

## 新技术讲座

## 微弱发光分析技术应用实例 (二)

张仲伦

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要** 微弱发光测量仪是根据微弱发光分析技术研制的测量样品微弱发光的仪器。BPCL 型微弱发光测量仪具有多种重要功能, 可满足生物、医学、化学等领域研究与应用的需要。简要介绍微弱发光测量仪在 DNA 氧化损伤规律的研究中的应用实例, 说明了这种技术和仪器的先进性与实用性。

**关键词** 微弱发光测量仪, DNA 损伤

**学科分类号** Q6-33

## 5 BPCL 型微弱发光测量仪

仪器的设计与生产已经过了几种型号改进, 现在的 BPCL-4 型微弱发光测量仪 (图 1) 已实现了微机化采集、分析数据, 具有以下几种重要功能。

**5.1 高灵敏度、大探测面积** 光电倍增管光阴极兰光光照灵敏度达到  $8\sim 15 \mu\text{A}/\text{lm}$ , 测光窗口面积达到  $12 \text{ cm}^2$ , 具有较高的探测效率。

**5.2 大样品室** 样品室体积为  $14 \text{ cm} \times 14 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ , 甚至可放入一只小动物直接测量。

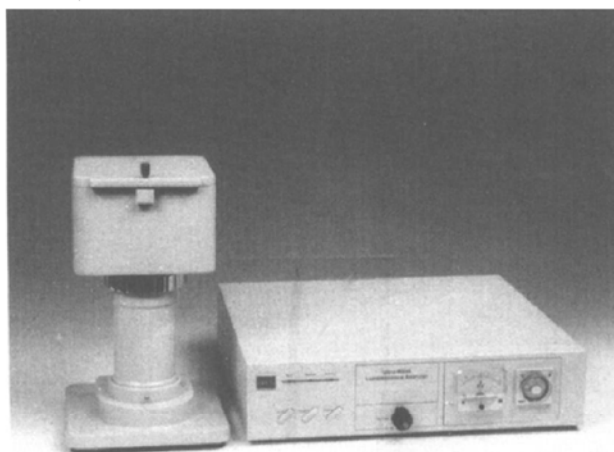


图 1 BPCL 型微弱发光测量仪

**5.3 量程自动转换** 采用光强计数方法, 量程范围宽广, 可覆盖五个量程。

**5.4 配备标准光源**, 可以经常校正仪器灵敏度, 因而系统长期稳定性得以保证。

**5.5 样品杯温度控制** 在室温至  $45^\circ\text{C}$  范围, 样品

杯温度可控制在  $\pm 1^\circ\text{C}$  之内。

**5.6 数据采集和处理分析已实现微机化** 提供接口板, 可与微机相连。

**5.7 软件可提供 For Windows 3. x/9x 版本**, 可以实时采集数据, 具有友好的交互界面 (图 2)。

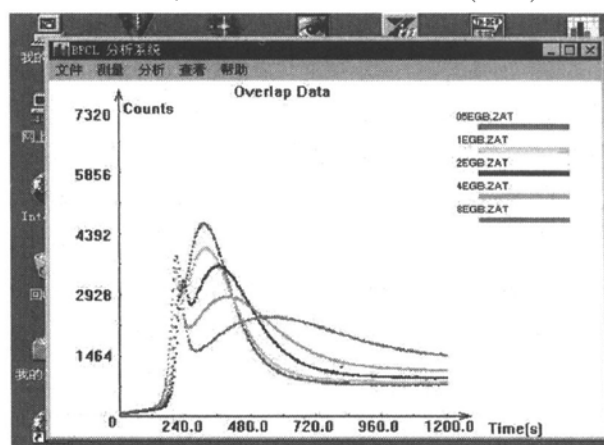


图 2 BPCL 型微弱发光测量仪软件的 Win95 界面

**5.8 提供正常值、光谱、人体样品、其他样品四种数据采集和输入模式**, 可测量发光动力学曲线并对其任意时间间隔积分。

**5.9 可以对数据文件进行自动批处理** 选择一批测量数据文件, 减除本底、计算平均值与偏差、光谱特性、样品表格皆可快速自动处理生成。

**5.10 应用一套干涉滤光片**, 从  $400\sim 745 \text{ nm}$ , 共 13 片, 还可以测量微弱发光的光谱特性。

收稿日期: 1999-06-10, 修回日期: 1999-07-23

## 6 DNA 的损伤发光测定——微弱发光分析技术应用实例之二

DNA 的氧化损伤在癌症、衰老等疾病的发生过程中起着重要的作用，羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 一直被认为是引起 DNA 损伤的重要因素。最近研究表明，脂质过氧化在活性氧介导的 DNA 损伤中的作用不容忽视，而一些自由基清除剂作用的实验表明， $\cdot\text{OH}$  的清除剂能够明显抑制脂质过氧化引起的 DNA 结构的变化及 8-羟基鸟嘌呤的生成，说明在脂质过氧化过程中发生了  $\cdot\text{OH}$  对 DNA 的攻击。因此，在  $\cdot\text{OH}$  损伤 DNA 的体系中研究抗氧化剂的作用，对于 DNA 损伤防护和药物开发具有重要的意义。

中国科学院生物物理研究所细胞室曹恩华教授研究组多年从事 DNA 损伤与修复的研究，近年他们采用了化学发光测量方法研究了 DNA 氧化损伤时的化学发光动力学<sup>[1]</sup>。他们所用的方法如下<sup>[2]</sup>：用 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 5.5) 配制  $\text{CuSO}_4$ -phen (邻啡罗啉)-vit C-DNA-TP (茶多酚) 溶液，使  $\text{Cu}^{2+}$ 、phen、vit C 终浓度分别为  $5 \times 10^{-5}$  mol/L、 $3.5 \times 10^{-4}$  mol/L、 $3.5 \times 10^{-4}$  mol/L，根据需要加入一定量的 DNA。取该溶液 1 ml，放入发光仪样品池中，加入 200  $\mu\text{l}$  3% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  原液，使其终浓度为 0.5%，立即测量化学发光反应动力学曲线。

在他们的此项研究中发现，DNA 氧化损伤伴随着很强的化学发光现象。在 Phen-Cu-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系中，当加入 DNA 后产生了一个迟于 Phen-Cu-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 本身发光的峰 b，如图 3 所示<sup>[3]</sup>，曲线 a 表示无 DNA 时的动力学曲线，其发光可能是由 Phen 自身氧化引起。曲线 b 表示 DNA 存在时的动力学曲线。

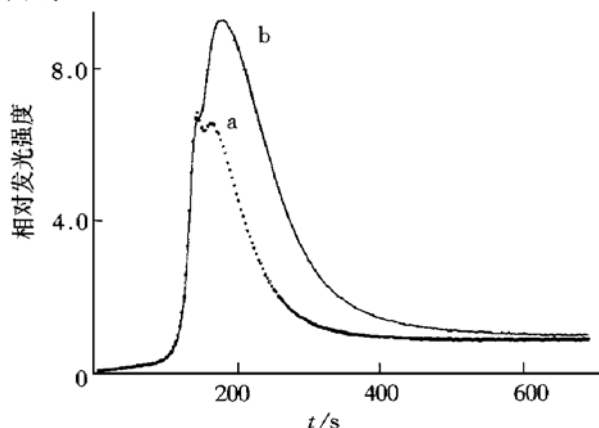
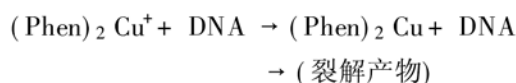


图 3 DNA 在 Phen-Cu-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系中的氧化损伤发光

Phen-Cu-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是 Sigman 等广泛研究过的具有人工核酸酶活性的物质，通过以下途径裂解 DNA：



其原理可能是  $(\text{Phen})_2 \text{Cu}(\text{II})$  被还原成  $(\text{Phen})_2 \text{Cu}(\text{I})$ ，结合到 DNA 上后，该复合物与  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应生成活性氧中间产物，特别是  $\cdot\text{OH}$ ，作用于 DNA (磷酸) 骨架，产生主要产物为 3'，或 5'，单磷酸酯末端的 DNA 片段。在这一体系中加入维生素 C (vit C) 后，伴随 DNA 的氧化降解产生很强的化学发光。因此，化学发光可以作为 DNA 氧化损伤的一种检测方法。而且发现发光强度与 DNA 浓度成正比，如图 4 所示<sup>[3]</sup>。通过研究还观察到此体系这种发光反应具有碱基特异性。在相同摩尔浓度下比较鸟嘌呤、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶对发光的影响，结果表明，只有鸟嘌呤有类似于 DNA 的发光。而核苷酸及多聚核苷酸中也只有含鸟嘌呤者存在发光，由图 4 可看出发光强度与鸟嘌呤浓度之间也有很好的线性关系。

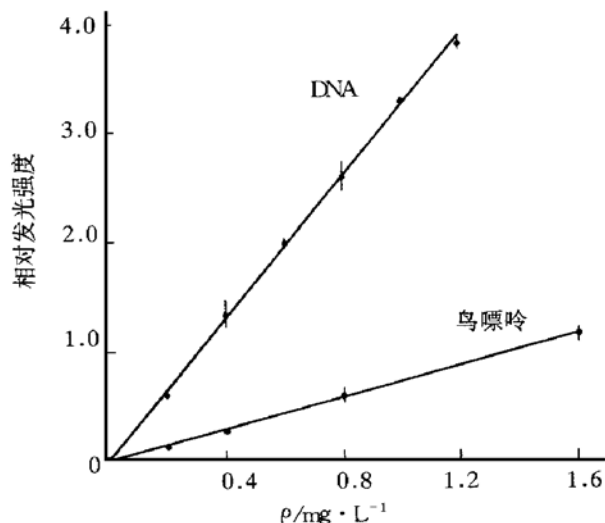


图 4 化学发光强度与 DNA 和鸟嘌呤浓度之间的关系

### 参 考 文 献

- 1 Ma W J, Cao E H, Zhang J, *et al.* Phenanthroline-Cu complex-mediated chemiluminescence of DNA and its potential use in antioxidant evaluation. *J Photochem Photobiol. B: Biology*, 1998, **44** (1): 63~ 68
- 2 张 健, 秦静芬, 曹恩华, 等 (Zhang J, Qin J F, Cao E H, *et al.*) DNA 损伤的化学发光法测定和茶多酚对它的保护作用. *生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica)*, 1996, **12** (4): 691~ 695
- 3 马文建, 曹恩华, 张 健, 等 (Ma W J, Cao E H, Zhang J, *et al.*) Phen-Cu-Vc-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系中 DNA 化学发光的碱基特异性. *生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica)*, 1997, **13** (2): 279~ 282

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

**Abstract** Ultra weak chemiluminescence analyzers that detect weak light from samples were developed by ultra weak chemiluminescence analytical technology. BPCL ultra weak chemiluminescence

analyzer has a lot of supper performance. It is satisfactory to research and application in the fields of biology, medicine and chemistry. The example that of to research DNA damage was introduced. It is approved that the technology and analyzer were advanced and practical.

**Key words** ultra weak chemiluminescence analyzer, DNA damage

## DNA 微阵列 (或芯片) 技术原理及应用

何志巍 姚开泰

(湖南医科大学肿瘤研究所, 卫生部癌变原理重点实验室, 长沙 410078)

**摘要** DNA 微阵列或芯片 (DNA microarray or chip) 技术是近年发展起来的又一新的分子生物学研究工具。它是利用光导化学合成、照相平板印刷以及固相表面化学合成等技术, 在固相表面合成成千上万个寡核苷酸探针, 或将液相合成的探针由微阵列器或机器人点样于尼龙膜或硅片上, 再与放射性同位素或荧光物标记的 DNA 或 cDNA 杂交, 用于分析 DNA 突变及多态性、DNA 测序、监测同一组织细胞在不同状态下或同一状态下多种组织细胞基因表达水平的差异、发现新的致病基因或疾病相关基因等多个研究领域。

**关键词** DNA 微阵列 (或芯片), 原理, 应用

**学科分类号** Q785

从人类基因组计划启动至今, 已积累了大量基因序列数据库, 而它们在疾病和发育中的生物学意义尚知之甚少<sup>[1,2]</sup>。目前人们正在由研究基因的结构及染色体定位的结构基因组学, 向研究这些基因表达调控、在机体发育分化及疾病中作用的功能基因组学转变<sup>[3]</sup>。而将多学科、多技术融合而成的 DNA 微阵列或芯片技术可研究同一或不同组织细胞在不同生理、病理条件下成千上万个基因结构、功能改变以及基因表达间相互作用的关系, 发现致病基因或疾病相关基因, 这必将为功能基因组学产生巨大的推动作用。本文主要介绍了该技术的概念、原理及在基因表达、基因突变或多态性分析及 DNA 测序等方面研究的最新进展。

### 1 概念理论依据

美国加州 Affymetrix 公司的 Lipshutz 等<sup>[4]</sup>较早地介绍了高密度寡核苷酸微阵列的制造、检测、软件及应用, 随后该公司将照相平板印刷技术、计算机、激光共聚焦扫描、固相表面合成寡核苷酸及核酸分子杂交等结合起来, 研制出 DNA 芯片。

DNA 微阵列或芯片是指在大规模集成电路所控制的机器人在尼龙膜或硅片固相支持物表面, 有规律地合成成千上万个代表不同基因的寡核苷酸“探针”, 或液相合成探针后由阵列器 (arrayer) 或机器人点样于固相支持物表面。这些“探针”可与用放射标记物如<sup>32</sup>P 或荧光物如荧光素、丽丝胺等标记的目的材料中的 DNA 或 cDNA 互补核酸序列相结合, 通过放射自显影或激光共聚焦显微镜扫描后, 对杂交结果进行计算机软件处理分析, 获得杂交信号的强度及分布模式图, 以此反映目的材料中有关基因表达强弱的表达谱。该技术仍以基因连锁、连锁不平衡、限制性长度多态性、可变串联重复序列及单核苷酸多态性标记等基因定位方法为基础, 采用分子杂交等多种技术方法为手段, 进行遗传作图, 对不同材料中的多个基因表达模式进行平行对比分析, 是一种高产出的、新的基因分析方法。以尼龙膜为固相支持物的 DNA 微阵列和以硅片为固相支持物的 DNA 芯片, 二者在原理上相同, 仅在支持物及检测手段等方面略有不同。