃基片表面的氨基结合;当再进行戊二醛和乙二胺或己二胺分子改性后,氨基活动空间将明显增大,使得 BCPDA 分子能够较好地与玻璃基片表面的氨基联接而被固定到玻片表面,并且结合的 BCPDA 能够有效地螯合溶液中的 Eu^{3+} 离子,形成 Eu^{3+} -BCPDA 螯合物.在进行基因芯片 DNA 探针微阵列的原位合成时,玻璃基片同样要经过“氨丙基三甲氧基硅烷→戊二醛→乙二胺(或己二胺)”的修饰改性过程^[5~7],然后再进行 DNA 探针微阵列的原位合成.显然,这样得到的 DNA 微探针的活动空间将类似于本文表 4 中“乙二胺”或“己二胺”处理方法所得氨基的活动空间,这些微探针特异性结合的 DNA 靶序列也将具有大的活动空间,足以使 BCPDA 能够联接其上.因此,本文报道的结果为将 BCPDA 应用于基因芯片的可寻址高通量定性和定量时间分辨荧光分析奠定了基础,深入的研究正在进行之中.

[参考文献]

- [1] Diamandis E P. Immunoassays with time-resolved fluorescence spectroscopy: principles and applications[J]. Clin Biochem, 1988, 21: 139.
- [2] Hurskainen P, Dahlen P, Siitari H, *et al.* Time-resolved fluorometry: Principles and application to clinical microbiology and DNA technology[J]. Adv Exp Med Biol, 1990, 263: 123.
- [3] Ramon A Evangelista, Alfred Pollak, Brian Allore, *et al.* A new europium chelate for protein labelling and time-resolved fluorometric applications[J]. Clin Biochem, 1988, 21: 173~178.
- [4] 韩玲,陈杞,陈雄. 固相镧系荧光免疫螯合剂 BCPDA 的合成及其荧光特性[J]. 解放军第二军医大学学报, 1993, 14(2): 170~173.
- [5] 肖鹏峰,陆祖宏,刘正春,等. DNA microarray synthesis by using PDMS molecular stamp (III)—optimizing for the reaction conditions[J]. 科学通报, 2002, 47(3): 189~192.
- [6] Xiao Pengfeng, He Nongyue, He Quanguo, *et al.* DNA microarray synthesis by using PDMS molecular stamp (II)—oligonucleotide on chip synthesis using PDMS stamp[J]. Science in China Series B, 2001, 44(4): 442~448.
- [7] 王秩文,徐吉庆,陈扬,等. 电解质酸脱保护 DNA 在片合成研究[J]. 东南大学学报(自然科学版), 2002, 21(1): 77~80.
- [8] 何农跃,陆祖宏,贺全国,等. 嵌入式生物芯片[P]. 中国专利: ZL01237912. 2002. 02. 20.
- [9] H Wang, J Li, H Liu, *et al.* Label-free hybridization detection of a single nucleotide mismatch by immobilization of molecular beacons on an agarose film[J]. Nucl Acids Res, 2002, 30: e61.

Synthesis of Time-resolved Fluorescent Chelator BCPDA and its Conjugation onto Glass Slides

Zhou Lingjun¹, He Quanguo², Liu Zhengchun², He Nongyue², Yang Chun¹

(1. College of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, PRC)

(2. Key Lab for Molecular and Biomolecular Electronics of Ministry of Education, Southeast University, 210096, Nanjing, PRC)

Abstract: Time-resolved fluorescent chelator, BCPDA, has been synthesized in a three-step procedure. The element analysis results, infrared and nuclear magnetic resonance spectra were consistent with the structure of BCPDA. The BCPDA was coupled onto the surface of glass slides modified with amines. After incubation with Eu^{3+} solution, the complex of Eu^{3+} -BCPDA on slides was formed and implied the feasibility of time-resolved fluorescence multiple labeling and detection on solid-phase surface with DNA arrays.

Key words: BCPDA, chelator, Europium, time-resolved fluorescence, solid-phase

[责任编辑:孙德泉]