

激光多普勒光谱学在免疫学中的应用

韩澄源

(解放军医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

激光是六十年代初发展起来的一门新兴技术。由于激光具有亮度高,方向性强及单色性好的特点,二十年来它在工业、农业、国防以及医学等各个领域里,得到了广泛的应用。激光技术在医学检验方面的应用,国外曾有不少报道,本文仅就激光多普勒光谱学在免疫学中的研究,作一综合简要介绍。

激光多普勒光谱学(Laser Doppler Spectroscopy)是测定溶液中大分子或粒子电泳迁移率的新技术,它是将免疫学上广泛应用的电泳技术和激光多普勒测速法相结合的一种新方法^[1],激光多普勒光谱学具有以下优点:(1)快速,全过程在20—30分钟内就可以完毕,能够立即得到被分析物质的光谱图。(2)灵敏性高,可以检测出每毫升含有5—10毫微克水平的抗体。(3)操作自动化,(4)分辨力高。

这种技术有不同的名称,最近文献中常用的是:激光多普勒光谱学、电泳光散射^[1]。

激光具有良好的方向性和相干性,在精密测量、远距离测量、流体力学测量等方面均获得了广泛的应用。1946年 Cummins 首先用激光多普勒频移原理测量流体的速度,并制成了多普勒测速仪。70年代国内有些单位也研制成功了这种测速仪^[2]。1971年 Ware 和 Flygare 首先报告用激光多普勒光谱学同时测量了牛血清白蛋白的电泳迁移率和扩散常数。此后其他学者对仪器作了不同的改进,并用于测定不同的样品,例如测定血浆蛋白^[3]。血红蛋白^[4]、研究红细胞的电泳分布^[5]、正常与急性淋巴白血病人淋巴细胞的电泳差别^[6]、红细胞表面电荷

与其生存时间的关系^[7]、研究T淋巴细胞的亲和力^[8]、研究免疫淋巴细胞与抗原的反应^[9]等。

Uzgiris 1974年^[10]用此技术测定蛋白质抗原(牛血清白蛋白)覆盖的乳胶微粒的多普勒光谱图,第二年(1975)^[11]他把这一试验又深入了一步,用激光多普勒光谱学方法测定抗原-抗体反应,而且可以定量的测出抗体或抗原的量。以上这些例子说明,这种新技术可以在多方面使用。

一、原理^[1,11]

激光多普勒光谱学分析方法的装置,由以下几部分组成:即激光器、散射池、光电倍增管、光谱分析仪和用于形成电场的两个电极。如图1所示。

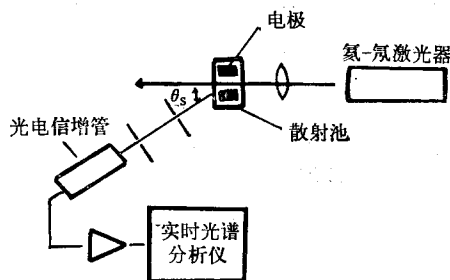


图1 激光多普勒光谱学原理示意图

激光经透镜聚焦照射到散射池,被电场里运动着的粒子散射,散射光通过两个0.5毫米的隙缝,由光电倍增管测出。电场中运动粒子散射的光,其频率与入射光频率有差别,即产生所谓多普勒频率位移,这种频移与粒子的电泳速

度成正比。运动慢的粒子,产生的频移就小,泳动快的产生的频移就大。带有不同电荷的大分子或粒子,具有不同的泳动速度,因此,就有不同的多普勒频移。这种多普勒频率位移,用外差法就可被频谱仪检测出来,即将光电信号变成光谱峰。测出多普勒频移,就测出了运动粒子的速度。多普勒频移的数学表达式为:

$$f_D = \frac{2V}{\lambda} \sin \frac{Q}{2}$$

λ 为入射的激光波长, V 为粒子泳动速度, Q 为光波进行方向与测定方向的夹角。

当测出 f_D 以后,就可以得到粒子的泳动速度:

$$V(\text{粒子泳动速度}) = \frac{\lambda f_D}{2 \sin \frac{Q}{2}}$$

二、应 用

1. 测定不同性质血细胞的电泳迁移率

各种不同性质的血细胞,例如正常人的血红细胞(包括不同龄的红细胞)和淋巴细胞;白血病人的淋巴细胞;免疫淋巴细胞以及淋巴细胞等用蛋白质等处理后,其表面电荷均不同,这种差别非常小,用其他方法无法区别,但用激光多普勒光谱法能很快识别出来。

(1) 不同类型和同类型而性状不同的血细胞的电泳迁移率不同^[5,6]。将正常人外周血的红细胞和淋巴细胞混在一起,用激光多普勒光谱

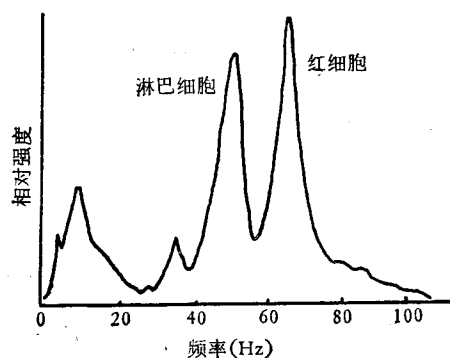


图2 正常人淋巴细胞和红细胞的电泳散射光谱
红细胞(1.0×10^9)和淋巴细胞(2.2×10^9)混合悬液,此细胞悬于含有 0.29M 蔗糖的 0.005M 的缓冲液中

法测定,其频率是不同的(如图2),红细胞的频率高,淋巴细胞的频率低,同是淋巴细胞,在正常人和白血病人中其电泳迁移率及光谱峰形表现也不同(图3)。

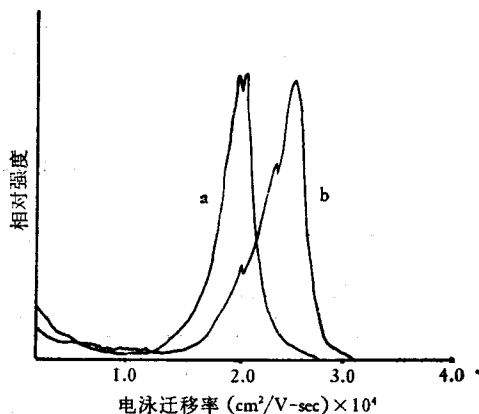


图3 正常人和淋巴细胞白血病人的淋巴细胞的电泳散射光谱
a 白血病人 b 正常人

淋巴细胞白血病人的淋巴细胞比正常人的电泳迁移率低,而且它的淋巴细胞电泳的光谱峰分布是对称的,而正常人是**不对称的,在电泳迁移率低的一侧出现一个肩。

(2) 研究免疫淋巴细胞的亚群^[8] 淋巴细胞是人体内的免疫活性细胞,根据细胞表面标记和功能的不同,淋巴细胞可分为 T 细胞和 B 细胞两群,各群细胞表面结构的差异是体外检查各群淋巴细胞的依据之一,目前测定 T 淋巴细胞的数量主要用羊细胞玫瑰花环形成试验。 T 淋巴细胞表面有绵羊红血球的受体,绵羊红血球可以和 T 淋巴细胞上的受体结合,并围绕 T 淋巴细胞的周围呈玫瑰花环状,因而得名。 T 淋巴细胞中有一部分与绵羊红细胞的亲和力强,室温下 5 分钟即可形成玫瑰花环,而另一部分与绵羊红细胞亲和力弱, 4°C 一小时以上才能形成玫瑰花环。图4是与绵羊红细胞具有不同亲和力的两个 T 细胞亚群的典型多普勒光谱。亲和力强的淋巴细胞的光谱,主要是电泳迁移率高的部分,低亲和性的淋巴细胞的光谱主要由电泳迁移率低的细胞组成。

(3) 研究结核病人淋巴细胞的免疫性^[9]

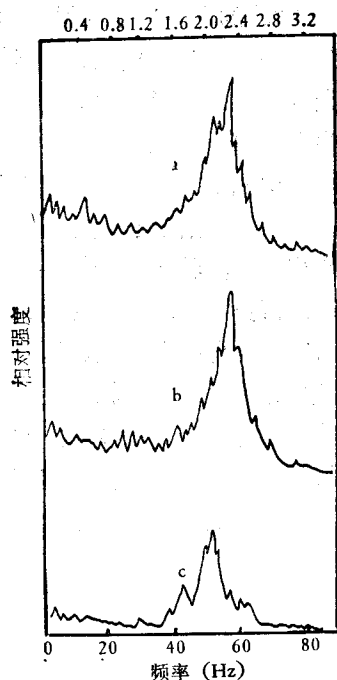


图4 与绵羊红细胞形成玫瑰花环的
淋巴细胞激光多普勒光谱

a 两种淋巴细胞

b 高亲和性 E-RFC

c 低亲和性 E-RFC

* E-RFC = E 玫瑰花环形成细胞

将得过结核病人的淋巴细胞和结核菌素 PPD 一起培育后, 75% 的病例出现新的高迁移率的细胞亚群。但在用 PPD 处理之前不出现这种情况(图 5)。而皮肤结核菌素试验阴性及未得过结核病人淋巴细胞与 PPD 一起培育, 则

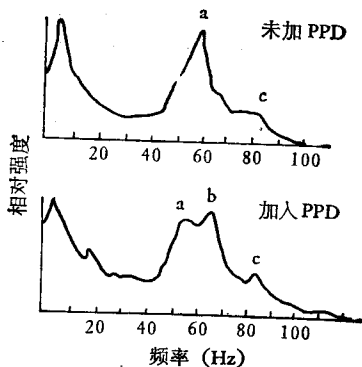


图5 经 PPD 处理前后的结核病人
淋巴细胞多普勒光谱

峰 a 为淋巴细胞多普勒光谱 峰 c 是残余的
红细胞 峰 b 是新的高迁移率的淋巴细胞光谱

不出现电泳迁移率的变化, 这种情况说明结核菌素与病人的淋巴细胞之间由于特异性反应而出现新的迁移率的细胞亚群。

(4) 研究白血病淋巴细胞被神经氨酸酶作用后的电泳迁移率的变化^[6,12] 神经氨酸酶又称受体破坏酶, 它能裂解神经氨酸与其他糖类之间的化学结合键, 神经氨酸是许多细胞表面糖蛋白的重要结构成分, 神经氨酸酶作用于红细胞后, 则细胞之间的排斥力减小, 而易于凝集。此酶可以从细胞表面上的糖蛋白和类脂中移去 N-乙酰神经氨酸, 因此减少了细胞表面的净阴电荷。将急性白血病病人的淋巴细胞用神经氨酸酶处理, 它的电泳迁移率明显变慢(如图 6)。而正常人的淋巴细胞用神经氨酸酶处理后, 其光谱峰与病人的是不同的。

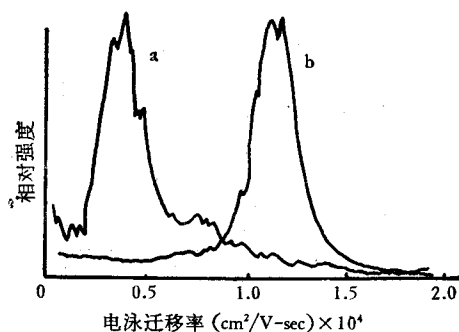


图6 神经氨酸酶对人淋巴细胞电泳迁移率的作用

a 白血病淋巴细胞 b 正常对照

(5) 淋巴细胞被植物血凝素和刀豆球蛋白作用的电泳变化^[13] 淋巴细胞悬液中加入植物血凝素和刀豆球蛋白作用后, 电泳迁移率变慢,

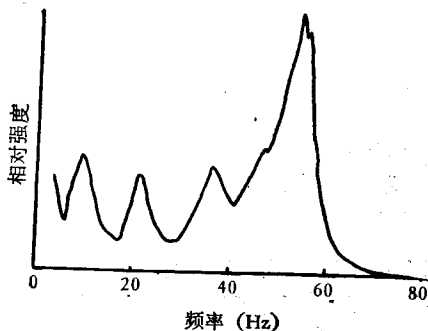


图7 人血浆电泳散射光谱

血浆稀释数倍, 溶液的 pH9.1, 离子强度 0.004。

等电点降低。

2. 测定血浆蛋白^[9]

用激光多普勒光谱法,测定正常人血浆蛋白所出现的光谱峰,从图(7)看与普通电泳的图形是相似的,高频率的大峰为白蛋白。

3. 测定抗体^[11]

Uzgiris^[11] 用此方法检测牛血清白蛋白抗体,具体方法是预先用牛血清白蛋白包被在乳胶微粒上。试验时将牛白蛋白包被的乳胶微粒放入散射池中,再加入家兔抗牛白蛋白血清,当特异抗体和乳胶表面上的抗原进行特异结合

后,就使乳胶微粒的电泳速度变慢(图 8),从而抗体被检测出来。全部反应在 30 分钟内完成。用这种激光多普勒光谱学方法能检测出 5—10 毫微克的牛血清白蛋白抗体。

频率的变化说明了抗体与微粒上的抗原发生了特异结合,乳胶微粒上结合的抗体越多,多普勒频率位移越大。特异试验结果证明当加入不同浓度的正常兔血清时,多普勒频移没有明显变化,而加入特异抗血清后,则发生明显变化。原来牛白蛋白-乳酸微粒的电泳迁移率为 4.5,而加入抗血清后下降到 2.8 左右,再加抗血清,则电泳迁移率再次变慢,直至降到 1.7。这说明加入抗血清后多普勒频率的变化是特异的。

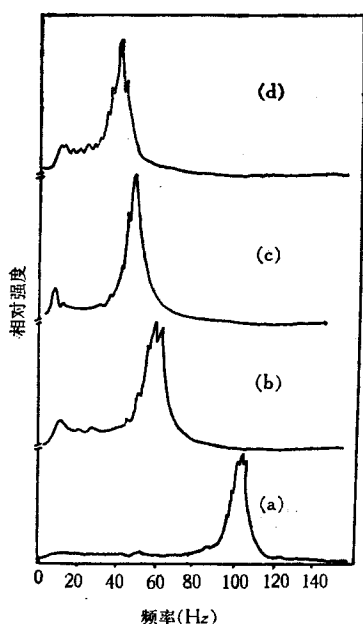


图 8 加入不同量的兔抗牛白蛋白血清(RABAS)于牛白蛋白包被的粒子悬液(1.5×10^6 粒子/毫升)中的多普勒光谱

- (a) 未加入抗血清 53V/cm
(b) 加入 5×10^{-6} 稀释度的抗血清 50V/cm
(c) 加入 10^{-5} 稀释度的抗血清 50V/cm
(d) 加入 3.5×10^{-5} 稀释度的抗血清 50V/cm

参 考 文 献

- [1] Smith, B. A. et al.: *Contemporary topics in analytical and clinical chemistry* (Hercules et al. ed.), 2, 29, Plenum press 1978.
- [2] 清华大学等:《激光杂志》, 3, 13, 1976.
- [3] Mohn, R. et al.: *Anal. Biochem.*, 70, 506, 1976.
- [4] Hass, D. D. et al.: *ibid.*, 74, 175, 1976.
- [5] Uzgiris, E. E. et al.: *ibid.*, 60, 455, 1974.
- [6] Smith, B. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73, 2388, 1976.
- [7] Lumer, S. J. et al.: *Nature*, 269, 719, 1977.
- [8] Kaplan, J. H. et al.: *J. Immunological Methods*, 27, 241, 1979.
- [9] Uzgiris, E. E. et al.: *J. Immunol.*, 117, 2165, 1976.
- [10] Uzgiris, E. E.: *Rev. Sci. Instrum.*, 45, 74, 1974.
- [11] Uzgiris, E. E.: *J. Immunological Methods*, 10, 85, 1976.
- [12] Smith, B. A.: *J. Immunol.*, 120, 921, 1978.
- [13] Kaplan, J. H. et al.: *J. Immunological Methods*, 7, 337, 1975.

[本文于1982年11月29日收到]

学术动态

大分子及亚细胞生物物理专题讨论会

准备在 1983—1984 年组织三次:

1. 1983 年 7 月 17—21 日 国际正常及病变膜结构与功能讨论会(巴西 Sao paulo) 巴西生化学会 Q. S. Takin.

2. 1983 年 9 月 27—29 日 线粒体膜上蛋白离子

及电子的传运(英国生化学会/I, μ , B. S. Doonan)。

3. 1984 年 11 月 18—22 日 国际生物膜的结构发生与传输性质工作会议。(印度 Madurai Kamcioj 大学, C. Rajamanickam)