

定性提高了,再与淋巴细胞融合,就能获得有活力的杂种细胞,融合率达50—80%。且杂种细胞可用显微镜直接确定,便于挑选出杂种细胞。

(5) 海胆卵^[18]

电诱导融合海胆卵时,溶液中加入有链霉白酶,也可提高对高电场的稳定性,2—3期的卵融合后,仍能受精并继续分裂。

(6) 脂质小泡

用电场诱导技术也能把脂质体融合成大泡^[13]。有趣的是中性类脂(即卵磷脂)制成的小泡也可融合,而用通常的融合方法是不能达到的。在一定条件下,通过电诱导融合,能形成大量圆柱形脂质泡,撤除电场后仍相当稳定。为此所加的电介质电泳频率为10MHz,且交流场强大于击穿场强。还有可能实现,利用适当的电场装置,把已诱捕有蛋白质的脂质体和平面双层膜融合,这将是把蛋白质结合到人工膜上的一种极妙的方法。

六、结 束 语

电场诱导技术已应用于融合多种细胞和人工膜系统。可以认为膜的固有电场的变化是细胞融合的原初过程。应用电融合技术的同步性,结合电镜和荧光光谱工作,有可能进一步弄清细胞融合的机制。因为电诱导融合条件温和,融合率高,除用于膜研究外,还可广泛地应用于种植业、微生物工业和医药业。

本文承中国科学院生物物理所江丕栋副研究员 审

阅,特致谢意。

参 考 文 献

- [1] Zimmermann, U. and Vienken, J.: *J. Membrane Biol.*, 1982, 67, 165—182, 1982.
- [2] Zimmermann, U.: *Biochim. Biophys. Acta*, 694, 227—277, 1982.
- [3] 陈瑞铭等译:《杂种细胞》,科学出版社,1982.
- [4] 上海植物生理所细胞室编译:《植物组织与细胞培养》,上海科学技术出版社,1978.
- [5] Zimmermann, U. et al.: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 7, 553—574, 1980.
- [6] Pethig, R.: *Dielectric and electronic properties of biological materials*, John Wiley and Sons, Chichester, New York, 1979.
- [7] Pohl, H. A.: *J. Biol. Phys.*, 1, 1, 1973.
- [8] Schwan, H. P. and Sher, L. D.: *J. Electrochem. Soc.*, 116, 22c—26c, 1969.
- [9] Holzapfel, C. et al.: *J. Membrane Biol.*, 67, 13—26, 1982.
- [10] Zimmermann, U., Scheurich, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, 641, 160—165, 1981.
- [11] Vienken, J. et al.: *Physiol. Plant.*, 53, 64—70, 1981.
- [12] Scheurich, P. et al.: *Plant Physiol.*, 67, 849—853, 1981.
- [13] Zimmermann, U., et al.: *Angew. Chem.* 93, 332—351 and *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 20, 325—344, 1981.
- [14] Scheurich, P. and Zimmermann, U.: *Naturwissenschaften*, 68, 45—46, 1981.
- [15] Kramer, I. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 772, 407, 1984.
- [16] Pilwat, G., et al.: *FEBS Lett.*, 133, 169—174, 1981.
- [17] Zimmermann, U. et al.: *Naturwissenschaften*, 68, 577—578, 1981.
- [18] Richer, H. P., et al.: *Develop. Growth Differ.*, 23, 479—486, 1981.
- [19] 汪和陆,鲁玉瓦:《科学通报》,5, 382—384, 1985.

[本文于1984年4月16日收到]

自旋免疫方法及其应用

赵保路 张建中

(中国科学院生物物理研究所,北京)

免疫学是生物学中发展最快的学科之一。近几十年,它在基础理论和实际应用方面都取

得了进展,诸如免疫电泳、免疫荧光、放射免疫等技术。本文介绍一种新的技术——自旋免疫

法。

一、基本原理

自旋免疫类似于放射免疫。它是用具有顺磁性的自旋标记化合物代替放射性的化合物作为标记物。它不用 γ 闪烁计数器,而是用 ESR 波谱仪检测抗原抗体结合。所谓自旋标记化合物,即含有某种氮氧自由基的化合物。自由基中氮原子的 $2P_z$ 轨道上有一未成对电子,可观察到 ESR 信号。当自旋标记化合物半抗原未和抗体结合时,分子运动是自由的,其 ESR 谱为三条等强度、等距离的锐线(图 1 a);但它与抗体结合之后,分子运动受到阻碍,则呈现强固定化 ESR 波谱(图 1 b)^[1,2]。与放射免疫法相比较,自旋免疫法具有快速、简便、所需样品少及经济等优点。其缺点是灵敏度较放射免疫法低。

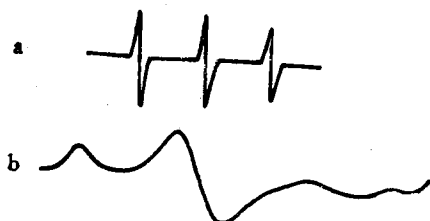


图 1 自旋标记化合物半抗原的 ESR 谱

a: 未与抗体结合的 ESR 谱。b: 与抗体结合的 ESR 谱。

二、自旋免疫测定法

与抗体结合的和自由的自旋标记半抗原的 ESR 共振峰可以很好地分开。正是根据这一事

实建立了自旋免疫测定方法。在抗体与自旋标记半抗原的浓度合适时,二者形成复合物,它对于溶液中存在的标准的和未知的半抗原很灵敏。因此,标记的半抗原被未知物的取代,可以用一个标准曲线测定。

Leute 等人根据这个原理,发展了咖啡的快速自旋免疫测定法^[2]。用在临床上,它比薄层层析法灵敏得多。用自旋免疫法和平衡透析法在纯种鼠骨髓瘤蛋白-315 和自旋标记二硝基苯配位基模型体系上作了对比实验。结果表明自旋免疫测定法比平衡透析法简单,特异性强,与抗体结合的和自由的自旋标记的 ESR 谱可以清楚地分开(图 2)。自旋标记的浓度可以用 m_{-1} 峰的强度精确地测量。由图 2 a 可以看出,该自旋标记和非免疫球蛋白没有明显的非特异性的结合。但有蛋白质-315 存在时,由于它和自旋标记的结合, m_{-1} 峰变得比标准的低很多(图 3)。当大部分蛋白-315 的结合位置被饱和后, m_{-1} 峰强度的净增加和标准的趋于平行。所以标准的及有蛋白-315 存在时的 m_{-1} 峰强度之差是该蛋白质结合二硝基苯自旋标记的一个量度。用过量 DNP- ϵ -氨基己酸取代每个滴定点,或用 1% 三氯乙酸使蛋白质变性,都证实了这一假定。在各种情况下,有蛋白-315 存在时,用 m_{-1} 峰的强度测定自由配位基,其结果都与微观透析法一致^[3]。因可以说自旋标记半抗原滴定法相当于瞬时平衡透析测量法。

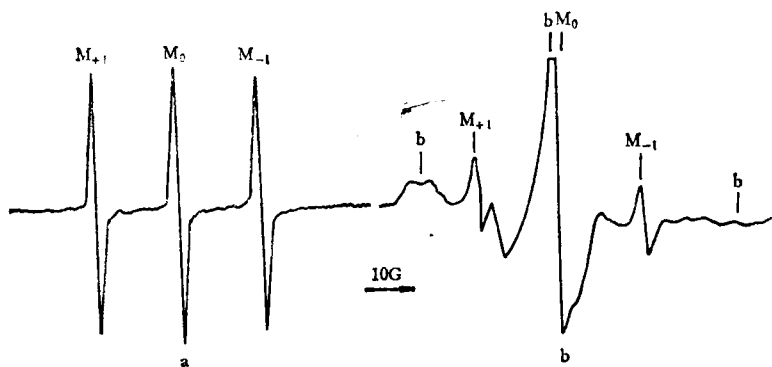


图 2 二硝基苯自旋标记化合物的 ESR 谱

a. 溶液中有 125 μg 非免疫球蛋白; b. 在溶液中含有 125 μg 蛋白-315, 标有 M_{+1} 、 M_0 和 M_{-1} 的峰为自由免疫球蛋白的信号, 标有 b 的峰是结合的免疫球蛋白的信号。

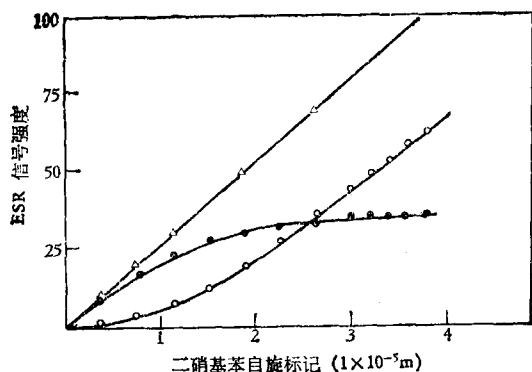


图3 用二硝基苯自旋标记 ESR 滴定蛋白-315 的
聚硝基苯结合位置得到的 ESR 强度-自旋标记浓度
曲线

△——△和○——○分别是有 55 μg 非免疫 γ 球蛋白 G 和有 55 μg 蛋白-315 存在时的 ESR 谱 M_{-1} 峰的强度, ●——● 为有 55 μg 蛋白-315 存在时结合于免疫球蛋白的 ESR 谱 b 的强度(图 2)^[3]。

根据上述实验结果绘制的 Scatchard 图,其线性斜率表明,蛋白质-315 的均一性和结合位置的数目 ($n = 1.9$) 与平衡透析测定的结果符合^[4]。而 Sips 作图还表明蛋白-315 上相应于硝基苯自旋标记的结合位置是均匀的。然而自旋标记的缔合常数 ($K = 7.0 \times 10^5 M^{-1}$) 明显地小于 ϵ -DNP-L 赖氨酸的缔合常数 ($K = 1 \times 10^7 M^{-1}$)。缔合常数减小可能是由于用吡咯氮氧自旋标记取代 L-赖氨酸引入的空间位阻造成的。和同源半抗原相比,自旋标记半抗原对蛋白质或抗体的低亲合性是一优点,因为这样同源半抗原比较容易取代自旋标记半抗原。

自旋免疫测定法的灵敏度在 10^{-6} — $10^{-7} M$, 比放射免疫法的灵敏度低。自旋免疫法适于测定水溶性配位基,而大部分生物配位基都是亲脂性的。为克服这两个缺点,又发展了一种自旋膜免疫测定法。

三、自旋膜免疫测定法

连接脂的抗原(致敏物)可以溶在脂双层的结构中,形成致敏化脂质体。根据这个建立了膜免疫测定法^[5]。脂质体是由同心的脂双层组成的,自旋标记物被捕集在含水的中间层中。一旦脂质体被致敏,就可特异地同抗体作用;若

补体存在时,由于特异补体的溶胞作用,标记物就被释放出来。类似放射免疫中的放射性半抗原和酶免疫中的酶活性,捕集了标记的致敏脂质体也象一个放大器。自旋膜免疫测定法用氮氧自由基做标记,用 ESR 检测,其原理和应用介绍如下。

自旋膜免疫测定法的关键是制备特异性的致敏化物。致敏化物是一种两性分子的衍生物,抗原通过共价偶合到它的极性端上。做为致敏化物它必须能够形成膜的一部分,并能使它的抗原部分突出到水相中,因而可以和特异抗体相结合。各种药物和生物物质可通过一个适当的偶合试剂共价联结到一大类两性分子上。这就克服了自旋标记半抗原在自旋免疫测定法中只适用于水溶性配位基的问题。把致敏化物接入膜最方便的方法就是用脂质体。当脂质体完全免疫时,即当它们包含一种适当致敏化物时,就可以同特异抗体作用。如果补体存在,特异补体的溶胞作用释放出捕集的标记物(图 4)。通过比较,使用包括葡萄糖、酶和自

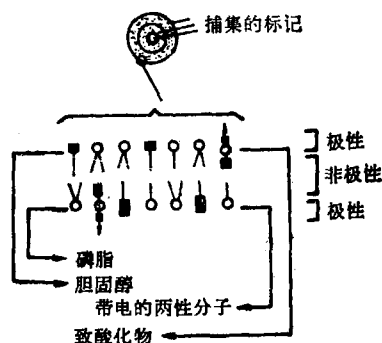


图4 免疫响应脂质体的图示^[6]

旋标记的各种标记物,结果发现自旋标记是脂质体免疫溶胞定量的最有效的标记物。捕集在脂质体水相中的自旋标记 TEMPO-胆碱的氯化物^[7],当其浓度很高时,出现一个加宽的弱信号(图 5)。当溶胞作用之后,自旋标记释放到溶液中,减小了局部浓度,消除了自旋交换作用,因而检测到尖而强的信号。波谱强度正比于从脂质体中释放出的自旋标记的数量。根据此信号强度的改变,就可精确地了解溶胞作用的程度。在测量抗原的含量时,把血清同一个

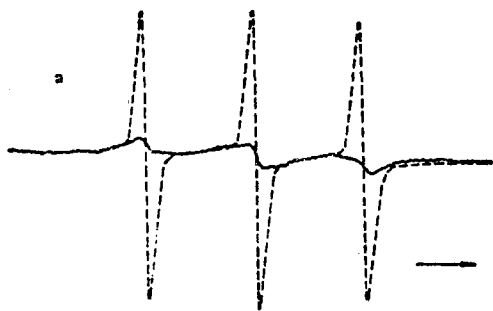
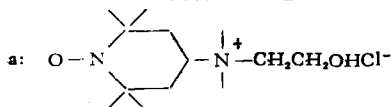


图5 含有氯化 TEMPO-胆碱的脂质体制备各物的典型 ESR 谱



氯化 TEMPO 胆碱

低振幅(实线)表示溶胞前的波谱;
高振幅(虚线)表示溶胞后的波谱^[1]。
箭头示长度 10 G

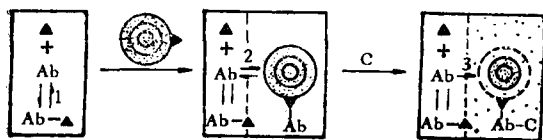


图6 自旋膜免疫测定法图示

小黑点皆表示自旋标记; ▲ 抗原; Ab 抗体; c 补体。第1、2步为可逆平衡过程; 第3步为不可逆过程^[1]。

水相抗原混合(标准的和未知的),如图6的第一步。为测定抗体被水相中抗原抑制的程度,要加入含高浓度自旋标记特异致敏化了的脂质体(第二步),然后用几内亚猪补体诱发与抗体相连的脂质体的补体溶胞作用(第三步)。溶胞作用的程度与水相中抗原的量成反比。

为了表明自旋膜免疫法的特异性和灵敏度,用 ϵ -DNP-乙酸-PE-致敏脂质体作为模型^[8]。两个结构类似的 DNP 衍生物(ϵ -DNP-己酸和 α -DNP-甘氨酸)能抑制几内亚猪血中的抗-DNP-抗血清产生的 ϵ -DNP-己酸-PE-致敏脂质体的免疫溶胞作用。有 2.5 μl 最适猪血清存在时, ϵ -DNP-己酸能强烈地抑制由 75 nl 抗-DNP-抗血清产生的免疫溶胞作用。抑制 50% 的免疫溶胞作用需要 $1.5 \times 10^{-8} \text{M}$ ϵ -DNP-氨基己酸和 $7 \times 10^{-8} \text{M}$ α -DNP-甘氨酸。然而与 ϵ -DNP-赖氨酸结构无关的 ϵ -丹磺酰赖氨酸和 0-硝基苯胺无抑制作用。

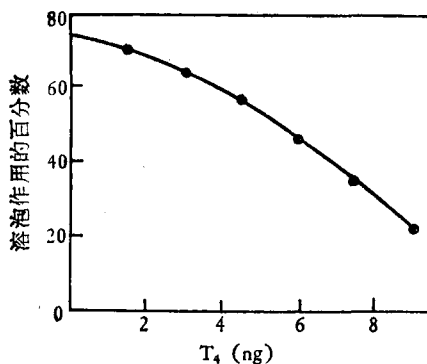


图7 用自旋膜免疫测定法得到的甲状腺素的标准抑制曲线^[1]

自旋膜免疫法的一个特殊应用的例子是甲状腺素 (T_4) 的测定^[5]。当 T_4 致敏物接入脂质体时,它们对免疫溶胞作用变得特别敏感。致敏脂质体的免疫溶胞作用取决于抗- T_4 、抗血清和补体的浓度。免疫溶胞作用是一个开和关的过程,当过量抗血清和补体存在时,就达到平稳状态。补体的热变性会使抗 T_4 、抗血清产生的 T_4 -致敏脂质体的免疫溶胞作用完全消失。免疫溶胞作用的抑制程度依赖于溶液中 T_4 的浓度(图7)。用自旋膜免疫测定 T_4 ,其灵敏度可与放射免疫法相比。

理想的临床免疫测定技术应是简单、特异、灵敏、经济、安全,并可能自动化,还能广泛地适用于测定各种化合物。放射免疫法基本可以满足上述要求,但此法缺点是分离自由的和与抗体结合的标记过程复杂而不经济。然而,自旋膜免疫法无此缺点,它既快速、简单、需要样品少(20 μl),又有可能实现全部自动化。自旋膜免疫也比放射免疫经济的多。同时它还能完成多重测定,因为不同的自旋标记和致敏物可以同时测定不同的抗原。

四、抗氮氧基自旋标记抗体的研究

近几年,McConnell 等人对直接抗氮氧自由基自旋标记的抗体进行了较系统的研究。将含氮氧基自旋标记的半抗原连到大分子抗原-蛋白质上,然后免疫动物,产生抗氮氧基自旋标记的抗体,再用含氮氧基自旋标记的磷脂分子致敏脂质体,作为检测抗体的特异抗原使用^[9]。

他们采用的半抗原一般都是碘乙胺自旋标记, 连接到羧基的血蓝蛋白上, 用它免疫兔子以产生抗体。检测用的致敏物是磷脂自旋标记化合物, 将它插入脂质体中, 其 ESR 波谱由三条尖峰组成, 超精细分裂常数为 15G。若用特异抗体培养 2 小时 (37℃), 就得到强固定化波谱, 波谱的最大分裂为 79 G, 这是由于氮氧基和特异抗体结合的结果。来自抗体的一个氢原子和氮氧基氧原子结合, 氢键导致氧原子上负电荷密度增加, 因而也就增加了氮原子上的自旋密度, 使超精细分裂加大。

用这一方法在人工膜上研究了影响自旋标记特异抗体 IgM 消耗补体 (c) 的各种因素^[10]。发现以下因素起着非常大的作用。

1. 膜表面上半抗原密度 在胆固醇-DPPC 膜中补体固定化效应随半抗原密度线性增加。单独使用 DMPC 或 DPPC 作膜体系时, 也观察到了这个效应。

2. 模型膜流动性 用 3, 6 和 10% M 的磷脂自旋标记, 在 32℃ 测定表明, IgM 对补体固定的效率在“流动性”的 DMPC 膜中比在“不流动”的 DPPC 膜中大一倍左右。

3. 胆固醇浓度 若在膜中包含 50% 胆固醇, IgM 对补体的固定效率远远大于在单独的 DMPC 和 DPPC 膜中。在 10% 半抗原浓度时, 在 DMPC、DPPC 和 50% 胆固醇+DPPC 中, IgM 对补体固定的有效性分别是 0.06、0.04 和 0.65。

另外, 半抗原分布的均匀性及 IgM 吸附到脂质体膜上的程度也在一定程度上影响 IgM 对补体的固定。

用此法和荧光技术结合研究了抗体和自旋标记半抗原在膜表面结合的动力学, 发现抗体有两个结合位置^[11]。

用这个方法还研究了自旋标记的脂质体激活嗜中性细胞与特异抗体的依赖关系。嗜中性细胞大约占总细胞的 50%, 它的主要功能是吞噬和杀死微生物。依赖特异抗体的靶物质的辨认是通过嗜中性细胞上的 FC 受体快速触发产生过氧负离子 $[O_2]^-$, $[O_2]^-$ 的突然产生有利

于杀死微生物, 同时为研究脂质体依赖特异抗体的辨认和触发提供了一个方便的实验方法。图 8 是嗜中性细胞释放过氧负离子产物和特异抗体浓度的关系^[12]。

由图 8 可以看出, 包含 0.01 M 氮氧自由基自旋标记的脂质体对嗜中性细胞的刺激是依赖抗体的。抗体浓度较高时, 由于抗体仅有一个 Fab 结合位置与膜结合, 这样就不能把构象转变到活化状态而导致嗜中性细胞的激活。这与结合到水溶液中的自由半抗原上的特异抗体不能激活嗜中性细胞是一致的。图 8 还指出, 类似补体的消耗, 在“流动”的 DMPC 和蛋卵磷脂膜中, 嗜中性细胞的激活明显地大于在“不流动”DPPC 膜中。但若 DPPC 包含 15—25% 胆固醇就大大提高了嗜中性细胞的激活。

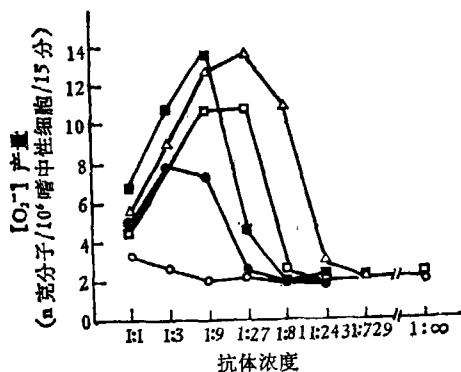


图 8 每 10^5 嗜中性细胞释放的过氧化物 (nm) 与特异抗氮氧基血清浓度的关系
●—● DMPC ■—■ Eggpc ○—○ DPPC
□—□ 15% Chol, 85% DPPC
△—△ 25% Chol, 75% DPPC

在反应混合物中 1:1 特异抗体浓度约 10^{-4} M/l。嗜中性细胞浓度是 2×10^6 细胞/l, 脂质体是 2×10^{-4} M/l 磷脂。半抗原浓度为总脂的 1M%^[12]。

用类似的方法, 他们还研究了半抗原致敏磷脂泡依赖抗体结合到 RAW 264 巨噬细胞上的动力学, 以及与泡表面抗体密度和泡成分之间的关系^[13]。巨噬细胞和覆盖着抗体的靶细胞之间的相互作用可以看做是细胞-细胞识别和触发的例子。在靶细胞上的抗原首先被特异抗体辨认, 结合抗体的 Fc 柄被巨噬细胞的 Fc 受体辨认, 接着触发靶细胞的吞噬作用或溶解作用。测量结合到 DPPC 或 DMPC 和 0.01 M

氮氨基自旋标记磷脂半抗原组成的脂质体上的特异抗体表明,在脂质体表面上,若抗体/暴露的半抗原比小于1:1,则结合到DMPC脂质体上的抗体比结合到DPPC脂质体的多。当抗体浓度降低时,这个差别消失。例如,当抗体/暴露的半抗原比为1:81时,在37℃有 $75 \pm 5\%$ 的抗体结合到这两种膜上。

当结合到包含半抗原磷脂泡上的抗体的量十分近似时,在37℃培养1小时后,与RAW 264巨噬细胞结合的DMPC泡比DPPC泡多。在抗体/暴露的半抗原为1:625时,有65%的DMPC泡与巨噬细胞结合,结合的DPPC只有5%。用荧光显微镜检查培养1小时的巨噬细胞,表明所有结合的脂质体都被吞噬进去,而且在细胞中仍保持原来的形状和大小。 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 细胞松弛素B只稍微减少磷脂和巨噬细胞的连接。在抗体/暴露的半抗原比为1:25时, $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的细胞松弛素B则能完全抑制DMPC磷脂泡的吞噬作用,但只能部分抑制DPPC泡的吞噬作用。

通过以上的讨论可以看出,自旋免疫方法

不论在临床应用上,还是在免疫学基础理论研究上都可以发挥作用。随着ESR波谱技术的普及,将会得到更广泛的应用。

参 考 文 献

- [1] Berliner, L. J. ed. *Spin Labeling II*, Academic Press, New York, 1979.
- [2] Leute, R. K. et al.: *Nature* (London), **236**, 93, 1972.
- [3] Hsia, J. C. et al.: *J. Immunological Methods*, **3**, 17, 1973.
- [4] Underdown, B. J. et al.: *Biochem.*, **10**, 4359, 1971.
- [5] Hsia, J. C. et al.: *Annals of The New York Academy of Sciences*, **308**, 139, 1978.
- [6] Kinsky, S. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 1, 1972.
- [7] Krudson, K. C. et al.: *J. Immunol.*, **106**, 258, 1971.
- [8] Six, H. R. et al.: *Biochem.*, **13**, 4050, 1974.
- [9] Gillian, M. K. et al.: *Biophys. J.*, **16**, 275, 1976.
- [10] Gillian, M. K. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 3537, 1977.
- [11] Parce, J. W. et al.: *Phys. Chem.*, **83**, 3414, 1979.
- [12] Hafeman, D. G. et al.: *Biochem. Biophys. Research. Commun.*, **86**, 522, 1979.
- [13] Lewis, J. T. et al.: *Biochem.*, **19**, 1537, 1980.

[本文于1983年10月10日收到]

脑电信号的计算机频谱分析

刘国松 周佳音*

(中医研究院中心实验室生理研究室,北京)

由于脑电(EEG)信号的复杂性以及观察者在分析脑电变化时的主观性,使得有时脑电中有重要生理意义的信息被忽略掉,或者受到误解。因此,探讨脑电的精确而客观的分析法,如用计算机进行辅助分析,就有着重要的理论和实际意义^[1]。

在计算机分析脑电信号的过程中,一般先要做脑电信号的频率域分析。其最常用的方法是将原始脑电信号先经模/数转换,而后对此离散时间序列信号作快速富里叶变换(FFT),计算其功率谱。但这种常规的计算方法有一定的

缺欠,例如,对其结果不易精确分析,对EEG功率谱的描述不能定量,以及不能处理长时程信号等。为了改进EEG的频谱分析法,我们最近编制了一种新的脑电频率分析程序,利用这种程序可在计算机上同时处理两道脑电信号,每道可连续(或间断)分析8个不同时间节段的EEG信号。分析结果可用 δ 、 θ 、 α 、 β_1 和 β_2 5种常规EEG频带信号的绝对强度和相对百分比两种型式表示。这样,不仅可以分析长时程

* 客籍副教授