

生物、化学发光分析及其在生物化学中的应用

康 建

(沈阳军区总医院检验科)

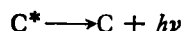
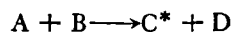
朱 忠 勇

(福州军区总医院)

近年来,生物、化学发光作为一种重要的研究方法和实验手段,在生物化学领域中得到广泛应用。1978年和1980年召开的生物、化学发光专题国际讨论会,充分肯定了发光分析法在生化分析和生物医学研究中的应用价值。本文拟就生物、化学发光原理、仪器、分析技术以及在生物分析研究中的应用作一简要综述。

一、基本原理

生物、化学发光是由一个反应体系中 A、B 两种物质,经化学反应生成一种激发态的产物(C*)。在它回到基态时,剩余能量转变成光子(能量 $h\nu$)产生发光现象。其反应为:



化学发光的量子效率以 Φ 表示:

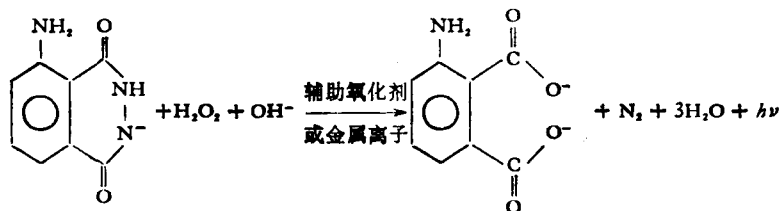
$$\Phi = \frac{\text{光子数}/N}{\text{反应物 A 或 B 的 mol 数}}$$

N 为阿伏加德罗常数;

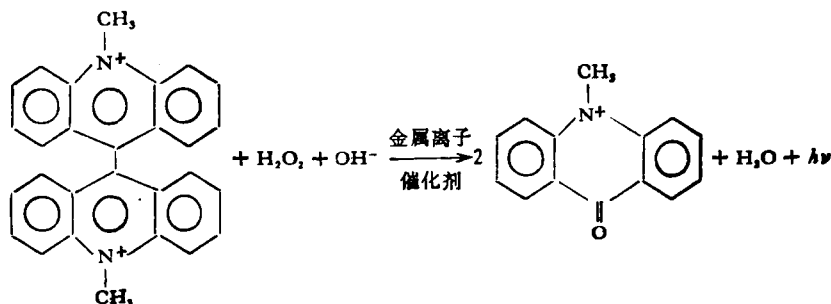
发光反应分以下几类:

1. 化学发光 用作液相化学反应并伴有辐射弛豫的化学试剂,常用的有 Luminol (氨基苯二酰肼)、Lucigenin(联 N -甲基吡啶硝酸盐)和 TCPO(双 2, 4, 6-三氯苯基草酸盐)三种,它们均能与强氧化剂(H_2O_2)偶联发光。

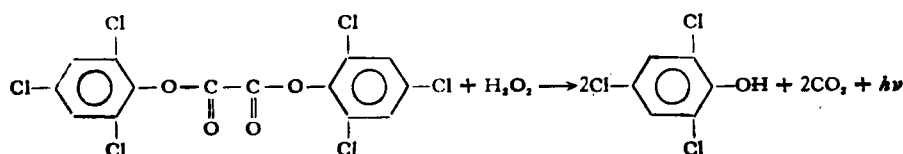
(1) Luminol 发光:



(2) Lucigenin 发光:

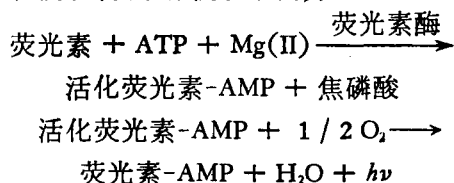


(3) TCPO 发光:

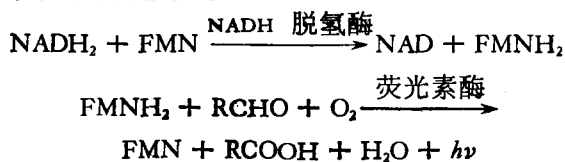


2. 生物发光 是产生于生物体系中的化学发光。这些生物包括某些细菌、真菌、原生动物、蠕虫及甲壳动物等。大致分为四种反应类型：

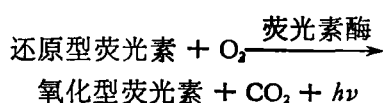
(1) 腺嘌呤核苷酸偶联发光 如与萤火虫提取物偶联(以下称偶联示例)：



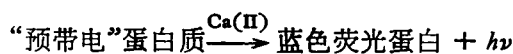
(2) 吡啶核苷酸偶联发光 偶联示例——发光细菌或真菌。



(3) 酶-底物偶联发光 偶联示例——海萤属或海笋属等生物。



(4) “预带电”发光 偶联示例——多管水母属。



生物发光反应中涉及两种“工具酶”，即荧光素酶和 NADH 脱氢酶，它们在不同反应体系中各有重要作用。

a. 荧光素酶(EC 1. 13. 12. 5—7) 不同来源的荧光素酶差异较大。虫萤光素酶是一种疏水性较强的二聚体, 其中一个亚基有酶活性,

另一亚基虽无活性, 但与发光强度直接相关。在吡啶核苷酸系统中, FMNH_2 为荧光素酶的辅酶, 其生成是通过 NADH_2 的氧化使 FMN 还原。反应中间产物及顺序参见图 1。

在腺嘌呤核苷酸系统中, 荧光素酶无需辅酶, 酶活性中心位于 α -亚基, 巯基 ($-\text{SH}$) 为酶的必需基团, 以其还原型维持酶活性。

6. NADH 脱氢酶(EC 1. 6. 99. 3) 体外研究证实它与荧光素酶有协同作用, 为吡啶核苷酸系统所必须的工具酶。在细胞内可能以游离型和荧光素酶结合型两种形式存在。

二、仪 器

在化学反应激发下, 发光分子的光强度(I)与反应速率(dC/dt)和量子效率的乘积成正比: 即, $I = \Phi \times dC/dt$ 。在理想状态下, 即不发生自吸收作用时, 发光强度可用简单的动力学测量装置直接测定瞬间的激发光子数。但由于许多变量影响发光分子的激发, 使发光强度随机起伏, 因此必须在一个超过随机起伏频率时间的发光强度进行积分, 使随机起伏被平均化, 得到一个可再现并与浓度有关的量。此操作包括对在数秒至 1 分钟或更长时间内的强度-时间积分进行测量, 以光电倍增管或其他检测器发出的信号触发一个适当的模拟电子积分线路来完成。

发光检测仪器可分为单光子计数仪和模拟电子计算机测量仪。国外多数采用模拟积分测量, 但近年来趋向用液体闪烁计数仪。

发光测量仪与各类分光光度计不同, 它无需光源和单色器, 但有数据处理, 混合进样等程序控制装置^[1]。

三、分析技术及应用

发光分析法是基于发光物质受化学反应激发产生可见光这一物理现象而发展起来的。这种分析方法可消除荧光分析中因激发光不纯而

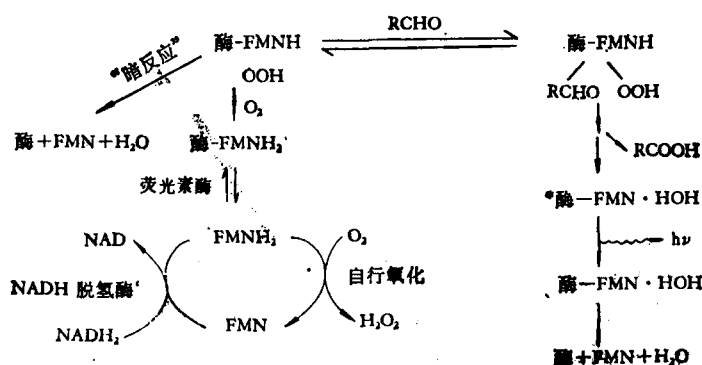
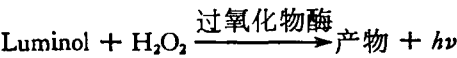
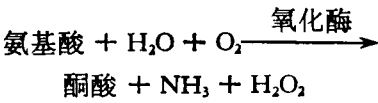


图 1 吡啶核苷酸发光系统的氧化中间产物及反应步骤

产生的散射作用,从而使信噪比增大,灵敏度提高^[2]。它最大特点是灵敏度比分光光度法高2—3个数量级,并可用发光分子标记替代同位素标记,避免污染。

1. 化学发光分析

(1) Luminol 发光法 Luminol 与 H₂O₂ 偶联发光须在强碱环境下由金属离子或辅助氧化剂催化(发射光谱峰(λ_{max})为 425 nm),可以测定许多与 H₂O₂ 相关的氧化酶和底物,但强碱环境不利于酶促反应的进行。有人试用酶促方式催化发光,以降低 pH 适于酶偶联反应,如:



虽然酶促催化的发光灵敏度小于非酶催化,但由于改善了反应条件,使某些不能实施的酶偶联单一试剂发光法成为可能^[3],因此有一定的应用价值。

在生化研究中,最初人们对某些细菌和细胞在吞噬过程中伴有微弱的发光现象不能解释。现认为这是因为活性氧的放能氧化反应与 Luminol 偶联,增强了发光强度。有报道说用前列腺素 E₂ 作用于不同来源的巨噬细胞,从其发光强度变化可了解对吞噬功能的影响^[4]。

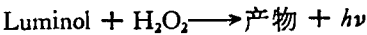
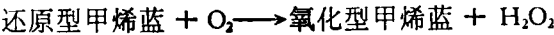
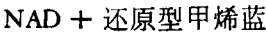
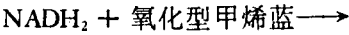
Luminol 与活性氧偶联发光是测量活性氧的一种方法。虽然目前活性氧尚未作为诊断指标用于生物医学,但许多重要的生命现象都值得从活性氧的作用方面来进行研究。如测定超氧化物歧化酶(SOD)^[5]。

含有铁卟啉结构的化合物可增加 Luminol 发光强度。用此法测定人、兔、和马血红蛋白(Hb),分析灵敏度分别为 0.5 × 10⁻¹⁰g, 2 × 10⁻¹⁰g 和 1.2 × 10⁻¹⁰g^[6]。表 1 列举部分物质的检测灵敏度。

Seitz 等^[7]介绍有关金属离子的检测是利用发光过程中的活化作用,常见的有 Co(II)、Cu(II)、Fe(II) 和 Fe(III)。应用 Luminol 发光法还可测定与 NADH₂ 相关的酶类和底物,其基本原理是:

表 1 Luminol 发光法的部分应用

检测物	灵敏度	检测物	灵敏度
肌红蛋白	10 ⁻⁴ μg	H ₂ O ₂	10 ⁻⁹ μg
羟化高铁Hb	10 ⁻⁷ μg	葡萄糖	2 × 10 ⁻⁴ mol
触酶	10 ⁻⁴ μg	SOD	10 ⁻¹⁰ —10 ⁻¹¹ mol
铁	~1μg	尿酸	10 ⁻⁷ —10 ⁻⁸ mol



这种间接偶联法的应用多见于脱氢酶类的测量。

(2) TCPO 发光法 应用范围类似 Luminol 法,但基底空白和检测极限均低于 Luminol 法,反应 pH 较宽(pH4—10),因适于某些特殊反应而被广泛采用。Williams 等^[8]应用本法测定血清乳酸脱氢酶,其原理亦是根据 NADH₂ 在甲烯蓝存在下与氧反应生成 H₂O₂,后者在二萘嵌苯存在下可与 TCPO 反应发光。

(3) 其他方法 见于 Lucigenin 发光,其原理及应用类同 Luminol;不足之处是受生物样品中多种催化剂和抑制剂的影响较大。

固相过氧化物酶偶联化学发光法和化学发光探针法是发光分析中一项新颖技术,其灵敏度和重现性均有较大的改善。

2. 生物发光分析

凡适于酶偶联反应,包括酶动力学分析和终点分析,均可以发光反应作为偶联指示系统,对于任何消耗、生成或利用 ATP、NAD(H₂) NADP(H₂) 和 FMN(H₂) 的反应,皆可应用生物发光进行测量。

(1) ATP 法 属腺嘌呤核苷酸偶联萤火虫发光系统。这类反应的机理是荧光素与 ATP 在荧光素酶和 Mg(II) 作用下生成活化腺苷酰荧光素,然后与氧反应即发射光子。这种活化荧光素除经上述酶促反应形成外,亦可通过在 0.1 N HCl 中加热 2 分钟而获得,活化率可达 100%。用拟一级反应动力学研究,证实发光速率与时间函数遵循下述关系:

$$LH_2' = LH_2 K_1 (e^{-K_1'} - e^{-K_2'}) / (K_2 - K_1)$$

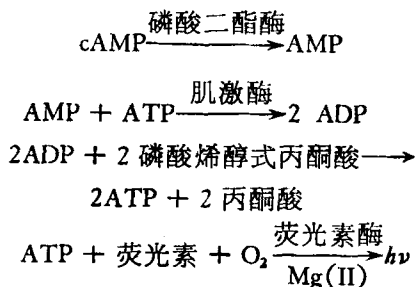
式中 LH_2' : 活化荧光素浓度; LH_2 : 初始浓度; K_1 , K_2 分别为实验测得常数。

荧光素酶制品的纯度与发光灵敏度有关; 酶粗制品, 虽然比较经济, 但腺苷酰激酶和磷酸转移酶等杂酶可能与 ATP 相关物质反应, 影响检测灵敏度。若用纯化浓缩的荧光素酶, 灵敏度大大提高, 基底噪声也得到改善。

用本法测定生物体液中肌酸激酶 (CK) 可省略常规分析和荧光分析中的多步偶联反应。Lundin 等成功地以酶活力的特异性免疫抑制作用结合生物发光 ATP 法测定总 CK 和同工酶 B 亚基 (CK-BB) 的活性, 并对最佳分析条件进行了研究^[9], 灵敏度提高到 0.2 单位/升, CV = 3%。

由 ATP 的消耗进行甘油测定亦已有报道^[10], 其原理是由甘油激酶催化甘油和 ATP 生成 3-磷酸甘油和 ADP。发光强度随 ATP 消耗而减弱, 与标准品比较求得甘油含量。甘油酯经皂化后生成的甘油同样可用此法测量, 从而省去了抽提、氧化等繁琐手续。Werner 等^[11]用超微发光分析法测定 $1\mu\text{l}$ 样品或单个组织细胞中的甘油三酯, 方法简单、快速。

基于环磷酸腺苷 (cAMP) 的生理效应十分重要, 目前已有从 ATP 法衍生出 cAMP 的分析法。其检测原理如下:



近来有用酶偶联法分析四磷酸二腺苷 (AP_4A), 其线性范围可达 $0.02-2\text{pmol}$ ^[12]

在生物化学和生物医学已应用发光分析研究某种配基分子与另一种特异的结合分子之间的相互作用。已见报道的有生物素、甲状腺素和睾酮等^[1]。其原理是将蛋白质配基分子以共价形式与发光试剂或 ATP 等结合, 随后以发光

反应作识别检测。

(2) NADH_2 法 属吡啶核苷酸偶联细菌发光系统, 反应原理前已叙述。该系统之工具酶来源于发光细菌。由于细菌的繁殖条件简单, 经济, 便于推广普及, 适宜于脱氢酶类的检测。此外, 用本法还可测定 ATP:



根据上述反应式从理论上可以推测, 凡能用萤火虫发光系统者, 同样可用于细菌发光系统。

Jablonski 等^[13]报道将细菌荧光素酶和 NADH 脱氢酶固定在芳胺玻璃珠上, 用这种固相酶可检测 0.2pmol 的 NADH_2 。若逐次将 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和己糖激酶与上述固相酶固化, 则可测得 pmol 葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖。

Njus 等^[14]以另一种细菌荧光素酶作底物检测蛋白水解酶, 灵敏度高于一方法。

(3) “预带电”法 属多管水母属的胶质鱼发光法, 此鱼含有一种光蛋白, λ_{max} 为 465nm , 可用 EDTA 分离, 归于吡啶核苷酸发光系统。这种光蛋白对钙离子具有发光特性, 机理尚不清楚, 可能与 Ca(II) 解除 EDTA 对光蛋白的抑制有关。用此法测得最低钙浓度为 100nmol 。但某些其他阳离子亦可使其发光。最近, Osamu 等^[15]又从一种红杉属植物中提纯一种光蛋白, 分子量约 $60,000$, λ_{max} 为 496nm , 对 ATP 和 Mg(II) 的检测极限分别为 10^{-9}mol 和 $10^{-6.5}\text{mol}$ 。

生物、化学发光作为一种分析手段可使生化分析趋于微量, 特异、灵敏和快速。它将为生化分析提供一些新的数据。

参 考 文 献

- [1] Gours, F. et al.: *Clin. Chem.*, **25**, 512, 1979.
- [2] Kobavashi, S. I. et al.: *Anal. Biochem.*, **112**, 99, 1981.
- [3] Schroeder, H. R. et al.: *Anal. Chem.*, **50**, 1114, 1978.
- [4] Parnham, M. J. et al.: *Agents Actions*, **11**, 617, 1981.
- [5] 李益新等: 《生物化学与生物物理进展》, **2**, 59, 1983.

- [6] Kalabina, L. V. et al.: *Chemical Abstracts*, 96 (17), Page 421, 1982.
- [7] Seitz, W. R. et al.: *Anal. Chem.*, 46, 188, 1974.
- [8] Williams, D. C. et al.: *Anal. Chem.*, 48, 478, 1976.
- [9] Lundin, A. et al.: *Clin. Chem.*, 28, 609, 1982.
- [10] Hercules, D. M. et al.: *Anal. Chem.*, 50, 22, 1978.
- [11] Werner, M. et al.: *Clin. Chem.*, 27, 268, 1981.
- [12] Adaling, O. et al.: *Anal. Biochem.*, 115, 302, 1981.
- [13] Jablonski, E. et al.: *Clin. Chem.*, 25, 1622, 1979.
- [14] Njus, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 61, 280, 1974.
- [15] Osamu, S. et al.: *FEBS, Lett.*, 128, 242, 1981

【本文于1983年8月26日收到】

生物样品的消化及其元素测定的研究

杨 先 和

(北京市工业卫生职业病研究所)

生物样品元素的分析测定之前,必须进行消化处理。一般都需要针对不同样品和测定元素种类及其测定方法,采用不同的消化方法,而不能用同一种消化方法处理。

本文报道我们研究的一种简便易行的通用消化方法。用它成功地完成了血、肉、骨、皮、毛、粪便等100多种动、植物及食物样品的消化。并重点介绍本法消化液用于石墨炉原子吸收法的测定。

原理及操作

生物样品的消化,实质就是生物样品的氧化。处于基态的分子氧的氧化能力十分微弱,只有高能态的活性氧,才有强烈的氧化能力。我们的通用消化方法就是使样品处于水溶液环境中,利用高能态的活性氧氧化样品。

1. 试剂的选择

以30%的过氧化氢为主要试剂。 H_2O_2 是较强的低温氧化剂,它含有一个较弱的过氧键—O—O—,能在较低的温度下发生热均裂,产生出活泼的氢氧自由基 $HO\dot{+}OH \longrightarrow 2 \cdot OH$,它是一个最简单的过氧化物引发剂。由 H_2O_2 均裂产生的初级自由基($\cdot OH$),在适当条件下,又能与体系中的 H_2O_2 发生诱导分解,诱发出一系列自由基链锁反应,而产生出具有高能态的活性氧。因此在消化过程中 H_2O_2 不仅作为活性氧的提供者,而且是自由基反应的引发剂。

此外 H_2O_2 与 H_2O 一样是一个非常好的溶剂。使用 H_2O_2 一般不会引进新的元素干扰。

H_2O_2 只有在酸性溶液中才是一种强氧化剂,因而又选用浓硝酸试剂。特别是 HNO_3 本身也具有强氧化性,它分解出来的 NO_2 ,具有传递电子的作用。 HNO_3 可以通过 NO_2 和还原剂交换电子,加快反应速度,因而具有催化氧化的作用。 HNO_3 除了能增强氧化性能外,还能使样品酸化,同时具有稳定 H_2O_2 的作用。此外,几乎所有的硝酸盐都溶于水,受热都能分解。所以在本法中 H_2O_2 与 HNO_3 配合使用,能使样品消化到清彻、透明、无色,并能长期保存。

2. 在密封罐内消化

在密封罐内消化样品,目的是使 H_2O_2 处在平稳状态下分解,以保证活性氧持续不断地产生。 H_2O_2 的热均裂需要一定的温度。由 H_2O_2 热均裂或诱导分解产生的寿命很短的活性氧,只有在它与样品分子发生有效碰撞时,氧化反应才能发生。同时,由引发剂均裂出来的初级自由基,只有在对基质发生有效碰撞时,才能诱发链锁反应。而密封罐内可保温、加压,就能大大提高有效碰撞几率。实验表明,以150℃为最好。当温度低于120℃时,样品消化不好,但温度也不宜过高。

现有密封罐,一般由聚四氟乙烯坩埚和不锈钢(或铝)外套组成。因密封罐需经常开启、关闭,而聚四氟乙烯坩埚经反复高温、高压作