

微生物及其代谢产物检测中化学发光法

韩 澄 源

(北京丰台 59175 部队)

化学发光法 (chemiluminescent technique) 具有反应快和灵敏度高的优点, 又有较完善的测量仪器和良好的试剂供应, 国外已逐渐成为生物学、医学和生物化学研究和常规的测定手段。化学发光法不但在测定激素^[1,2]、IgG^[3] 等方面得到广泛应用, 而且在微生物学研究方面也

日益受到重视。早在 60 年代国外就研究用化学发光法测定水中细菌的数量^[4], 后来用于测定病人尿中的细菌数^[5]。在化学发光的基础上 Halmann 等^[6]以及 Velan 和 Halmann^[7] 先后将固相酶联免疫法与化学发光法结合起来, 形成了一种很有前途的化学发光免疫测定法 (chem-

因此, 该实验中发光率与样品抗原含量成反比。

均质发光免疫分析技术的建立, 使化学发光免疫分析的操作更为简便、快速和适于全自动化。因而在临床生化上应用有很大前途。但它和酶免疫分析一样, 能在多大程度上取代放射免疫分析, 目前尚难预料。因为放射免疫分析技术自身也在发展 (如 ISAC 技术的应用)。

结 语

二十多年来、尤其是最近几年, 临床生化标记免疫分析技术的进展日新月异, 本文所介绍的只是其中的一少部分。尽管如此, 也不难看出, 标记免疫分析技术在提高灵敏度和简化操作步骤方面取得了可喜的进展。

参 考 文 献

- [1] Jolly, M. E. et al: *J. Immunol. Methods*, **67**: 21, 1984.
- [2] Thorell, J. I.: *Clin. Chem.*, **27**: 1969, 1981.
(或参见孙树杰等:《国外医学》临床生化与检验分册, 5: 61, 1984.)
- [3] Eriksson, H. et al: *J. Immunol. Methods*, **42**: 105, 1981.
- [4] Holub, W. R. et al: *Clin. Chem.*, **28**: 1555, 1982.
- [5] Eriksson, H. et al: *J. Immunol. Methods*, **71**: 117, 1984.

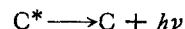
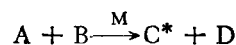
- [6] Gibbons, I. et al: *Clin. Chem.*, **27**: 1602, 1981.
- [7] Iin, J. D. et al: *Clin. Chem.*, **28**: 2081, 1982.
- [8] Ullman, E. F. et al: *Clin. Chem.*, **21**: 1011, 1975.
- [9] Litman, D. et al: *Anal. Biochem.*, **106**: 223, 1980.
- [10] Guesdon, J. L. et al: *J. Histochem. Cytochem.*, **27**: 1131, 1979.
- [11] Kendall, C. et al: *J. Immunol. methods*, **56**: 329, 1983.
- [12] Rappuoli, R. et al: *Anal. Biochem.*, **118**: 168, 1981.
- [13] Burd, J. F. et al: *Clin. Chem.*, **23**: 1402, 1977.
- [14] Burd, J. F. et al: *Methods Enzymol.*, **74C**: 79, 1981.
- [15] Li, T. M. et al: *Epilepsia*, **23**: 391, 1982.
- [16] Warah, D. M. *Clin. Chem.*, **26**: 986, 1980.
- [17] Greenquist, A. C. et al: *Clin. Chem.*, **27**: 1614, 1981.
- [18] Berman, J. W. et al: *J. Immunol. Methods*, **36**: 335, 1980.
- [19] Haiman, M. et al: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**: 473, 1977.
- [20] Wleersekera: *Ann. Clin. Biochem.*, **20**: 100, 1983.
- [21] Arakawa: *Dev. Immunol.*, **18**: 233, 1983.
- [22] Barnard, G.: *J. Clin. Chem.*, **30**: 538, 1984.
- [23] Brockelbank, J. L.: *Ann. Clin. Biochem.*, (in press).
- [24] Weeks, I. et al: *Clin. Chem.*, **29**: 1474, 1983.
- [25] Kohan, F. et al: *FEBS. Lett.*, **104**: 201, 1979.
- [26] Arakawa: *Anal. Biochem.*, **91**: 248, 1979.
- [27] Olsson, and Thore, A.: in *Immunoassays for the 80s* (Eds. Voller et al), 133, 1981.
- [28] Messeri, G. et al: *Clin. Chem.*, **30**: 653, 1984.

[本文于 1985 年 1 月 14 日收到]

luminescence immunoassay), 简称 CLIA。CLIA 法对检测细菌^[6,8]、病毒^[8-11]、抗体^[11,12] 和肠毒素^[7] 等方面都显示了高度的灵敏度和特异性。因此化学发光免疫测定法就成了检测微生物抗原和抗体的一种快速方法。本文仅就化学发光和化学发光免疫测定法在微生物检测方面的基本原理和实验技术加以介绍, 供开发新技术参考。

一、基本原理

化学发光是由一个反应体系中的 A、B 两种物质, 经过化学反应生成一种激发态的产物 (C^*), 当它们回到基态时, 剩余能量变成光子, 产生发光现象。



h 是普朗克常数。 ν 是发射光子的频率。 M 为第三种物质的分子。

用于检验的发光物质有两个系统, 即鲁米诺 (luminol) 系统和邻苯三酚 (Pyrogallol) 系统, 其发光原理如下:

1. 鲁米诺系统^[13]:

鲁米诺在碱性条件下, 以单价阴离子形式存在, 而初级氧化剂如过氧化氢, 不能和单价阴离子的鲁米诺起反应, 因此需要催化剂或催化剂/协同氧化剂使鲁米诺转变成有活性基的鲁米诺, 然后初级氧化剂 (过氧化氢) 才能与带活

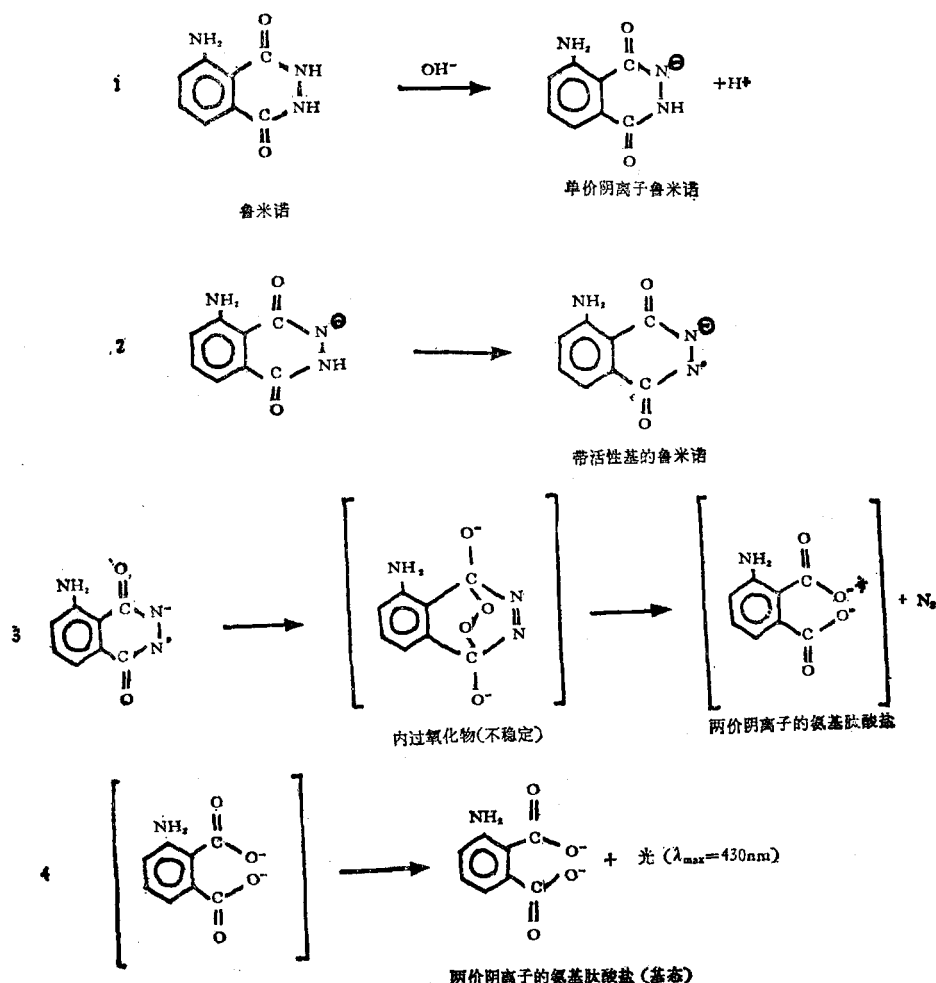


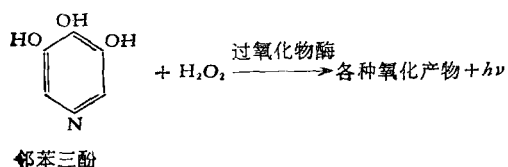
图 1 鲁米诺氧化作用形成化学发光产物的反应过程

性基的鲁米诺发生反应,而形成不稳定的中间产物,它可能是内过氧化物(endoperoxide),内过氧化物迅速衰变成激发态的氨基肽酸盐。当它回到基态时,伴有发光现象,产生的光可用光度计测量。

鲁米诺系统产生化学发光的条件是:①碱性鲁米诺溶液,②氧化剂(常用过氧化氢或过硼酸钠),③催化剂或催化剂/协同氧化剂。

多种金属离子(如铁离子)都有催化 H_2O_2 分解产生水和分子氧的作用,但效率很低;当铁离子与卟啉络合成铁卟啉后,其催化作用可大大增加,尤其是铁卟啉与某些蛋白质结合后,其催化作用更大。血红蛋白,过氧化物酶和细胞色素 C 等都是良好的催化剂,这些物质都含有一个相同的铁卟啉环。因此当有氧化剂和鲁米诺存在时,就可以对这些物质作定量分析。

2. 邻苯三酚系统,其发光反应过程如下:



二、材料及配制

1. 水 为了把化学发光测定的本底物质控制在最低限度,配制试剂用的蒸馏水要除掉各种离子和氧气。一般都将蒸馏水通过两个不同混合床的脱矿物质分离器来纯化。

2. 鲁米诺储存液 溶解 0.2 克鲁米诺和 3.2 克无水葡萄糖于 20 毫升 0.2 N NaOH 溶液中,最后用蒸馏水稀释至 1000 毫升。在普通冰箱保存,可用 2—3 天。

3. 过硼酸钠溶液 为 0.05 N NaBO_3 溶液。

4. 抗血清 抗血清(包括特异性抗体和第三抗体)效价要高,亲和力要强。血清先用 40% 饱和硫酸铵作初步提取,然后将经粗提的免疫球蛋白过 SPA-Sephrose-4B 柱^[14],制成高纯度的 IgG,并用电泳进行鉴定。

5. 辣根过氧化物酶标记抗体或抗原 酶标抗体有多种方法,常用的是戊二醛法^[15]和过碘

酸钠法^[16]。过氧化物酶的浓度,可用鲁米诺 H_2O_2 化学发光法测定。

6. 固相载体: 化学发光反应一般在小试管中进行,因此多采用微粒型固相支持物。其中有:①,以共价键形式将抗体联结到聚丙烯酰胺凝胶微粒上^[17],这种方法结合的较牢,洗涤时不易脱落。②,把抗体被动地吸附在聚苯乙烯微粒上^[18]。③,把抗体通过溴化氰结合在 Sepharose-4B^[7] 上。

三、仪器

一般来说任何对可见光敏感的仪器都可用来作化学或生物发光测定。有些实验室用液体闪烁计数器,亦获得了较满意结果。用更精密的光度计,效果更佳。专门测定化学发光的光度计(photometer)称为发光光度计(luminometer)。商品名称也有叫做 Biocounter 或 Chem-Glophometer。近来生产的光度计更加精良,可以自动注射加样,自动混合,有调温装置,有的可联上微处理器。装样量可由 10 微升到 2000 微升。而且可以选用不同的自动记录形式。这些仪器有: Pico-lite 6100 型光度计(Packard 仪器公司); Luminometer 1250 型光度计(LKB 公司); Monolight 201 型光度计(Analytical Luminescence Laboratory)等。

四、用化学发光法检测水和尿中的细菌数量

水或尿中的细菌可用化学发光法直接的检测出来,整个过程数分钟即可完成。直接检出,只能定量,不能定性。

1. 用化学发光法直接检出细菌的依据

(1). 血红素是菌体的成分 60 年代中期就用化学发光法测定血红素^[19,20]。Cox 等^[21]用此法测定细菌总数。后来 Ewetz 等^[22]用化学发光法证明腊样杆菌和大肠杆菌等八种需氧菌都含有氯化血红素(protohemin)。用酸丙酮从大肠杆菌制备的提取物与纯的氯化血红素发光的动力学过程作了比较,结果完全相同。八株菌的氯化血红素对鲁米诺- H_2O_2 系统反应的比率与纯

的氯化血红素相同,均为 0.7×10^6 mV/mol。

(2) 血红素含量与发光强度呈正比 Ewetz 等^[22]的实验证明,氯化血红素以及其他含铁卟啉的化合物在鲁米诺- H_2O_2 反应系统中,它们的浓度与发光强度呈正比。我们不妨说细菌的量与化学发光强度呈正比。

2. 实验方法

取 0.5 毫升含菌样品于小试管中,加入 0.5 毫升 0.2 N NaOH 溶液,混匀;一分钟后加入 2 毫升的碱性鲁米诺溶液,再加入 0.2 毫升 50 mM 的 $NaBO_3$ 溶液混匀,就可以激发化学发光反应。将装有混合物的小管放在光度计上进行测定,每 5—6 秒钟测定一次,将发光的相对强度 (mV) 记录下来。

3. 化学发光反应的动力学

化学发光反应非常迅速,加入各种试剂后,瞬间发光的强度即可达到高峰,然后很快下降。大肠杆菌和肠系膜串珠菌激活 $NaBO_3$ -Luminol 系统的典型发光记录如图 2^[22]。由此可见化学发光法反应速度之快,实为其他方法所不及。图 2 也表明不同菌的化学发光过程和发光强度均有差异。

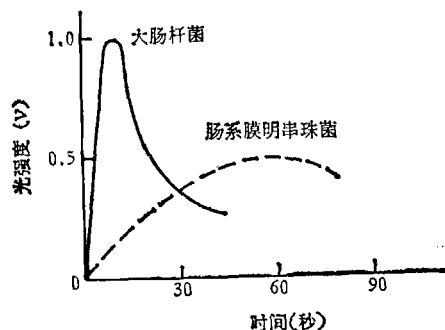


图 2 Luminol 与不同菌化学发光反应的时间过程

4. 化学发光反应检测细菌的敏感性

由于被检测的细菌种类不同和发光测定仪灵敏度的差异,检出细菌的下限有一定差异。Ewetz 等^[5]检出水中的大肠菌和摩根变形杆菌的下限为 10^4 菌/ml, Oleniacz 等^[4]检测了七种细菌的下限为 10^3 — 10^5 菌/ml。Miller^[23] 报告检出细菌的下限为 10^5 — 10^6 菌/ml。

5. 干扰因素

(1) 铁离子的干扰和消除办法 多种金属离子可以在 Luminol- H_2O_2 系统中作为氧化剂的催化剂;尤其二价铁,在自然界中普遍存在。所以其干扰最为常见。Ewetz 等^[19]用 NaOH 溶液先将样品处理五分钟,这样可使 $FeCl_3$ 的发光强度减少 5—20 倍。铁离子的干扰问题基本上解决了。

(2) 尿中其他物质的干扰 用化学发光法检测尿中的细菌时,因尿中含有程度不等的红细胞、白细胞和上皮细胞等,而这些细胞中也都会含有铁卟啉,所以会产生假阳性。Ewetz 等^[5]测定了 119 份尿,发现有 7% 假阳性。因此检测尿中细菌时,应作预处理,去掉各种细胞,减少假阳性反应。

五、化学发光免疫测定法

用化学发光法测定标记在抗原或抗体上的过氧化物酶的量从而间接地对微生物抗原(或其他蛋白质抗原)或抗体作定性和定量分析,叫作化学发光免疫测量法 (chemiluminescence immunoassay 简称 CLIA)。它是将固相酶联免疫测定法与化学发光法结合在一起的新技术,具有酶联免疫与化学发光法二者的特点。在试验原理与技术方法方面它均与酶联免疫法相似,所不同的是酶联免疫法加底物,呈现颜色反应,而 CLIA 法则是加入 Luminol- H_2O_2 而发光,用光学仪器检测出来。化学发光免疫测量法的优点是:① 适应性广,既可检测抗原又可检测抗体^[7,8,24];能检测可溶性抗原又能检测颗粒性抗原^[8]。② 既可定量,而且又可定性,③ 反应快速,④ 灵敏度高。

1. 实验方法。

(1) 竞争性化学发光免疫测定技术 其特点是同时加入酶标记的和非标记的抗原,使二者和抗体发生竞争性结合。此法用于测定抗原含量。今举例如下:

Velan 等^[7] 用此法研究检测葡萄球菌肠毒素 B (简称 SEB)。以琼脂糖珠作支持物。结果表明该法能检出 1 毫微克的 SEB。具体方法是:将测定管中加入 0.1 毫升的琼脂糖珠-ASEB

(即 SEB 抗体), SEB-辣根过氧化物酶 (5 毫微克) 0.05 毫升, 再加已知(或待测) SEB 样品 0.2 毫升。加含有 25 毫克牛血清白蛋白 (BSA) 的 0.1 M pH 7.6 的磷酸盐缓冲液 0.05 毫升, 混匀, 在室温下缓慢旋转培育两小时。离心, 将结合抗原的琼脂糖分离。用 0.18 M pH 6.5 的 PB 洗两次。将结合过氧化物酶的琼脂糖珠悬液中加入 0.2% 邻苯三酚混匀, 置于反应器中, 加入 0.37% H_2O_2 , 测定发光强度。随着待测样品中 SEB 含量的增加, 发光强度逐渐减弱。

(2) 双抗体法^[8] 其特点是将辣根过氧化物酶标记在第二抗体上, 发光强度与待测的抗原量呈正比。今以研究检测野兔热菌苗为例, 将具体方法介绍如下:

将弱毒野兔热菌液在小试管中与特异抗体-聚苯乙烯微球 (1 ml/微球/管) 在 37℃ 反应两小时(轻轻振荡), 离心; 将沉淀用 pH 7.4 PBS 洗两次, 最后加 1 毫升 PBS, 用含 0.1% 牛血清白蛋白的 0.1 M Na_2CO_3 溶液 (pH 8.5) 将辣根过氧化物酶标记的第二抗体作适当稀释; 取 1 毫升加到有沉淀物的小试管中, 再于 37℃ 轻轻振荡培养两小时; 用 PBS 洗两次; 最后加 1 毫升 PBS 来悬浮聚苯乙烯微球——抗体抗原复合物。取 100 微升置于 6 × 50 mm 反应杯中, 按上述的方法加试剂测定发光强度。Reichard 等^[25]用此法检出野兔菌的下限为 100 个/ml。

(3) 直接免疫测定法 此法的特点是将待测的细菌固定在纸片上, 酶标记的抗体与纸片上的细菌发生结合反应, 发光强度与菌量呈正比。今将 Halmann 等^[9]的方法简述如下:

将灵杆菌稀释为不同浓度, 取 1 微升点在 Aclar 纸带(氯三氟乙炔聚合物)上; 将此纸带浸于含有正常羊血清等成分的生理盐水中; 五分钟后移到含有适宜浓度的辣根过氧化物酶标记的抗灵杆菌血清的试管中, 于室温下培育 20 分钟; 取出后将纸带用 pH 7.2 的缓冲液洗三次。然后按固定菌的位置切成小块, 放入反应池中, 加入含有 0.2% 邻苯三酚的 0.18 M PB 缓冲液 (pH 6.8) 50 微升; 将反应池放在光度计的测定位置上, 加入 50 微升的 0.37% H_2O_2 , 随即测定

发光强度。全部过程于 50 分钟即可完成。此法检出灵杆菌的下限为 30—300 个菌。

2. 影响测定灵敏度的因素

化学发光免疫测定技术是一种高度灵敏的方法, 但试验条件不合适, 则灵敏度降低。除发光测定仪之外, 影响测定灵敏度的因素, 较主要者是试验中酶-结合物和抗体-固相载体量的多少。今举例如下:

(1) 酶-结合物量的影响 Halmann 等^[9]测定纸片上的灵杆菌时, 于 1 毫升的反应液中, 因加入不同量的辣根过氧化物酶-抗体结合物。菌量相同, 发光强度不同。如图 3 所示。

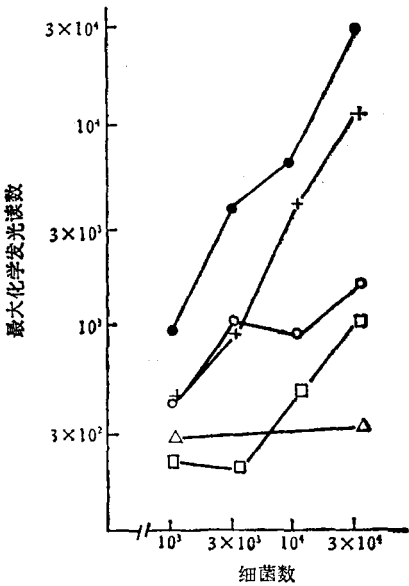


图 3 用递增量的辣根过氧化物-抗体结合物检测灵杆菌

酶-抗体结合物加于 1 毫升反应溶液中的量:
△ 3μl □ 5μl ○ 10μl × 15μl ● 30μl

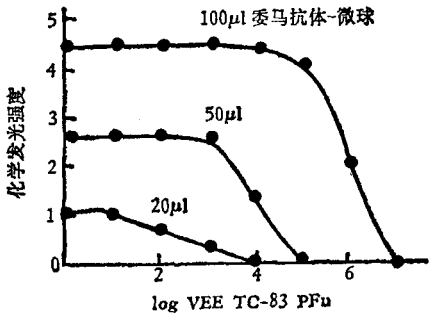


图 4 用双抗体法加入不同量的委马抗体-固相载体测定委内瑞拉马脑脊髓炎病毒的化学发光

VEE: 委内瑞拉马脑脊髓炎病毒

叶绿体核糖体的简易制备法

李家洋 李继耕

(中国科学院遗传研究所, 北京)

高等植物中有两类核糖体: 一类为原核型的, 存在于叶绿体与线粒体中; 另一类为真核型的, 存在于细胞质中。核糖体是细胞进行蛋白质生物合成的部位, 同时又与生物体的若干性状, 如抗性突变有关。随着高等植物分子生物学的发展, 分离、鉴定并利用这些核糖体显得日

益重要。现将这两类核糖体蛋白质的提取与双向电泳方法报道如下。

材料与 方法

甜菜与番茄的鲜嫩叶片, 除去叶柄和中脉后, 称重。用自来水洗三次, 再用预冷的去离子

(2) 固相载体-抗体量的影响 Reichard & Miller^[8] 用双抗体法测定委内瑞拉马脑脊髓炎时, 化学发光强度与聚丙烯酰胺微球-委马抗体结合第二抗体-辣根过氧化物酶量呈正比, 委马抗体-微球量越大, 则化学发光反应越强(图4)。

六、结 语

化学发光法能够直接测出 10^3 — 10^5 菌/毫升, 整个过程数分钟即可完成, 而且也实现了自动化, 适于快速测定水中细菌总数。化学发光免疫测定法, 不但具有免疫酶联技术的全部优点, 而且具有放射免疫法灵敏度高的特点。除此之外, CLIA 法还具有下列优点: ① 可将抗体球蛋白共价结合在固相载体上, 因此 CLIA 没有免疫酶联法 (ELISA) 中洗涤时解脱抗体的缺点。② CLIA 中不用同位素, 故没有使用同位素的缺点, ③ 对酶活性的要求没有 ELISA 那样严格。可见, 化学发光免疫测定法将有良好的发展前途。

参 考 文 献

- [1] Pazzagli, M.: *J. Steroid Biochem.*, 14: 1005, 1981.
- [2] Schrider, H. R.: *Methods in Enzymol.*, 84: 303, 1982.
- [3] Hersch, L. S. et al.: *Anal. Biochem.*, 93: 267, 1979.
- [4] Oleniacz, W. S. et al.: *Environ. Science Technology*, 2: 1033, 1968.
- [5] Ewetz, et al.: *Acta. Path. Microbiol. Scand. B.*, 82: 375, 1974.
- [6] Halmann, M. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 34: 473, 1977.
- [7] Velan, B. et al.: *Immunochemistry*, 15: 331, 1977.
- [8] Reichard, D. M. et al.: *AD: A09043*, 1980.
- [9] Schroder, H. R. et al.: *Clin. Chem.*, 27: 1378, 1981.
- [10] Allon et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 16: 345, 1982.
- [11] Pronovost, A. D. et al.: *ibid.*, 13: 96, 1981.
- [12] Korishi, E. et al.: *ibid.*, 12: 140, 1980.
- [13] Nakamura, R. M. et al.: *Immunoassay for the 80 S. P. 171—187*. Alan R. Liss, Inc.,
- [14] Goding, J. W.: *J. Immunol. Methods*, 13: 125, 1976.
- [15] Aryameas, S. et al.: *Immunochemistry*, 6: 43, 1969.
- [16] Nakane, P. K. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 1084, 1974.
- [17] Inman, J. K. et al.: *Biochemistry*, 8: 4074, 1969.
- [18] Raitenberg, E. J. et al.: *Bull. WHO*, 51: 105, 1974.
- [19] Ewetz, L. et al.: *Anal. Biochem.*, 71: 546, 1976.
- [20] Neufeld, H. A. et al.: *ibid.*, 12: 303, 1965.
- [21] Cox, R. et al.: *J. Bact.*, 113: 112, 1973.
- [22] Ewetz, L. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 796, 1978.
- [23] Miller, C. A. et al.: *ibid.*, 35: 831, 1978.
- [24] Puget, K.: *Anal. Biochem.*, 79: 477, 1977.
- [25] Reichard, D. W. et al.: *Fed. Proc.*, 1013, 1979.

[本文于 1984 年 12 月 5 日收到]