

could be seen after immunization. The amounts of total RNA from the immunized PBL are 2.5 times more than that from the non-immunized. Human immunoglobulin, VH-CH1 (IgG) and VL-CL (κ), genes were amplified with RT-PCR with the above total RNA or mRNA as templates. The products of human immunoglobulin genes from the immunized PBL

are 1.3 times more than that from the non-immunized. This strategy would be used for humanizing mouse-original monoclonal antibodies.

Key words antigen, neoplasm, Gene, human immunoglobulin, reverse transcription reaction, polymerase chain reaction

鼠脑微透析液痕量氨基酸的激光诱导荧光检测*

韩慧婉 马明生 熊少祥 刘国詮
(中国科学院化学研究所, 北京 100080)

摘要 使用自制微透析探针和活动体位生化取样装置以及自行组装的毛细管电泳-增强型电荷耦合器件-激光诱导荧光系统, 对鼠脑透析液中的痕量氨基酸以异硫氢酸荧光黄 (FITC) 进行柱前衍生后进行了分离和检测. 鼠脑海马 CA₃ 区微透析液中游离氨基酸的浓度为 $10^{-8} \sim 10^{-6}$ mol/L, 并将其用于学习与记忆的研究, 为无损研究活体脑内神经递质和其他痕量生物物质的动态变化提供了一种新方法.

关键词 微透析, 激光诱导荧光检测, 毛细管电泳, 氨基酸, 学习

在研究学习与记忆、针刺麻醉、运动行为, 药物药理和毒理作用以及某些神经系统疾病等对大脑高级神经活动的影响时, 越来越多的研究者开始采用兼具生化采样和脑内给药双向功能的微透析技术. 因为传统的静态取样法只能测定细胞内外液混合的组织匀浆成分, 而这种新技术可以单纯采集细胞外液, 为研究神经系统中起重要作用的神经递质及其他细胞外成分的动态变化提供了可能. 这种整体水平的在位、动态生化检测技术同时还具有无损伤、快速和连续取样等特点, 可以在实验动物自由活动状态下取样, 有可能成为生化取样的常规方法. 微透析样品可采用电化学、高效液相色谱 (HPLC) 或毛细管电泳 (EC) 法进行检测. 采用荧光衍生法可扩大检测范围并提高灵敏度. 使用质谱学方法, 可以方便地进行样品的定性. 目前被研究过的透析液组分主要是单

胺类和少数氨基酸^[1~5]. 由于微透析样品成分复杂、生物活性物质含量极少 ($\mu\text{mol} \sim \text{pmol}$), 且采样量少 (一般为 μL 级), 因而迫切需要发展更灵敏的分析和检测方法, 为此建立了毛细管电泳-激光诱导荧光检测系统 (CE-LIF).

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效毛细管电泳-激光诱导荧光检测系统由氩离子激光器、增强型电荷耦合器件 (IC-CD) 等组成^[6,7]. 江湾 I-C 型脑立体定位仪为上海第二军医大学产品. SB-2 型和 MD-1001 型针管式微量注射泵, 分别为北京星达公司和美国 BAS 公司产品. 操作学习装置按照传统

* 国家自然科学基金资助项目 (29675053).
收稿日期: 1996-09-20, 修回日期: 1997-01-27

生物学方法^[8]改进, 以便适用于活动状态下的微透析在位取样.

标准氨基酸和衍生化试剂为 Sigma 产品, 其余为国产分析纯^[9]. 实验用水为三次蒸馏水, 所用溶液均经 0.45 μm 滤膜过滤.

1.2 鼠脑微透析液采样

选用成年 Sprague-Dawley 大白鼠, 体重 300~350 g, 麻醉后在海马垂直部 CA₃ 区上方骨表面下预埋一根供微透析探针插入的导管, 其尖端位置 AP 5.0, L 4.5, H 4.0. 48 h 后在自由活动状态下进行学习训练前取样. 自导管内小心插入一根微透析探针 (自制, 长 3 mm, 外径 0.2 mm, 截止分子质量 18 ku)^[10]. 用针管式微量注射泵恒速 (1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$) 缓慢灌流上述脑区. 90 min 后收集透析液^[11]. 次日起开始足趾电击-按键操作式学习训练, 每日 2 轮, 每轮 30 次. 正确按键反应率达 85% 时停止训练 (一般 5 d), 次日再按前述方法取样, 用以分析学习训练前后同一只动物相同脑区内透析液的变化.

1.3 荧光衍生及电泳分离条件

鼠脑微透析液及氨基酸标准液取样量均为 5 μl . 衍生反应分离条件及标准氨基酸电泳图见另文^[9].

2 结果与讨论

2.1 CE-LIF 系统的检测限

上述自建系统对低至 10^{-14} mol/L 的 FITC 仍可得到清晰的电泳峰. 此时系统对 FITC 的检测限为 5×10^{-23} mol, 约 27 个分子^[9]. 本系统所用的 ICCD 动态范围为 16bit, 最大计数为 65 535/象元. 在同样条件下空白的毛细管电泳图是一随机波动曲线, 在 FITC 出峰位置没有显著高出噪声水平的信号.

2.2 透析液初始采样时间的确定

当微透析探针刚插入大脑时, 可能对局部脑组织造成轻微的损伤, 此外灌流液也需要一定的渗透时间与局部脑组织的化学成分建立起稳定的传质过程. 此时收集的样品不能反映脑

内活性物质的真实水平. 实验表明, 探针插入后第一小时内透析液中氨基酸含量明显高于第二小时的. 开始 30 min 内最为明显, 90 min 后逐渐趋于平稳. 因此, 本实验均使用探针插入 90 min 后收集的透析液样品. 如使动物在取样前置于活体取样装置内 12 h 以上, 可减少动物的新异反应, 插入探针 60 min 即可获得较稳定的结果.

2.3 冷冻干燥对微透析液衍生物的影响

对大鼠学习训练后的透析液直接衍生或冷冻干燥适当浓缩后衍生的结果表明, 冷冻干燥的样品在检测氨基酸时与未经冻干处理的没有显著差异. 冷冻干燥虽可增加所配制样品的浓度, 在一定程度上克服方法灵敏度低给分析带来的困难, 但必然造成采样时间增加, 使样品仅能反映较长时间内的宏观变化而不利于动态检测. 故实际取样时以采用直接衍生方法为宜.

2.4 微透析生物样品检测的应用实例

对经过足趾电击-按键操作学习训练 5 d 后的大白鼠进行微透析采样, 并与同一只动物未训练前的透析液进行比较, 所得 CE-LIF 结果见图 1. 用标准加入法确定电泳峰的归属, 可以检测到多种氨基酸的含量在学习训练后发生了明显的变化. 其中赖氨酸增加 824.1%, 精氨酸增加 300%, 苯丙氨酸增加 225%, 谷氨酰胺增加 277%, 甘氨酸增加 231%. 其他未标记的电泳峰未进行定性. 以不同浓度的标准氨基酸样品进行衍生并测定后, 可以得到工作曲线, 据此进行氨基酸的定量分析. 表 1 给出了测定第 23 号鼠学习训练前后不同收集管内的三种游离氨基酸含量的精密度. 一个有趣的现象是第 24 号鼠学习训练后因病导致操作学习成绩下降, 2 d 后正确行为反应率降为 40%, 此时部分电泳峰亦显著降低 (图 2), 甘氨酸减少 52.9%, 谷氨酰胺减少 42.0%, 苯丙氨酸减少 21.7%. 说明用本实验系统得到的检测结果, 可以反映动物行为水平导致的动态生化变化.

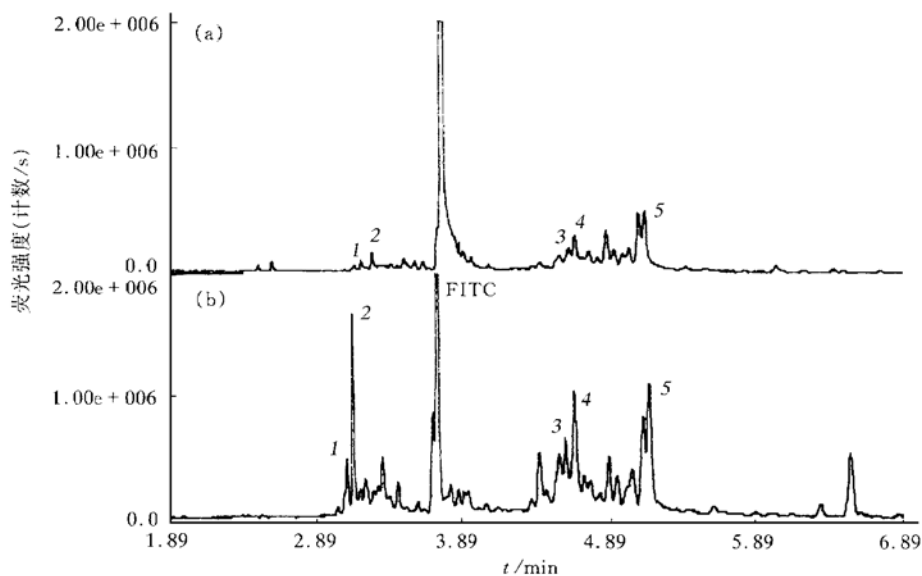


图1 第23号鼠学习训练前后海马区透析液的CE-LIF电泳图
(a) 学习训练前; (b) 学习训练5 d后. 1~5: 依次为精氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸及甘氨酸.

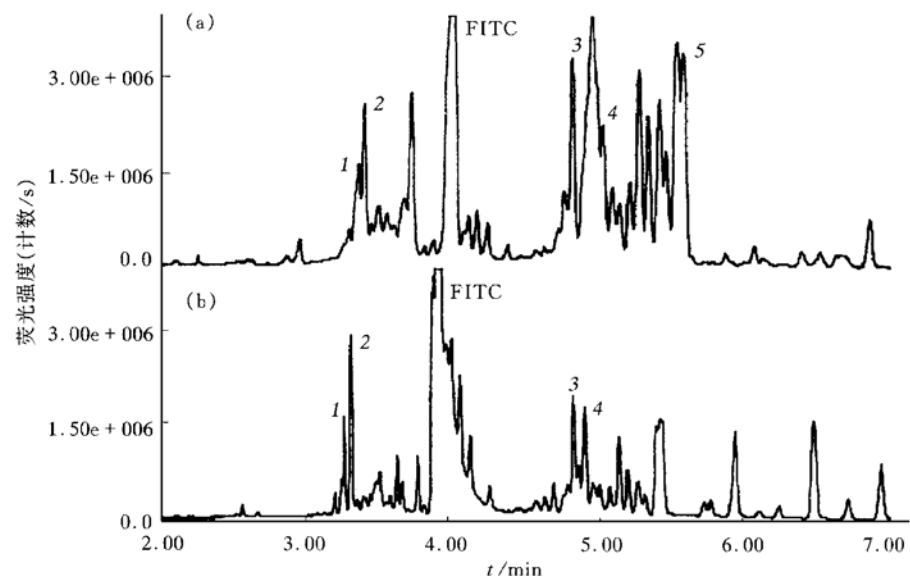


图2 第24号鼠学习训练后遗忘导致海马区透析液CE-LIF图的变化
(a) 学习训练5 d后; (b) 遗忘2 d后.

上述结果说明, 自建的 CE-ICCD-LIF 检测系统可用于微透析样品中痕量氨基酸的检测, 用以研究学习与记忆等生理行为引起的生化改变. 这不但有助于阐明某些高级神经活动的分子水平机制, 并且能提供其他方法难以获

得的各组分的动态变化信息, 其非递质氨基酸含量变化的生物学意义有待进一步研究. 由于动物的个体差异较大, 在使用超高灵敏度检测仪器分析有限的微透析样品时, 有时会给生物统计工作带来困难, 需综合考虑上述影响因

素，以保证高灵敏度检测的重现性。

表 1 第 23 号鼠学习训练前后透析液中部分氨基酸的测定结果

氨基酸	浓度平均值 ± 标准偏差 / 10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹	
	学习训练前 (n = 5)	学习训练后 (n = 6)
精氨酸	1.60 ± 0.20	4.80 ± 1.30
谷氨酰胺	0.83 ± 0.23	2.30 ± 0.74
甘氨酸	1.60 ± 0.37	3.70 ± 0.67

参 考 文 献

1 Lee E H Y, Chang S Y, Chen A Y J. CRF facilitates NE release from the hippocampus: a microdialysis study. *Neurosci Res*, 1994, **19** (3): 327~ 330

2 Robert F, Bert L, Denoroy L *et al.* Capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence dictation for the determination of nanomolar concentrations of noradrenaline and dopamine Application to brain microdialysis analysis. *Anal Chem*, 1995, **67** (11): 1838~ 1844

3 谢福明, 黄铁华, 彼得·基幸格. 微透析取样和微柱液相色谱电化学检测法测定大鼠脑纹状体中的 5-羟色胺. *中国药理学报*, 1995, **16** (5): 473~ 477

4 Dawson L A, Stow J M, Dourish C T *et al.* Analysis of glutamate in striatal microdialysates using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *J Chromatog A*, 1995, **700** (1/2): 81~ 87

5 Huston J P, Hasenohrl R U. The role of neuropeptides in learning: focus on the neurokinin substance P. *Behav Brain Res*, 1995, **66** (1/2): 117~ 127

6 Ma M S, Han H W, Liu G Q. Laser induced fluorescence detector for capillary electrophoresis. *Chin Chem Let*, 1996, **7** (1): 39~ 42

7 马明生, 韩慧婉, 刘国詮. 激光诱导荧光检测器: 一种高灵敏度的高效液相色谱和毛细管电泳检测器. *色谱*, 1995, **13** (4): 257~ 261

8 管林初, 姚力, 唐鹏威等. 操作式条件反射自动监测系统. *心理学报*, 1986, (3): 318~ 342

9 马明生, 吴晓军, 刘利琳等. 用毛细管电泳-激光诱导荧光-增强型电荷耦合检测器检测痕量氨基酸. *分析化学*, 1996, **24** (9): 1019~ 1023

10 韩慧婉, 刘国詮. 一种生化活体取样探针. 中国专利, 实用新型, 96209761, 6. 1996-05-02

11 韩慧婉, 马明生, 刘国詮. 操作学习导致的大鼠海马微透析液中神经递质的动态变化. *神经科学*, 1995, 增刊: 145

Laser Induced Fluorescence Detection of Trace Amino Acids in Rat Brain Microdialysates.
HAN Huiwan, MA Mingsheng, XIONG Shaoxiang, LIU Guoquan (*Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*).

Abstract Trace amount of free amino acids in brain microdialysates was separated and determined with derivative of fluorescein isothiocyanate (FITC) using the home-made microdialysis probes and biochemical sampling unit for living animal as well as capillary electrophoresis system with intensified charge-coupled device (ICCD) -laser induced fluorescence detector. The concentration of free amino acids in microdialysates was 10⁻⁸ ~ 10⁻⁶ mol/L with 5 μl sample. The change of free amino acids was monitored *in vivo* in the hippocampus of freely moving rats before and after operational learning. These experiments suggest that the sampling and determination system can be used for analysis of amino acids in brain microdialysates.

Key words microdialysates, laser-induced fluorescence detection, capillary electrophoresis, amino acid, learning

更 正

《邻二氮菲-Fe²⁺ 氧化法检测 H₂O₂/Fe²⁺ 产生的羟自由基》(《生物化学与生物物理进展》, 1996, **23** (6): 553~ 555) 一文有误. 1. 第 554 页左栏第六行“加 H₂O₂,” 应为“加 H₂O₂ 主反应液总体积为 2 ml,”; 2. 表观羟自由基清除率 *d* 的计算公式应为: $d = \frac{A_{536}(\text{加药}) - A_{536}(\text{损伤})}{A_{536}(\text{未损伤}) - A_{536}(\text{损伤})} \times 100\%$; 3. 图 1 中纵座标的物理量应为“Δ*A*₅₃₆”. 特此更正, 敬请原谅.