

# 人红细胞的共振散射光谱分析

## Resonance Scattering Spectroscopic Assay of Human Red Cell

彭一兵 谢济运\* 蒋治良\*  
Peng Yibing Xie Jiyun Jang Zhiliang

(桂林集琦药业股份有限公司 桂林 541004)  
(Guilin Jiqi Pharmaceuticals Co. Ltd., Guilin, Guangxi, 541004, China)

**摘要** 人红细胞是一种非线性光学介质, 当入射光的频率  $\nu$  不同时可获得红细胞的  $2\nu$  倍频、 $\nu/2$  分频、 $\nu/3$  分频、 $2\nu/3$  分频散射峰。它在 310 nm、470 nm、560 nm、600 nm 处产生 4 个共振散射峰。人红细胞浓度在  $0.058 \times 10^6$  个/毫升 ~  $235.5 \times 10^6$  个/毫升范围内与共振散射光强度  $I_{600\text{nm}}$  成正比, 据此建立了一个测定人红细胞浓度新方法。

**关键词** 人红细胞 非线性散射 共振散射光谱分析

中图分类号 R 446.113

**Abstract** Human red cell in solution is a nonlinear scattering medium. When the excited frequency ( $\nu$ ) was set to be different frequency, a double frequency scattering and fraction frequency scattering peaks exhibit at the frequencies of  $2\nu, \nu/2, \nu/3$  and  $2\nu/3$ . There are four resonance scattering peaks at 310 nm, 470 nm, 560 nm and 600 nm for the red cell and blood. The concentration of red cell in the range of  $0.058 \times 10^6$  cell/ml ~  $235.5 \times 10^6$  cell/ml is proportional to the intensity of resonance scattering light at 600 nm, and a novel resonance scattering method for red cell assay has been proposed.

**Key words** human red cell, nonlinear scattering, resonance scattering spectral analysis

细胞是生物体最基本的形态、生理单位; 生物体的特性决定于构成它们的各个细胞。细胞也是一切疾病发生、发展和转归的基础, 细胞的研究在生物学、医学中占有重要的地位, 处于当代生命科学发展的前沿<sup>[1,2]</sup>。显微镜 (特别是电子显微镜)、流式细胞术及聚合酶链反应 (PCR) 等检测技术的应用极大地推动了细胞及细胞凋亡研究的发展<sup>[1~3]</sup>, 但实验室至今尚无 (也不可能) 单一理想的细胞及细胞凋亡研究检测方法。共振散射光谱是一种简便灵敏的光谱分析新技术<sup>[3~10]</sup>, 近年来得到迅速发展, 国外 Pasternack 等<sup>[4]</sup>侧重于生物分子的聚集研究, 国内刘绍镁等人<sup>[6]</sup>的研究主要是痕量无机物、蛋白质、DNA 表面活性剂的分析等。我们将共振散射光谱、倍频散射光谱和分频散射光谱这一灵敏新技术应用于液相纳米粒子特性和超分子光化学研究, 建立了超分子界面能带理论、光与纳米粒子相互作用的倍频和分频散射原理、共振散射频谱分布理论; 实验结果表明, 共振散射光谱与纳米粒子和超分子的粒径、吸光特性、形貌、刚性、折光指数, 以及光源辐射强度分布等因素有关; 较大

粒径纳米微粒和超分子的界面形成是导致共振散射 (增强) 的根本原因<sup>[11~18]</sup>。我们从理论上推测, 共振散射光谱将在大粒径的细胞、细菌分析研究方面具有独特的优点。实验证实, 共振散射光谱是研究人红细胞、大肠杆菌、溃疡病菌等的灵敏分析技术。本文建立了一个人红细胞的共振散射光谱分析新方法。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器

RF-54 (型) 荧光分光光度计 (日本岛津); U-3400 型紫外-可见光分光光度计 (日本日立); Sysmen K-4500 血液分析仪 (日本神户); WP800A 型微波炉 (800W, 2450MHz) (中国顺德)。

### 1.2 主要试剂

保养液: 称取 1.3 g 枸橼酸钠、0.5 g 枸橼酸和 3.0 g 无水葡萄糖于烧杯中, 加蒸馏水至 100 ml, 微波灭菌。

### 1.3 实验方法

全血 A: 取 0.5 ml 抗凝血液 (0.4 ml 人血液加 0.1 ml 保养液) 用 0.9% NaCl 溶液 (生理盐水) 稀释一定的倍数 (按原血液稀释比计算, 下同)。

红细胞 B: 取 0.5 ml 抗凝血液, 静置 0.5 h, 去血浆, 加 2 ml 保养液混匀, 以 1500 r/min 离心 6 min, 静

2001-02-20 收稿。

\* 广西师范大学化学与生命科学学院, 桂林, 541004 (College of Chemistry and Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541004, China)

置 20 min, 去上层溶液, 如此重复 4 次, 然后用生理盐水稀释至原血的 50 倍。红细胞浓度测定采用 Sysmen K-4500 血液分析仪

测定前将全血 A 和红细胞 B 混匀, 然后置于荧光分光光度计上, 在  $\lambda_{ex} = \lambda_{em}$  条件下同步扫描, 绘制共振散射光谱

## 2 结果与讨论

### 2.1 散射光谱

图 1 表明, 当激发光波长  $\lambda_{ex} = 310 \text{ nm}$  时, 红细胞溶液在 310 nm 产生 1 个 (主) 共振散射峰, 在 620 nm 和 930 nm 分别产生 1 个 1/2 和 1/3 分频共振散射峰。当  $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$  时, 在 470 nm 产生 1 个最强的 (主) 共振散射峰, 在 940 nm 有 1 个 1/2 分频共振散射峰。当  $\lambda_{ex} = 560 \text{ nm}$  时, 在 280 nm 产生 1 个 2 倍频共振散射峰, 在 840 nm 有 1 个 2/3 分频共振散射峰。这些非线性散射峰可用倍频和分频散射原理解释<sup>[14, 17]</sup>。

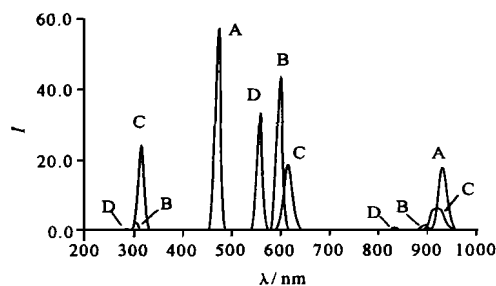


图 1 人红细胞的散射光谱

Fig. 1 Scattering spectra of human red cell

A  $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$ ; B  $\lambda_{ex} = 600 \text{ nm}$ ; C  $\lambda_{ex} = 310 \text{ nm}$ ; D  $\lambda_{ex} = 560 \text{ nm}$

### 2.2 人红细胞的共振散射光谱

人红细胞与全血的共振散射光谱轮廓相似, 因为红细胞是血液的主要有形成分。

图 2 表明, 人红细胞在 310 nm 470 nm 560 nm 600 nm 处产生 4 个共振散射峰。在 430 nm 处有 1 共振散射峰谷, 是由于该体系在 430 nm 处有一最大吸收峰。

### 2.3 人红细胞浓度与共振散射光强度的关系

液相纳米粒子体系的共振散射光谱研究结果表明<sup>[18]</sup>, 共振散射光强度函数为,

$$I_s = k'bcf(d)E_x(\lambda_{ex})E_M(\lambda_{ex})f(\Delta\lambda), \quad (1)$$

式中,  $I_s$  为共振散射光强度,  $k'$  为实验常数,  $b$  为测量池厚度,  $c$  为纳米粒子浓度,  $f(d)$  为粒径函数,  $E_x(\lambda_{ex})$  为激发光源辐射强度分布函数,  $E_M(\lambda_{ex})$  为散射光强度分布函数,  $f(\Delta\lambda)$  为荧光仪同步扫描速度函数。对于人红细胞分析体系, 红细胞粒径可看作常数,  $\Delta\lambda = 0$ , 故  $k'f(d)E_x(\lambda_{ex})E_M(\lambda_{ex})f(\Delta\lambda) = K$  为常数, 即

$$I_s = Kc, \quad (2)$$

(2) 式表明, 在一定条件下, 共振散射光强度与人红细胞 (或超分子) 浓度  $c$  成正比

实验结果 (表 1) 表明, 红细胞浓度  $C$  (个/毫升) 与同步共振散射光强度成良好线性关系, 这与理论分析一致。根据表 1, 可采用共振散射光谱法测定红细胞浓度及进行红细胞研究。

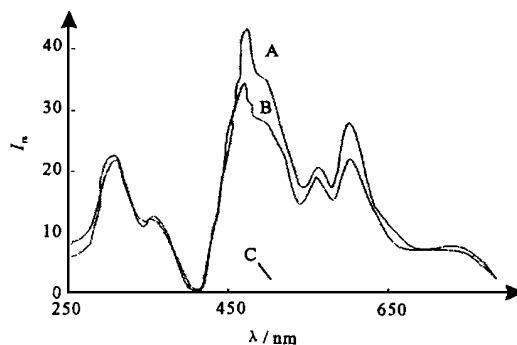


图 2 红细胞和血液的共振散射光谱

Fig. 2 Resonance scattering spectra of human red cell and blood A 全血稀释 40 倍; B 红细胞稀释 50 倍; C 空白。测量条件: 低灵敏度纵坐标刻度值为 4 A 400 times dilution of whole blood; B 500 times dilution of red cell; C blank. Detected at low sensitivity; ordinate scale "4".

表 1 共振散射光强度与红细胞浓度的关系

Table 1 Relationship between the intensity of resonance scattering light and concentration of red cell

测量波长 Measuring wave length (nm)	线性范围 Linear range ( $\times 10^6$ 个/毫升)	回归方程 Regression equation	线性相 关系数 Linear correlation coefficient	测定下限 Low detecting limit ( $\times 10^6$ 个/毫升)
310	0.46~58.9	$y = 8.07 + 1.49x$	0.984	0.46
470	0.23~117.8	$y = 2.71 + 0.725x$	0.990	0.23
560	0.46~117.8	$y = 4.19 + 0.71x$	0.991	0.46
600	0.92~235.5	$y = -0.88 + 0.232x$	0.998	0.92
600	0.058~0.92	$y = 4.89 + 7.26x$	0.990	0.058

### 2.4 样品分析

考虑到实际样品中很多物质在紫外有吸收, 本文选择 600 nm 共振散射波长按实验方法进行样品分析, 本法结果 (表 2) 与参考方法分析结果一致。

表 2 人红细胞分析结果

Table 2 Determination of human red cell

样品 Sample	本法结果 This method ( $\times 10^{12}$ 个/毫升)				参考方法结果 By the reference ( $\times 10^{12}$ 个/毫升)
	单次测定值 Single measurement		平均值 Average		
1#	3.56	3.55	3.60	3.57	3.54
2#	4.50	4.52	4.68	4.57	4.53
3#	5.37	5.29	5.35	5.34	5.43

(下转第 209 页 Continue on page 209)

- American oyster *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 1981, 12: 1-10.
- 2 Arai K F, Naito F, Fujino K. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull Japan Soc Sci Fish*, 1986, 52 (3): 417-422.
  - 3 Quillet E, Panelay P J. Triploidy induction by thermal shocks in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 1986, 57: 271-279.
  - 4 Stephens L B, Downing S L. Inhibition of the first polar body formation in *Crassostrea gigas* produces tetraploids, not meiotic I triploids. *J Shellfish Res*, 7 (3): 550-551.
  - 5 Yamamoto S, Sugawara Y. Induced triploidy in the mussel, *Mytilus edulis*, by temperature shock. *Aquaculture*, 1988, 72: 21-29.
  - 6 Yamamoto S, Sugawara Y, Nomaru T et al. Induced triploid in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and performance of triploid larvae. *Tohoku J Agr Res*, 1988, 39 (1): 47-59.
  - 7 Guo Ximing, Willam K Hershberger, Kenneth Cooper et al. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster II *Crassostrea gigas* Segregation of chromosomes. *Biol Bull*, 1992, 183: 387-393.
  - 8 Que Huayong, Guo Ximing, Fusui Zhang et al. Chromosome segregation in fertilized eggs from triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), following inhibition of polar body I. *Biol Bull*, 1997, 193: 14-19.
  - 9 Komaru A, Matsuda H, Yamakawa T et al. Chromosome behavior of meiosis-inhibited eggs with cytochalasin B in Japanese pearl oyster. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56: 1419-1422.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 198 页 Continue from page 198)

### 参考文献

- 1 慈云祥, 张春阳, 冯 军. 细胞凋亡分析测试方法的研究进展. *化学进展*, 1998, 10 (4): 344-348.
- 2 姚守拙. 21 世纪的分析化学. 北京: 科学出版社, 1999. 244-245.
- 3 Liu S P, Liu Z F. Studies on the resonant luminescence spectra of rhodamine dyes and their ion-association complexes. *Spectrochimica Acta*, 1995, 51A: 1492-1496.
- 4 Pasternack R F, Collings P J. Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation. *Science*, 1995, 269: 935-939.
- 5 梁 宏, 沈星灿, 蒋治良等. 共振 Rayleigh 散射研究 I 与血清白蛋白的结合平衡. *中国科学 (B 辑)*, 2000, 30 (5): 560-565.
- 6 刘绍璞, 刘忠芳, 蒋治良等.  $[CdL_4]^{2-}$  罗丹明染料体系的共振散射光谱研究. *化学学报*, 2001, 59.
- 7 蒋治良, 杨明娟. 银的光化学共振散射光谱分析. *贵金属*, 2000, 21 (3): 34-39.
- 8 刘绍璞, 刘忠芳. 碲 (IV) 碘化物-结晶紫体系的共振发光和二级散射光谱. *高等学校化学学报*, 1996, 17: 1213-1215.
- 9 蒋治良, 李 芳, 梁 宏. 磷钼杂多酸-罗丹明 S 体系的共振散射光谱研究. *化学学报*, 2000, 58 (8): 1059-1062.
- 10 Liu S P, Zhou G M, Liu Z F. Resonance Rayleigh scattering for the determination of cation surfactants with Eosin Y. *Fresenius J Anal Chem*, 1999, 363: 651-654.
- 11 蒋治良, 李 芳, 梁 宏. 金粒子粒径与共振散射光强度的关系. *高等学校化学学报*, 2000, 21(10): 1488-1492.
- 12 Jiang Zhiliang, Feng Zhongwei, Li Fang et al. Resonance scattering spectroscopic study of gold nanoparticle. *Science in China, Series B* 2001, 44 (2): 175-183.
- 13 蒋治良, 钟福新, 李 芳. 绿色银纳米粒子的共振散射光谱研究. *化学学报*, 2001, 59 (3): 438-453.
- 14 谢济运, 蒋治良. 溃疡病菌的共振散射光谱研究. *物理化学学报*, 2001, 20 (5): 552.
- 15 钟福新, 蒋治良, 梁 宏. 蓝色银纳米粒子的光化学合成及其共振散射光谱研究. *感光科学与光化学*, 2001, 21 (1): 17-23.
- 16 Jiang Zhiliang, Lin Xiaoming. Microwave synthesis of  $TiO_2$  nanoparticles and its resonance scattering properties. *Chemical Journal on Internet*, 2001, 3 (4): 017ne.
- 17 蒋治良. 金纳米粒子的分频共振散射光谱研究. *光子学报*, 2001, 36 (3): 331-335.
- 18 蒋治良, 冯忠伟, 刘庆业等. 金纳米粒子的非线性共振散射及光强度函数研究. *无机化学学报*, 2001, 26 (3): 354-359.

(责任编辑: 蒋汉明)