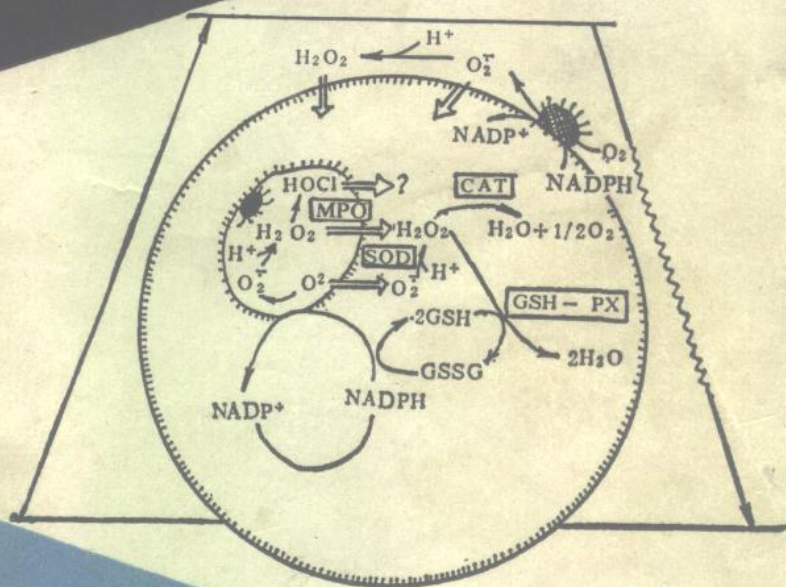


发光分析与医学



胡天喜 陈 杞
陈克明

华东师范大学出版社

发光分析与医学

胡天喜 陈 杞 等编著
陈克明 徐黻本

华东师范大学出版社

发光分析与医学

胡天喜 陈 杞 等编著
陈克明 徐骥本

华东师范大学出版社出版

(上海中山北路3663号)

新华书店上海发行所发行 江苏如东印刷厂印刷

开本: 850×1168 1/32 印张: 8 字数: 200千字

1990年2月第一版 1990年2月第一次印刷

印数: 1—3,000本

ISBN 7-5617-0543-3/N·033 定价: 4.05元

内 容 简 介

生物化学发光分析是继放射性核素示踪技术以后,近20年新发展起来一项超微量物质的分析技术。本书较全面地介绍了这一技术的最新进展,包括发光分析的物理化学原理,发光计,化学发光法测自由基和活性氧,血清的超微弱发光,吞噬细胞的化学发光,萤火虫、水母及细菌的生物发光,发光和时间分辨荧光免疫分析法,血卟啉诊治癌肿的动力学等内容。全书在讲清原理和方法的基础上,还介绍了该技术在医学上的应用,这将对应用者带来方便和实效。

本书可供从事生物化学、生理学、生物物理学、微生物学、免疫学、病理学、药理学、毒理学、临床检验学等学科的科研工作者、教师、研究生和高年级大学生阅读参考。

前 言

早在百年之前(1885年), Dubois 已提出生物发光是由“荧光素酶”与“荧光素”的化学反应所引起的。Harvey 经过四十多年的研究,于1952年发表了“生物发光”的专著。50年代初 Strehler 发表了用萤火虫粗制酶测定 ATP 和用细菌荧光素酶测定 NADH 的论文。McElroy 于 50 年代后期纯化了萤火虫荧光素和荧光素酶,并得到了结晶。至今人们已知能发光的生物,种类繁多,从低等的细菌到高等的发光鱼类,除硬水母等属于光蛋白和 Ca^{++} (或 Fe^{++}) 参与发光反应之外,其发光的主要物质几乎都是由荧光素酶、荧光素及其辅助因子所组成。随着对生物发光机制的深入研究,一些生物体的发光体系已经初步搞清,并用这些体系去分析生物体和化学中的一些微量物质。生物发光分析法渐渐地被引入医学领域,诸如通过萤火虫荧光素酶发光体系测量细菌中的 ATP,用以确定尿路感染中的细菌数;以发光细菌的发光强度为指标去定量抗菌素的效价,标定环境的污染状况等。

生物发光研究的进一步深入,发现人体的器官、组织、细胞、乃至大分子都在发光,不过发光强度更弱,称为超弱发光,或者称为低水平的化学发光。1961年苏联学者塔鲁索夫发现鼠体中肝脏和脑的发光现象;1967年柴刚亮发现血清(和血浆)的发光;1972年美国科学家 Allen 发现人血中的嗜中性白细胞在吞噬细菌过程中也伴随着化学发光,从此发展出生物超弱发光的探测技术,并很快地被应用于临床诊断。苏联 1975 年和 1984 年分别出版过“血清超弱发光及其在综合诊断上的应用”、“血液化学发光在实验和临床肿瘤学中的应用”两本专著,有甚高的应用价值。70 年代后,在国际发光会议,自由基生物学会会议和液闪测量技术会议上先后

宣读了大量关于吞噬细胞在吞噬异物时相伴随的化学发光与临床应用的文章。

生物发光是生物体内产生的化学发光现象，很多机理与化学发光相类似。生物学家、医学家大量地把化学界所研究的化学发光体系应用于医学诊断和发光机制的探索。较为广泛，也是较为成熟的体系是鲁米诺-过氧化氢体系。以后进一步发展出异鲁米诺及其衍生物、光泽精、吖啶酯、草酸盐类的发光体系及酶参与的许多发光体系。70年代中期引用这些体系于免疫分析之中，发展出生物和化学发光免疫分析法，用以测量人体的激素、维生素、药物及微量元素，其灵敏度、专一性均可与放射免疫分析法相媲美，并在局部上大有取代放射免疫分析法的趋向。有些化学反应会产生自由基，这类反应也产生化学发光现象。近年来发现人体衰老、细胞癌变、放射损伤、心血管系统的一系列病变及环境理化因子的诱发机体中原发的过程都属于自由基的化学反应。因此化学发光法还可用来测量活性氧、自由基和自由基反应。

可见光、紫外线或激光、电磁场都可激发生物体内源的荧光物质发光，根据发光的强度和光谱成份来分析生物体内微量物质的含量是发光分析技术的又一个重要领域。这一领域在医学上发展得较快的首推激光血卟啉诊治癌症和时间分辨荧光免疫分析法。前者在我国已研究了十多年之久，并取得了一批成果，后者在国际上发展也只有十来年的历史，在我国则刚刚开始。

基因工程和分子遗传学与医学密切相关，它的进展很大程度上依靠了超灵敏的放射性核素示踪技术。但是由于放射性核素的半衰期、射线的危害及价格较贵等因素，限制了对它的应用。化学发光标记和镧系元素荧光标记的灵敏度可以达到核素标记的水平，所以许多研究者正在发展发光标记技术来取代基因工程中的放射性核素标记，并已取得了一些进展。

随着发光分析技术的发展，各国厂商纷纷生产适于检测生物发光的仪器，并已生产出相应的一些试剂，我国已进口了几十台仪

器,并且已试制(和仿制)出了十几种型号的发光探测仪,为发光分析的基础和应用研究提供了强有力的武器。

发光分析技术以灵敏度高、测量快速简便著称,深受生物科学和医学科学家的重视。近十多年来,在世界范围内医学上已得到广泛的应用,解决了一批临床检测中的尖端课题。我国医学发光分析的研究起步较迟,至今研究的单位还不多,队伍也不大;随着发光计和发光试剂的投产,这一技术的应用已出现良好的势头。为了推广这一先进技术在医学科研和临床中的应用,我们特地编写了本书。利用本书的原稿为教材,曾举办过多期学习班,来自全国的学员反映良好,并提出了很多宝贵的意见,促进本书的修改和提高。

全书较系统地介绍了生物、化学发光的理论基础、探测方法;萤火虫、发光细菌的生物发光;吞噬细胞、血清的超弱发光体系;还较全面地介绍了发光和时间分辨荧光免疫分析法和血卟啉光动力学治癌。作者对发光分析技术及其在医学上的应用都有较丰富的实践经验,书中有些内容是自己的研究成果。参与本书编写的有华东师范大学生物系胡天喜(前言和第4、5、11章)、朱文杰(第6章);第二军医大学陈克明(第7、8章)、陈杞(第10章)、张丽民(第9章);中国科学院上海分院测试所孙炳荣(第2章);复旦大学李庆国(第1章)、蔡怀新、陈暨耀(第12章)和中国药科大学徐贻本(第3章)。全书由胡天喜、陈杞、陈克明、徐贻本主持统稿。在编写中我们深感发光分析是一项新兴技术,许多内容还不很成熟,加之编者的水平有限,时间仓促,错误和缺点在所难免,竭诚欢迎读者指正。

目 录

第 一 章	生物发光和化学发光的物理化学原理	(1)
第 二 章	发光光度计	(21)
第 三 章	活性氧的发光分析及其应用	(48)
第 四 章	血清的超弱发光与疾病诊断	(68)
第 五 章	吞噬细胞的发光与机体的免疫功能	(89)
第 六 章	发光细菌及其发光系统的应用	(104)
第 七 章	水母发光蛋白及其在医学中的应用	(124)
第 八 章	虫荧光素酶发光系统及其在医学中的应 用	(132)
第 九 章	化学发光物质的合成及发光标记	(148)
第 十 章	发光免疫分析技术及其应用	(167)
第十一章	时间分辨荧光免疫分析法	(187)
第十二章	血卟啉药物的光敏作用和肿瘤光动力疗 法	(203)
参考文献		(221)
英汉词汇对照表		(231)

第一章 生物发光和化学发光的 物理化学原理

化学发光是指化学反应引起反应产物形成激发态，若此产物分子具有发射荧光的能力，则可放出光子，或者是凭借能量转移机制，将激发能转移至受体分子上，由受体分子发射出光子。生物发光通常是指由酶参与的化学发光现象。这些发光现象从发光的本质来说，和物质的发射荧光或磷光现象是类似的。本章介绍生物发光和化学发光现象的一般物理化学原理，以及它与物质发光现象相比所固有的某些特点。

第一节 分子的电子状态、轨道和能级

从量子力学规律中知道，原子核外的电子只能停留在核外一定的轨道上。这些轨道是不连续的，每一轨道相当于一定的能量状态。在分子中，由原子的电子轨道组合成分子轨道。以乙烯分子和甲醛分子为例，如图 1-1 显示了分子的 σ 轨道和 π 轨道。 σ 轨道主要定域在两个原子核之间。它是由两个原子的 S 电子，或 S 电子与 P 电子形成。 π 轨道分布在两原子共平面的两侧，并由两个 P 电子（如两个 $2P_z$ 电子）形成。两种轨道都具有特异的电子云分布空间。这两种轨道的区别在于相对于原子核之间的轴线（或分子平面）的对称性不同。 σ 轨道相对于键轴具有圆柱对称性；而 π 轨道是反对称的，相当于绕键轴旋转了 180° 。

这里所提及的 σ 和 π 轨道都是分子的基态轨道，具有最低能量。在室温时，这些轨道都被电子占据。每一轨道上可有两个自旋相反的电子。除了这些基态成键轨道外，分子还有能量较高的

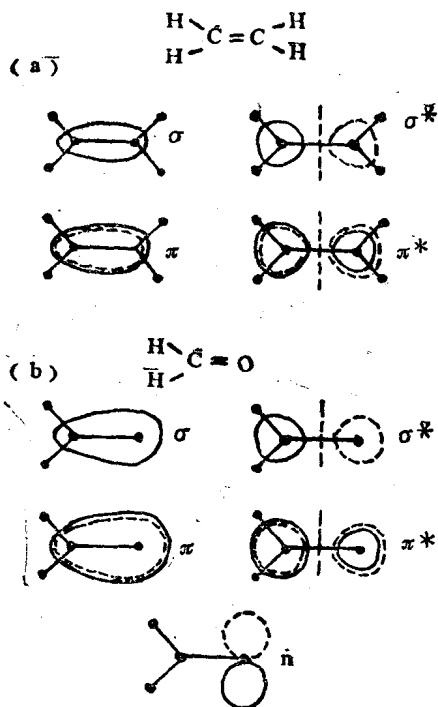


图 1-1 乙烯和甲醛分子中部份分子轨道示意图.

这两个分子都是平面分子。其分子面是该书页的平面。碳—碳 σ 轨道有着对键轴的圆柱对称性。相应的 σ^* 轨道具有同样的对称性。但在两个原子间的中途有一个节点。图中未表示出碳—氢键的 σ 和 σ^* 轨道。 π 轨道的节平面在分子的平面上。轨道的一部分（外周的实线）延伸到该平面的上方。符号相反的另一部分（内圈的虚线）伸到该平面的下方。 π^* 轨道在两个碳原子的中间有另一个节点。(a)为乙烯分子。(b)为甲醛分子，它除了具有与乙烯同样的分子轨道外，在甲醛的氧原子上，还存在另一种 n 轨道。（史密斯，1984）

反键轨道，即 σ^* 和 π^* 轨道，又被称之为激发态轨道。当合适光子的能量被分子吸收后，将使处于基态的分子跃入激发态。除了上面这些参预形成价键的共价电子外，在有些分子中，如甲醛中的氧原子，还具有不参预形成共价键的孤对电子，又被称之为 n 电

子。 n 电子也可进入 π^* 激发态。因此总的电子跃迁可如图 1-2 所示,存在数种形式。当 π 轨道上的电子跃入激发态时,称为 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁;而 n 轨道上的电子跃入 π^* 轨道,则称为 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁。

图 1-2 中所示的分子能级也表示了它们之间的能级高低。由于 π 和 π^* 间以及 n 和 π^* 能级间相距较近,因此在一般光学中所遇到的电子跃迁大都是由这两种跃迁而引起的。此外,在图 1-2 所示的每一能级上,按照泡利原理,可以容纳两个自旋相反的电子(即 $+1/2$ 和 $-1/2$)。这些轨道的自旋状态可用一个量子数 $2S+1$ 来表示,它又被称为状态的多重性, S 为总的电子自旋。分子中总的电子自旋为零时,状态的多重性等于 1,被称为单线态。而当总自旋 $S=1$,即有两个自旋相同的电子,则多重性等于 3,被称为三重态。由于电子——电子的排斥能在线态中低于在单线态中,因此三线态在能量上总是低于轨道构型相同的单线态。在分子的电子跃迁中当然也包括了 $\sigma \rightarrow \pi^*$ 跃迁,但由于这种跃迁能量很高,其光子能量比 220nm 波长还要短,因此超出了光生物学感兴趣的范围。物理学规律说明,电子在跃迁时不能改变自旋。因此单重态——三重态跃迁,从光谱学中的选择规律来说是禁戒的。当然这只是在严格的保持了电子——电子间的自旋作用时,这条规律才严格遵守。当存在电子轨道运动(所产生的磁矩)与电子自旋运动(所产生的磁矩)间的相互作用时,使得这种禁戒跃迁仍然能够发生,当然跃迁机率比较低。

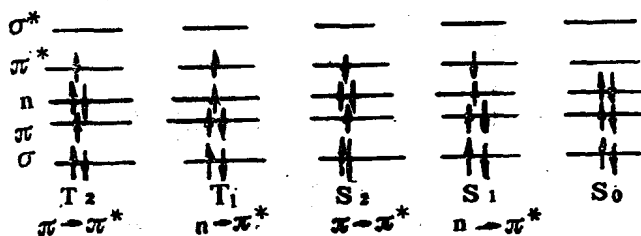


图 1-2 分子能级及电子跃迁示意图

在图 1-1 中,显示了当电子从基态转入激发态时,其电子云分布的变化。例如在 σ^* 或 π^* 激发态,在两个原子的联线上都有一个结面,电荷密度很低,从而不能平衡两个原子核在基态时所存在的相互排斥作用。因此,这种原子核间的排斥作用,可能使两原子核间距离比基态时略大。再以甲醛为例,当发生 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁时,原为属于氧原子的电子,现在有了一定程度的非定域化,属于氧和碳原子共有。从而使氧原子具有一定的正电性,碳原子具有一定的负电性,两键间的结合变弱。 $C-O$ 键变长,伸张频率较低。这些现象都体现了激发态时平衡几何构型与基态相比有了很大的差别。这一特点我们可用势能表面曲线将其表示出来。在势能曲线上,我们不但考虑了电子能级,也考虑了两原子之间的振动运动(图 1-3)。若基态与激发态分子平衡几何构型相同,则这两种状

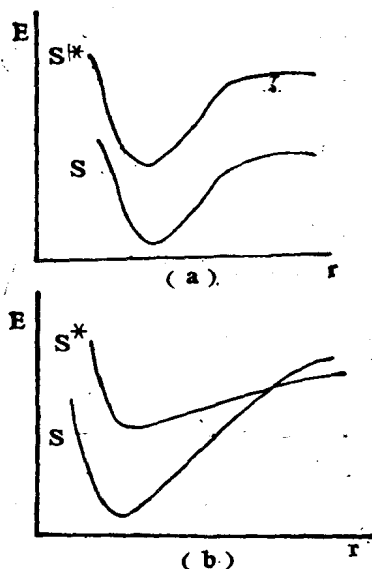


图 1-3 分子的势能曲线图示

E 表示势能, r 为两原子核间距离, S 为基态, S^* 为激发态。
(a) S 和 S^* 有相似的势能曲线。(b) S^* 有较大的变化,并与 S 有一个交点(Reid, 1957)

态的势能曲线是一样的。但由于上面提及的在激发态时，激发态分子的平衡几何构型的变化，激发态势能曲线将有很大的变化，在某种情况下，将会出现激发态势能曲线与基态势能曲线相交的情况。在交点处，基态分子与激发态分子有类似的平衡几何构型，并可经无辐射跃迁从激发态转入基态，或者是在不经光子吸收激发时，就能从基态转入激发态。这一现象是产生化学发光现象的物理基础。

第二节 有机分子的光致发光规律

在物理上所见到的分子发光现象，都是由于处于较高能级的激发态分子，在向基态跃迁时发射出光子。一个能在可见区范围内具有发光能力的分子，大都具有某个色素团，从而具有吸收在近紫外区至可见光区光子的能力。其吸收光子的能量，与其在激发态和基态的能级差一致。处于激发态的分子带有较高的能量，因而不是不稳定的，它一定会以某种形式释放出激发能。在图 1-4 中

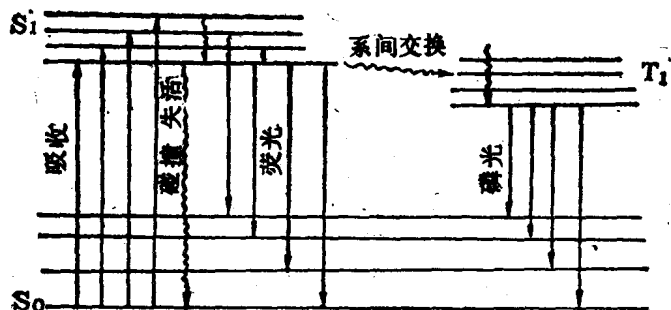


图 1-4 激发态分子能量转换图示

直线表示辐射跃迁。波浪线表示非辐射跃迁（碰撞失活）。 S_0 为单重态基态。 S_1 为单重态第一激发态。 T_1 为三重态第一激发态。每一电子能级叠加了若干振动能级。从 S_1 向 T_1 的跃迁，称为系间交换。（程极济，1987）

显示了激发能转换的几种主要过程。

激发能的转换过程又称为激发能的弛豫过程。通过弛豫过程,原处于激发态的分子将丢失其能量,并重新处于基态。图 1-4 所示的弛豫过程,可分为以下几种形式:①内转换:处于同一电子激发能级但不同振动能级上的各个分子,以及处于不同电子激发态上的各分子,由于相互碰撞作用而损失部份能量,最后都处于第一单重激发态的最低振动能级上;②非辐射跃迁:分子间由于互相碰撞而失活回至基态;③辐射跃迁:发射出荧光或磷光,它们分别自单重激发态或三重激发态的最低振动能级向基态跃迁时发射出光子;④系间交换:自单重态转入三重态的过程;⑤激发能转移:激发能转移至另一受体分子上;⑥光化反应:指处于一定激发能级的分子所完成的化学反应。下面就其中几个较为重要的过程略作叙述。

一、荧光

处于单重激发态的分子向基态跃迁时的发射称为荧光。由于内转换过程,分子总是从第一单重激发态的最低振动能级向基态跃迁,从而产生部分热振动能的损失。这一过程使得荧光光谱最大值与吸收光谱最大值相比,总位于较长波长的方向。这是有机分子荧光发射的第一个特点。分子在激发态总有一极短时间的停留,其停留时间的长短,用荧光强度弛豫至原强度的 $1/e$ 所需时间(称为期间或荧光寿命)来计算。对于一般分子,荧光期间很短,在 10^{-9} 秒左右,但具有一定的激发态寿命是荧光发射区别于其它种发射所具有的不同特征。在荧光测量中,荧光期间是一个重要参数。在荧光测量中,另一个重要参数是荧光量子效率。它定义为发射量子数与吸收量子数的比值:

$$Q_F = \text{发射量子数} / \text{吸收量子数}$$

它反映了某物质将其吸收光子转变为发射光子的本领大小。对于大多数物质,在其吸收波长范围内,它的荧光量子效率保持为一常数。荧光测量的第三个参数是测定具有某一最大强度发射波长的

发射光谱。一般情况下，一物质的发射光谱保持恒定，不随激发波长而变化，这一点往往成为从发射光谱来对发射物质进行定性分析的依据。

二、磷光

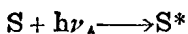
大多数分子在基态时，不含有不成对电子（氧为例外，它是三重态），处于单重态。在跃入激发态时，也仍保持其自旋状态，即为单重态激发态。但是若存在较强的自旋——轨道的偶合，减弱了自旋-自旋偶合，则就能发生系间交换，使单重态分子转入三重态。

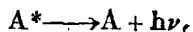
由于分子在三重态激发能级上的电子自旋与基态上的电子一样，受禁界跃迁规律的限制，分子在三重态将有较长时间的停留，从而使磷光期间可延长至 10^{-8} 秒至 10 秒以内。在室温条件下，由于增加了互相碰撞的几率，使激发能消失回至基态。这是在室温时，许多物质由于三重态猝灭而不发光的原因。但在低温条件下，电子冻结在三重态上，有可能（虽然发射几率较低）自三重态向基态跃迁并发射出光子。此种发射称为磷光。磷光发射除了有较长的期间这一特点外，发射光谱的最大值位置与荧光最大值波长相比，也移向长波长的方向。

三、能量转移

处于激发态的分子可以通过能量转移将激发能转移给某一受体分子。这种转移的一种最主要形式是共振转移。在许多种生物发光现象中所遇见的敏化荧光现象，就是共振转移的一种形式。

激发能的共振转移需要满足三个条件：①能量供体必须是发荧光的；②供体的荧光光谱必须与受体的吸收光谱有重叠，光谱重叠得愈多，能量转移效率也愈高；③供体和受体间的距离在 50—100 Å 以内。敏化荧光现象过程可表示为：





S 分子被称为敏化剂，A 分子在能量转移体系中为能量受体。它由于受敏化剂分子的诱导而激发荧光。 $h\nu_A$ 为吸收光量子， $h\nu_f$ 为发射光量子。

能量转移是一种很复杂的光学现象。它的本质可从量子力学中去理解。简单地说，可理解为是由于能量供体和能量受体分子在空间所产生的电磁相互作用的结果。正如同两个偶极子的振动频率相同时，而发生两个偶联偶极子的共振，从而产生能量转移一样。在共振转移时所必须满足的条件，类似为在两个偶极子间保持了振动频率相同的条件。能量转移过程的重要特点是在这种转移过程中，不包含有光子的发射与再吸收，两者间也不需要有任何实物介质的联系，仅仅依靠分子间的电磁作用进行能量转移。

第三节 化学自由能导致 激发态生成的过程

化学发光是先由一化学反应，然后跟随一物理过程，将化学反应能转变为发光和热。从反应过程本身来说，它与一般的有机化学反应可能无特别之处。由化学反应所产生的发光现象也是很常见的，例如，在一般放热反应，低压气体反应，绝热过程等反应中，就常见有光子辐射，至少形成分子振动能级的激发，而放出红外光子。但在这一过程中，一个重要的问题是化学能如何导致激发态的形成。

由于光的发射是一量子化过程，引入了一个短寿命的激发态（典型期间为 10^{-8} 秒），从而可以推论，依靠连续发生的化学反应，使能量不断增加而最后产生光子发射的过程是不存在的。对于一化学反应可能有多种途径，但对于一光反应的形成，一定是化学反应中的最后中间体 I 使反应终止，并在获取一定的激发能 E_A 后，形成一个激发态产物 P^* ，然后开始产物辐射光子的一系列物理

过程。发光是由激发态产物 P^* 向基态的辐射跃迁而引起的。辐射跃迁时间常数 $K_F \approx 10^9 \text{ 秒}^{-1}$ ，在激发态和基态中都有一些振动弛豫过程，其速率常数 $K_{IC} = 10^{12} \text{ 秒}^{-1}$ 。图 1-5 中描述了这一过程。

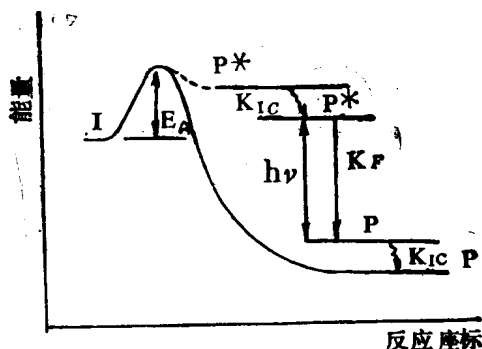


图 1-5 化学发光反应能级示意图

K_{IC} 为内转换速率常数， K_F 为荧光发射速率常数，I 为化学反应最终产物， E_A 为产物 I 形成激发态产物 P^* 所需求的活化能 (Wampler 1978)

一、热力学过程

通常假定在一化学反应中，所发射的光子的最高能量(最短辐射波长)必须低于反应热。但在—发光的化学反应中，这一假定往往不完全满足。在化学发光中，由于分子在热振动能级上的布居，那些处于较高振动能级的分子，有可能得到活化能而进入激发态。这类似于从周围环境的热能中得到部分辐射能，就像在荧光辐射中的反斯托克斯辐射致冷效应。从化学反应的热力学来说，存在着下面的关系式：

$$\Delta G = K N_A h \nu$$

式中 ΔG 为化学反应自由能， N_A 为阿伏加德罗常数， $h\nu$ 为发射光子的能量， K 为转换效率。 K 值是我们在生物发光或化学发光中极为关心的发光效率问题。此公式也给出了化学反应自由能对发光能量的限制。