新技术讲座

编者的话: 微弱发光分析技术和测量仪器近年获得了快速发展, 并在生物、医学、化学、环境等科研与应用领域得到了广泛应用. 为了介绍和推广这项技术, 我们特意组织此次系列讲座, 将从本期开始在“新技术讲座”栏目逐期发表介绍微弱发光分析技术原理及应用的文章, 希望能对读者有所帮助.

微弱发光分析技术原理及应用实例 (一)

张仲伦
(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要　微弱发光分析技术近年得到迅速发展, 在自由基、活性氧分析、化学发光分析、生物的超微弱发光分析、发光免疫分析、生物发光分析等领域得到广泛应用. 简要介绍了微弱发光分析技术的测量原理, 并以一些研究成果为实例讲解如何应用微弱发光分析技术进行研究和实践.

关键词　发光分析, 微弱发光测量
学科分类号　Q6-33

1　微弱发光现象

发光现象是生物、化学、物理变化中最基本过程之一. 现已发现, 所有生物机体都存在一种极微弱的光子辐射, 称之为生物的超微弱发光. 其光谱在 180～800 nm 范围, 光强很弱, 只有 10～10000 光子/s·cm^2. 光虽很弱, 但这种发光现象却与生物系统内的氧化代谢、细胞分裂、光合作用、以及各种生化反应过程有着内在联系. 近年来, 生物学家、化学家和医学家把这种发光测量应用于生物、化学、医学等科研和应用领域形成发光分析技术.

2　发光分析技术

2.1　自由基、活性氧分析

自由基、活性氧的产生、变化总是伴随着光子的发射. 发光检测自由基和活性氧, 可与 ESR 方法相辅相成.

2.2　化学发光分析

化学物质之间产生化学反应时, 部分化学能总是以光的形式发射出来, 探测化学发光的变化规律是研究各种化学反应和生物化学反应的有力手段. 化学发光分析已成为分析化学、电化学、生物化学领域不可缺少的方法.

2.3　超微弱发光分析

人、动物、植物和微生物所具有的超微弱发光, 是生命体本身所固有的一种属性. 这种发光可以通过对生物大分子、细胞、亚细胞组分或生物活体、器官及体液的直接测量探测出来.

2.4　发光免疫分析

发光测量可用于测量人体的激素、维生素、药物及微量元素的含量, 发光免疫分析已成为医学临床免疫检测方法的重要发展方向.

2.5　生物发光分析

现已发展成以荧光素-荧光素酶为代表的细菌发光测试体系.

3　微弱发光测量原理

微弱发光测量原理就是将发光的生物或化学样品置于黑暗的环境中, 用灵敏度极高的光探测器接收来自样品的微弱光, 将其转换成电信号, 再用电路放大, 用微机分析处理, 从而获得样品系统的发光信息 (图 1). 由于样品发出的光很弱, 就要求光探测器的探测灵敏度极高, 信号放大倍数很大, 噪声干扰很小.

BPCL 微弱发光测量仪[1]就是用这种原理研制出的, 适用于生物、化学、医学、环保、农业、食品等各领域的仪器. 该仪器已经过了几种型号改进, 现在的 BPCL-4 型微弱发光测量仪已实现了微机化采集、分析数据.

收稿日期: 1999-04-29, 修回日期: 1999-06-07

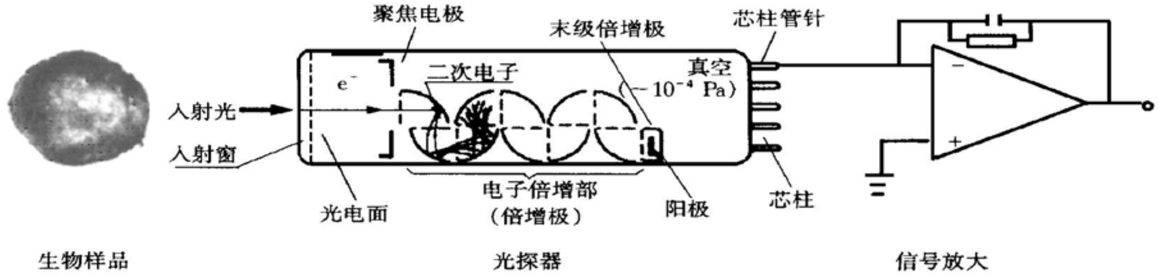

图 1 微弱发光测量原理图

4 细胞内自由基的探测——微弱发光分析技术应用实例之一

自由基在抗杀微生物和抗杀肿瘤以及机体防护疾病活动中都起着重要作用. PMA (phorbol-1, 2-myristate-1, 3-acetate) 刺激巨噬细胞而产生呼吸爆发, 增加氧的摄取和释放氧自由基. 忻文娟教授研究组应用微弱发光分析技术所进行的研究[2]表明PMA 刺激巨噬细胞而产生的不仅有超氧阴离子还有NO 自由基. 这两种自由基可以互相反应并形成过氧化硝基阴离子, 它能氧化细胞膜损伤蛋白质和酶且在免疫学中起重要作用.

PMA 刺激巨噬细胞产生 NO 和氧自由基的动力学过程是需要研究的很关键、很有价值的问题. 对这个动力学过程应用微弱发光测量技术进行研究的方法如下: 先将巨噬细胞孵化和分离用 15~20 ml $HSCH_2COONa$ (1%) 注射进 Wistar 大鼠 (250 g) 腹腔, 孵化 24 h. 抽出腹水 100 g, 4 ℃离心 12 min. 细胞在 HBSS (8 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.15 g/L $NaHCO_3$, 0.152 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$, 0.06 g/L KH_2PO_4, 葡萄糖 1 g/L) 中分散, 红细胞低渗除去. 提取的巨噬细胞用台兰氏染色进行检验.

然后进行化学发光测量: 由 PMA 刺激巨噬细胞产生的化学发光用 BPCL 型微弱发光测量仪进行测量. 溶液的总体积是 2 ml. 巨噬细胞在HBSS 中的浓度是 10^6 ~ 10^7 个/ml. PMA 的浓度是 10~100 μg/L. L-精氨酸和 Nω-硝基-L-精氨酸的浓度是 5~40 μmol/L. 先是用 L-精氨酸和 Nω-硝基-L-精氨酸孵化 4 min, 然后加入 PMA 再孵化 1 min, 立即测量化学发光. 测量过程温度保持在 37 ℃.

研究结果发现 PMA 刺激的巨噬细胞给出的化学发光来自两个过程. 一个来自巨噬细胞呼吸爆发产生的活性氧, 另一个来自 NO 合成酶产生的 NO 与 NADPH 氧化酶产生的超氧阴离子之间反应形成的过氧化硝基. 当 PMA 和巨噬细胞的比例适当的时候, 由 PMA 刺激巨噬细胞产生的化学发光曲线上出现两个峰值. 第二个峰总是晚于第一峰几分钟出现. 图 2 (引自文献 [2]) 曲线 b 和 c 示出氧自由基和 NO 自由基产生的两个发光峰.

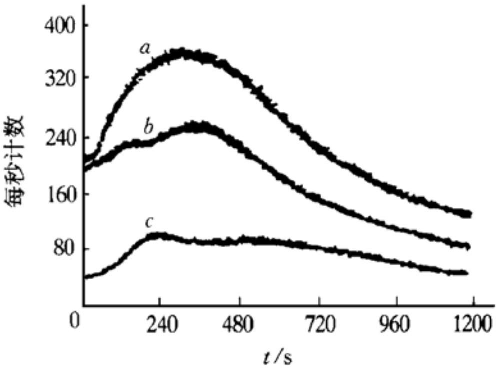

图 2 巨噬细胞产生的化学发光

应用底物和 NO 合成酶的抑制剂进行的研究发现, 前一峰主要来自氧自由基而后一个则主要来自 NO 自由基. 这种动力学研究对于确认 NADPH 氧化酶和 NO 合成酶之间的关系是很有价值的, 对于揭示 NO 合成酶的活化过程是很有帮助的.

参 考 文 献

1 张仲纶, 郑雁珍, 苏 震等 (Zhang Z L, Zheng Y Z, Su Z, *et al*). 单片微机化微弱发光测量仪及其在肿瘤研究中的初步应用. 生物医学工程学杂志 (J Biomed Eng), 1994, **11** (1): 24 ~ 30

2 Li H T, Zhao B L, Hou J W, *et al*. Two-peak kinetic curve of the chemiluminescence in phorbol-induced macrophage. Biochemical and Biophysical Research Communication, 1996, **223** (2): 311~ 314

Ultra-weak Chemiluminescence Analysis Technology: Principle and Aplication (Ⅰ). ZHANG Zhong-Lun (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100101, China).

Abstract CL analysis technology were rapidly developed in recent years. It is widely used in the fields of free radicle analysis, chemiluminescence, ultra-weak CL in live system, CL immunoassay, bioluminescence. Principle of ultra-weak chemiluminescence analysis is introduced. Research and practice that was processed by chemiluminescence analysis were explained with several investigation results.

Key words luminescence analysis, ultra-weak chemiluminescence

选择感染性噬菌体（SIP）技术：一种新的相互作用分子筛选技术

隋建华 宋增璇

(中国医学科学院 中国协和医科大学血液学研究所，实验血液学国家重点实验室，天津 300020)

摘要 选择感染性噬菌体（SIP）技术是利用丝状噬菌体次要衣壳蛋白 P Ⅲ的分子结构组件，并以噬菌体展示技术为基础发展而来．SIP 的技术关键在于使没有感染性的噬菌体颗粒必须严格依赖分子间的相互作用、结合而重获感染性，已有的研究表明 SIP 技术可望成为一项获得相互作用分子对的极其有效和高度特异性的新技术，具有广阔的应用前景．

关键词 选择感染性噬菌体，分子间相互作用，技术

学科分类号 Q7-1

分子间的相互作用，尤其是蛋白质间的相互作用几乎涉及全部的生命过程，其重要的理论和应用价值推动着新技术的不断出现和发展．噬菌体展示技术是其中之一，该技术以其筛选体系的快速、简便已远非常规的筛选表达性基因文库（如 λgt11）所能比拟，而在此基础上，Plückthun 领导的研究小组近几年来致力于选择感染性噬菌体（selectively infective phage，SIP）技术的开发、改进和完善[1~7]，使得筛选过程更为快速有效，较噬菌体展示又具明显的优点．SIP 技术的核心在于：缺失 P Ⅲ分子一定结构组件后丧失感染性的噬菌体颗粒，重获其感染能力必须使 P Ⅲ分子结构组件恢复完整，而这一过程必须依赖相互作用分子间发生特异性结合．因而这项技术对于研究分子间相互作用及从大量文库筛选相互作用的分子对（如蛋白质-配基，抗原-抗体）等工作具有很好的应用价值，现仅就 SIP 技术的建立和研究现状作一简要介绍．

1 SIP 技术的建立

丝状噬菌体是仅能感染具有 F 纤毛的革兰氏阴性菌的一组单链噬菌体，其次要衣壳蛋白 P Ⅲ位于尾端，为噬菌体感染 *E. coli* 所必需．目前在噬菌体展示技术中最常用的就是 P Ⅲ展示，即将外源蛋白或多肽与 P Ⅲ的 N 端融合，从而使它们展示于噬菌体的表面，再利用其与特定配基亲和结合的性质进行筛选，一般需经过 3~5 轮亲和结合-洗涤-洗脱-增殖（洗脱下来的噬菌体，因为它保留感染性，能在细菌细胞繁殖）的富集过程（panning），才能从 10^9~10^{10}的文库中筛到携目的基因的克隆．

P Ⅲ分子是噬菌体展示技术中关键的“工具”分子，其分子质量为 42 ku，共 406 个氨基酸残基（aa），由三个结构域组成．氨基端结构域（NT），N1（68aa）和 N2（131aa）以及羧基端结构域（CT），150aa．中间分别由两个富含甘氨酸的连接肽（18aa 的 G1 和 39aa 的 G2）相连．深入研究这些结构组件的功能特点表明：N1 参与穿细菌细胞膜，对于噬菌体感染必不可少；N2 参与吸附 F 纤毛；CT 则与噬菌体颗粒从细菌胞内的释放、成熟有关；G1 和 G2 可增强噬菌体的感染性．

在上述研究基础上，为了使筛选更有效快速，人们设计并实现了首先使噬菌体颗粒失去感染性，

收稿日期：1998-11-26，修回日期：1999-04-13