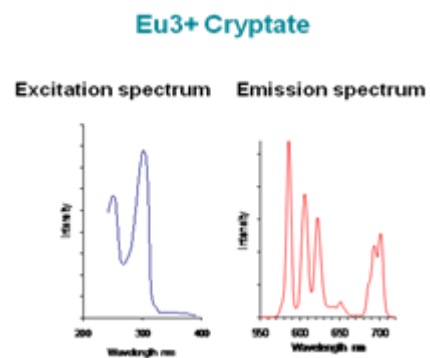


HTRF® 技术介绍

快速、稳定、不需洗涤、操作简单、易于自动化和微型化。上述优势使得 Cisbio 的 HTRF® 技术一直是药物研发领域的领先技术之一。该技术已经在知名医药公司、生物技术公司和学术研究机构应用了 10 年以上。

HTRF®（均相时间分辨荧光，Homogeneous Time-Resolved Fluorescence）是用来检测纯液相体系中待测物的一种常用方法，是研究药物靶标的理想平台。该技术结合了荧光共振能量转移（FRET，Fluorescence Resonance Energy Transfer）和时间分辨荧光（TRF, Time-Resolved Fluorescence）两种技术。这种结合将 TRF 的低背景特点和 FRET 的均相实验方式融合在一起，使得 HTRF® 技术拥有如下优势：实验方式灵活、可靠，并且具有更高的灵敏度、更大的通量，实验结果的假阳性率较低。虽然 HTRF® 也是基于 TR-FRET 的化学技术，但它的许多特点把它与其它 TR-FRET 产品区分开来。这些特点包括使用了镧系元素（铕和铽），从而具有非常长的半衰期，很大的 Stroke's shift（如右图所示，Eu3+ Stroke's shift > 300 nm）；同时，镧系元素与络合的穴相结合，这种结合的穴状物与其它所有 TR-FRET 产品使用的螯合物相比，显著增加了稳定性（可耐受低 pH 值、金属离子、DMSO、EDTA 等）；专利的比值测量能矫正淬灭和样品带来的干扰。



FRET 技术简介

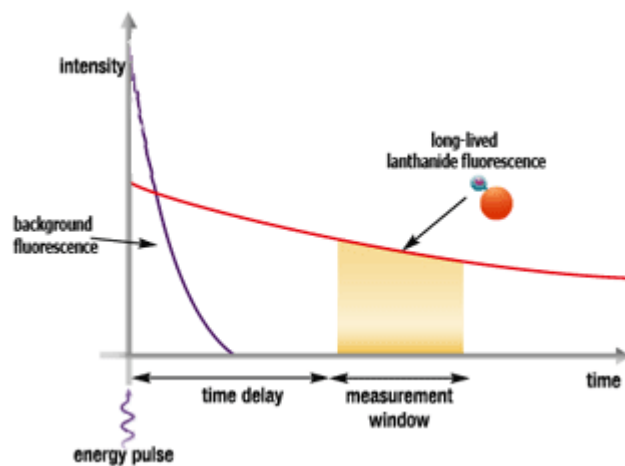
FRET 技术利用了两种荧光基团的能量转移，这两种荧光基团分别称为（能量）供体和（能量）受体。供体被外来能源激发（例如闪光灯或激光），如果它与受体在足够近的距离之内，可以将能量共振转移到受体上。受体受到激发，发出特定波长的发射光。

将供体和受体分别与相互作用的两个生物分子结合，生物分子的结合可以将受体和供体拉到足够近的距离，产生能量转移。由于受体分子的发射光来自于能量转移，所以在实验中不需要将未结合与已结合的分子分开，即不需要洗涤步骤。这种均相的实验方式操作简单，而且减少了实验时间和花费。

一般地，在 FRET 实验中使用的供体和受体是快速荧光基团，半衰期非常短。传统 FRET 技术的限制因素是由背景荧光引起的，其来自于样品成分，包括缓冲液、蛋白质、化合物和细胞裂解液。检测到的荧光强度必须对这些自发荧光进行校正，极大地影响了实验灵敏度，并使数据分析变得复杂。背景荧光非常短暂（寿命为纳秒级），可以利用时间分辨荧光方法将其去除。

TRF 技术简介

如前所述，在生物溶液或血清中的很多化合物和蛋白质是自发荧光的，利用传统的快速荧光基团进行检测极大限制了实验灵敏度。使用长寿命的荧光基团结合时间分辨的检测方式（在荧光激发和发射检测之间有一个时间延迟）可将快速荧光的干扰降到最低。



时间分辨荧光 (TRF) 利用稀土元素中镧系元素的独特性质。在 TRF 中常用的镧系元素是钐 (Sm)、铕 (Eu)、铽 (Tb) 和镝 (Dy)。与传统荧光基团相比，它们具有大的 Stoke's shifts 和非常长的发射半衰期（从微秒到毫秒），这使它们在生物学荧光应用领域中日益重要。

通过直接激发使镧系元素离子产生荧光是不容易的，因为这些离子很难吸收光子。镧系元素必须首先与有机分子形成复合物，有机分子收集光子并通过分子

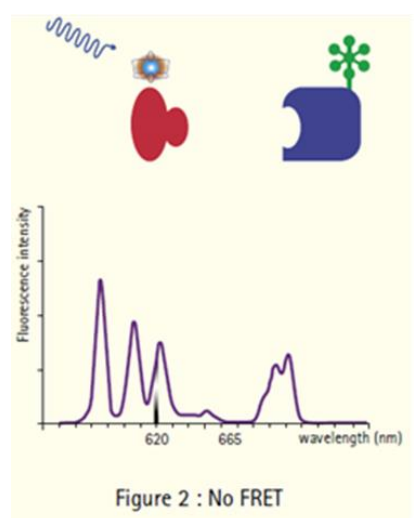
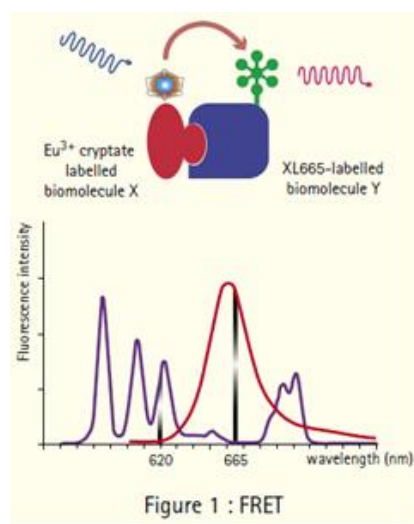
内非放射过程转移到镧系元素上。稀土元素螯合物和穴状化合物是能量收集装置的典型代表，它们收集能量并转移到镧系元素离子上，后者则发出其特征性的长寿命的荧光。

为了能够成功应用于生物学检测中，稀土元素复合物应该具有特定的性质，包括稳定性、较高的发射光产率，并且能够与生物分子连接。除此之外，当直接在生物溶液中反应时，能够耐受荧光淬灭就显得尤为重要。稀土元素螯合物稳定性较差，而且有的化合物可竞争螯合物活性基团，当与 FRET 技术结合在一起时其灵敏度也受到限制。如果稀土元素与穴状化合物结合，许多限制因素都可去除。

HTRF®技术的能量供体（Donor）和能量受体（Acceptor）

HTRF® 的供体是镧穴状化合物（Eu³⁺ cryptate）或 Lumi4™ 铽穴状化合物（Tb³⁺ cryptate），后者是近年与 Lumiphore 公司合作的结果，激发效率更高。两者的能量受体（Acceptor）均可为 XL665 和 d2。XL665 和 d2 激发波长为 620nm，发射波长为 665nm，位于红外光区，进一步降低了生物溶液对实验的影响（生物学成分很少在红外光区有自发荧光）。对于铽穴状化合物来说，其受体也可以是 Fluorescein、GFP 等发绿色荧光的分子，所以可以进行双标记测量。XL665 是改良过的别藻蓝蛋白（APC），将 APC 的亚基偶联，增加了稳定性。d2 是第二代受体，光谱学特征与 XL665 相同，但是分子量较小，约为 1KD，可减少空间位阻对实验的影响。

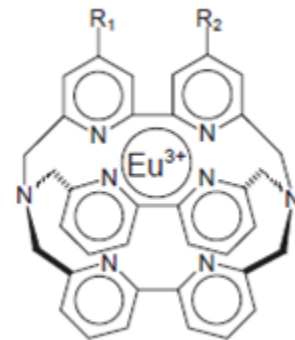
当由于生物分子相互作用导致两个荧光基团接近时，在激发时被穴状化合物捕获的部分能量



释放,发射波长为 620nm;另一部分能量转移到 XL665 或 d2,发射波长为 665nm。665nm 的发射光仅仅由 donor 引起的 FRET 产生。所以,当生物分子相互作用时,有两个激发光 620nm 和 665nm;当不存在相互作用时,只有 620nm 一个激发光(见右图)。

穴状化合物与螯合物

穴状化合物的形成是将一个阳离子纳入到一个立体笼中。笼能收集光然后将能量转移到核心的镧系元素。大环的性质有利于跟镧系元素紧密相连,这种不可破的连接会形成异常稳固的复合体。穴结构能耐受一些特殊的实验条件如大量存在的阳离子(Mg²⁺和 Mn²⁺等)、螯合物(EDTA)、溶剂或者温度。从 HTRF[®] 能应用到临床诊断(TRACE[®] 技术和 Kryptor[®]工作站技术)就能看出它也适用于浓度高的血清(50%)。在读板前或者孵育时加入氟离子能增强实验对大量化合物的抗干扰性。



专利号: US Patent US 5,527,684
由于在该结构上的贡献, Prof. J.M. Lehn's 在 1987 年获得了诺贝尔奖。

穴没有光漂白性,多次读数后信号没有损失,因此能按照需要的次数去读,所以可以进行动力学检测。

HTRF[®]技术的优势

- 背景低,化合物和培养基的干扰小
- 均相检测(不需要洗板),操作简单
- 实验稳定,对酸性溶液、Mg²⁺、Mn²⁺、DMSO、EDTA 比较耐受,并且读数稳定 24 小时以上,甚至可达 7 天
- 应用灵活多样
- 易于实现微型化

HTRF®的应用

HTRF®技术被广泛应用于细胞实验和生化实验，并应用于药物研发的不同阶段，从实验方法的建立、高通量筛选（HTS），lead 到 hit，到临床前研究。这是一种很灵敏且稳定的技术，可以使用 384 和 1536 孔板。自从 10 年前 HTRF®技术进入药物研发领域以来，研究者采用该技术加快了很多基于抗体的研究，包括 GPCR（受体配体结合，受体二聚化，cAMP 和 IP-1 的检测，以及磷酸化 ERK 的定量）、激酶、细胞因子和生物标志物、生物过程（抗体和蛋白生产）等，以及蛋白和蛋白、蛋白和多肽、蛋白和 DNA/RNA 相互作用的实验。HTRF®具有与 ELISA 同等的检测范围和检测极限，但是它不需要洗板，可以极大地减少实验时间，所以 HTRF®技术可以取代大部分 ELISA 实验，为均相 ELISA。

