

一种新型的核酸蛋白检测仪

章蔚娟 阮康成 余德源

(中国科学院上海生物化学研究所)

核酸蛋白检测仪实际上就是液相色谱仪的一种紫外检测装置,具有两个紫外波长光的检测器(260 nm, 280 nm)。可用来测定核酸、蛋白的特征吸收,我们研制的第一代核酸蛋白检测仪^[1]只能通过透过率 T 的图谱来“监测”样品中是否含有核酸或蛋白,但不能进行精确的定量测定。最近,我们设计制作了一种新型的核酸蛋白检测仪,其中设有对数转换器,除了可测透过率 T 外,还可测定光密度 A ,通过计算光密度曲线下各吸收峰的面积可以定量测定样品中各核酸、蛋白组分的含量。仪器设有档光密度量程,0—2 A、0—1 A、0—0.5 A、0—0.1 A、0—0.05 A。利用最灵敏的一档可以准确读至0.0005 A,适用于微量组分的定量分析。

一、仪器原理 参见文献 [1]

二、仪器的主要组成部分

仪器主要由电源和检测器两部分组成。低

压电源^[2]输出 ± 15 V 和 +30 V 电压。给光电倍增管和灯源供电的高压电源采用晶体管直流变换器方式,但仪器中在高压电源的电路中加入了一高压负反馈装置,提高了电源的稳定性,使稳定度达 10^{-5} ,内阻小于 100Ω ,电源漂移小于 $10^{-4}/10$ 小时,使整个仪器的稳定性比第一代核酸蛋白检测仪有了明显的改进。在对放大器和对数转换器严格调试的情况下,仪器经 1 小时预热后,可以达到八小时基线漂移小于 0.1 mV (用 10 mV 量程的记录仪)。

检测器主要由灯源、滤色器、样品池、光电倍增管、放大器和对数转换器组成。本仪器的样品池除直管式外^[1](光程 3 mm、容量 200 μ l),还设计了横向毛细管式的样品池(光程 10 mm、容量 30 μ l),并配以聚光透镜,增强光能量,这样仪器就可以用于高压液相色谱仪作紫外检测器用。其它方面除机械结构有所改进外,与原来仪器大致相同。下面重点介绍一下放大器和对数转换器的原理。

放大器的电原理如图 1,其主要由运算放大器 F007C 组成。放大器的输入阻抗为 100

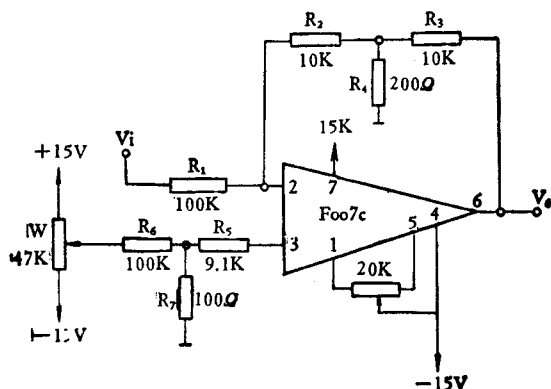


图 1 前置放大器

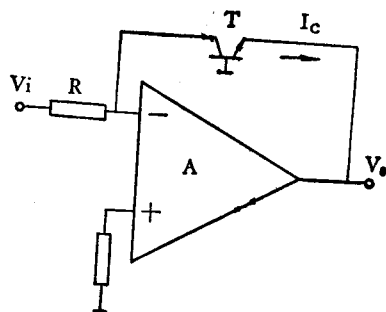


图 2

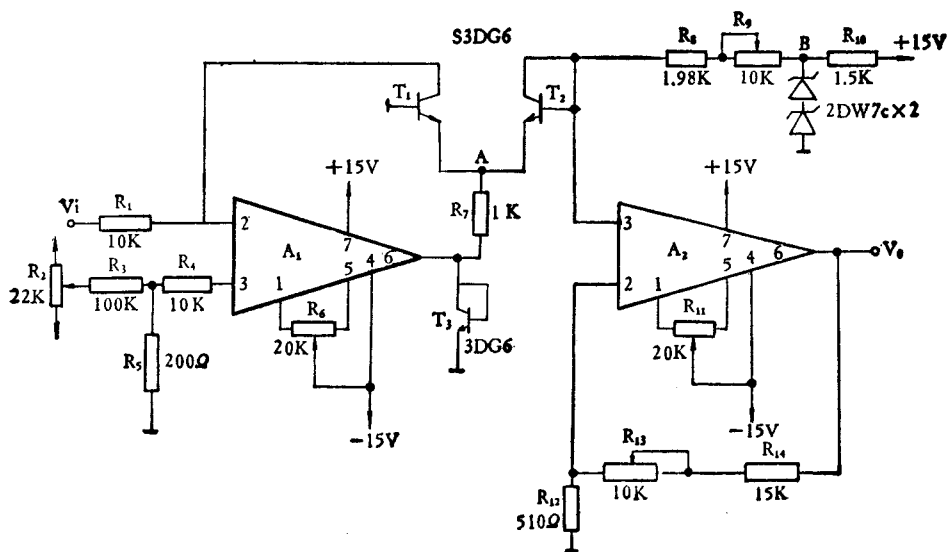


图 3

$k\Omega$, 电压增益为 20 分贝。在这里我们没有采用一般的反馈电阻的方法, 而是采用了一种 T 型电阻网络^[2], 其由电阻 R_2 、 R_3 、 R_4 组成, 阻值分别为 $10\text{ k}\Omega$ 、 $10\text{ k}\Omega$ 、 $100\text{ }\Omega$, 但其短路传输电阻可高达 $1.02\text{ M}\Omega$, 这样可以大大减少输入失调电压、失调电流对漂移的影响, 改善运算放大器的线性、保证精度。 R_5 、 R_6 、 R_7 及电位器 W 组成运算放大器外补偿调零电路, 可以用来补偿光电倍增管的暗电流, 确保在无光照射光电倍增管时放大器输出为零。放大器的输出电压送到记录仪, 相应的电压值就是透过率 T 。

对数转换器 在晶体管中, $V_{BE} = \frac{KT}{q} \ln \frac{I_c}{I_s}$ 。式中 K ——波尔兹曼常数, q ——电子电量, T ——绝对温度, I_c ——集电极电流, I_s ——发射结反向饱和电流。因此若将晶体管 T 如图 2 接入电路, 不难得知:

$$V_0 = -V_{BE} = -\frac{KT}{q} \ln \frac{V_i}{R_1 I_s}$$

即远放大器的输出电压和输入电压成对数关系, 故图 2 可认为是一对数转换器。以上述原理为基础, 可得到一个实用的对数转换器^[3], 见图 3。由图 3 可知: A 点对地电压 V_A 和晶体管 T_1 的发射结电压 V_{BE1} 相等, 故 $V_A = -\frac{KT}{q}$

$\ln \frac{V_i}{R_1 I_{s1}}$ 。 T_1 和 T_2 是一对性能很对称的晶体管, 故可认为它们的发射结反向饱和电流 I_{s1} 、 I_{s2} 大小相等, 所以当两管的集电极电流不相等时, 它们各自的发射结电压是不相等的, 两者之差为: $\Delta V_{BE} = V_{BE2} - V_{BE1} = -\frac{KT}{q} \ln \frac{I_{c2}}{I_{c1}}$ 。由于 $I_{c1} = \frac{V_i}{R_1}$ 、 $I_{c2} = \frac{V_B}{R}$ ($V_B \approx 12\text{ V}$, 为图中 B 点的电压, $R = R_8 + R_9$)。 I_{c2} 的值近似等于 $\frac{V_B}{R}$ 是因为 T_2 和 T_1 两者的基极电位差和 V_B 相比可以忽略不计, T_2 的基极电压亦可认为等于零的原故。故 ΔV_{BE} 可表示为: $\Delta V_{BE} = -\frac{KT}{q} \ln \frac{V_i}{R_1} \cdot \frac{R}{V_B}$ 。因 T_1 的基极是接地的, 故 ΔV_{BE} 可认为是运算放大器 A_2 的同相输入信号, 这样, A_2 的输出电压 V_0 为:

$$V_0 = -\left(1 + \frac{R_{13} + R_{14}}{R_{12}}\right) \frac{KT}{q} \ln \frac{V_i}{R_1} \cdot \frac{R}{V_B}$$

即 A_2 将对数信号 $-\frac{KT}{q} \ln \frac{V_i}{R_1} \cdot \frac{R}{V_B}$ 放大了 $\left(1 + \frac{R_{13} + R_{14}}{R_{12}}\right)$ 倍。所以更确切地讲图 3 是一对数转换放大器。

晶体管 T_3 的作用是保护晶体管 T_1 , 即当有负电压信号输入到 A_1 时, A_1 的输出即为正,

从而使 T_1 的发射结处在反向偏置, 而使 T_1 损坏。 T_3 的设置, 就可将 A_1 输出的正电压箝制在 0.7 V 左右, 从而保证 T_1 无损坏之虞。

调零电位器 R_2 可以改善小信号输入时的输出线性, 因为在信号小时, 运算放大器的输入失调电压、失调电流的影响相对讲显得较大, 从而使输出偏离线性。 调节 R_2 可补偿失调电压、失调电流, 减小它们的影响, 使对数转换的线性较好。

对数转换器将透过率 T 转换成光密度 A 的原理如下: 若用 T_{100} 表示透过率为 100% 时放大器的输出电压 (亦是对数转换器的输入电压) 并用 V_{01} 表示此时对数转换器的输出电压, 用 V_T 表示某一透过率时对数转换器的输入电压 (即是放大器的输出电压), 用 V_{02} 表示此时对数转换器的输出电压, 从透射率的意义可知, 此时透过率 T 为: $T = \frac{V_T}{V_{T100}} \times 100\%$ 。 据前述

对数转换器的输出电压 $V_0 = - \left(1 + \frac{R_{13} + R_{14}}{R_{12}} \right) \cdot \frac{KT}{q} \ln \frac{R}{V_B} \cdot \frac{V_i}{R_1}$ 可知: $V_{02} - V_{01} = \left(1 + \frac{R_{13} + R_{14}}{R_{12}} \right) \cdot \frac{KT}{q} \ln \frac{V_{T100}}{V_T}$, 若令 $M = \frac{KT}{q} \left(1 + \frac{R_{13} + R_{14}}{R_{12}} \right) / \lg e$ 则 $V_{02} - V_{01} = M \lg \frac{V_{T100}}{V_T}$, 用 $T = \frac{V_T}{V_{T100}} \times 100\%$ 代入该式, 则: $V_{02} - V_{01} = M \lg \frac{1}{T}$, 光密度 A 的定义即是: $A = \lg \frac{1}{T}$, 故: $V_{02} -$

$V_{01} = M \cdot A$ 。 选择合适的 R, R_1 使 $V_{01} = 0$ (使 $\frac{V_{T100}}{R_1} \cdot \frac{R}{V_B} = 1$ 即可) 则 $V_{02} - V_{01} = V_{02} = M A$ 。 即对数转换器的输出电压正比于光密度 A , 这样就完成了 T 到 A 的转换。

三、使用结果

我们曾用本仪器作了多种样品的测试, 下面是部分测试结果。图 4 是测定 CPV-RNA 复制酶活力的图谱。在 CPV-ds RNA、4 种核苷酸、CPV-复制酶及 ATP, GTP 体系中加入适量的 RNA 复制酶的抑制剂——磷酸乙酸、从生

成的 RNA 量来标志复制酶的活力水平。图中 ①②两峰是二次实验测得的。通过计算吸收峰面积求得对应于峰①、②的 RNA 含量为 0.550 A 和 1.47 A, 用 751 分光光度计测试结果为 0.551 A 和 1.53 A, 误差小于 5%, 说明该仪器是完全可用于定量测定核酸、蛋白的含量。

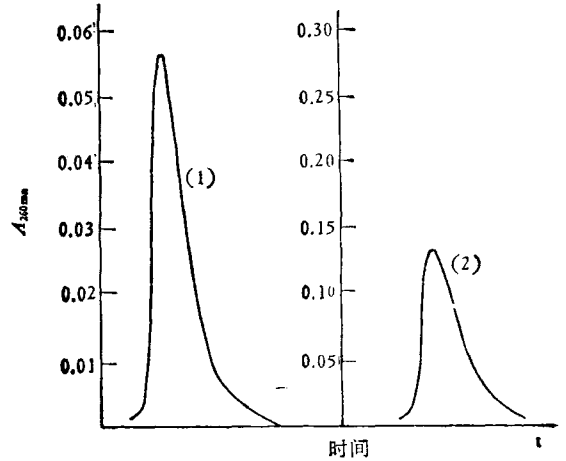


图 4

纸速: 2cm/分 流速 0.36ml/分

表 1

结果 \ 核苷酸	C	A	U	G
实际含量	0.288	0.32	0.28	0.31
测得含量	0.237	0.33	0.175	0.31

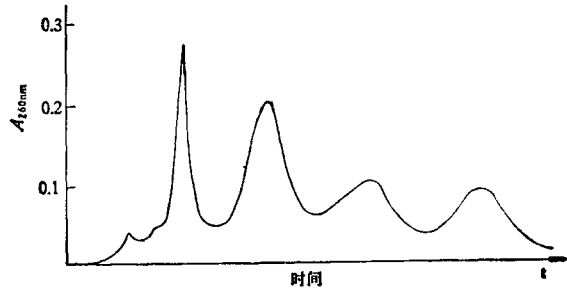


图 5

纸速: 3 cm/小时, 流速: 0.21 ml/分

图 5 是利用该仪器灵敏度高的特点, 用柱 (下转第 40 页)

细菌的细胞膜^[7], 因为膜上有与 DNA 修补有关的酶, 受进攻之后细胞修补 DNA 的能力被破坏^[7,11], 阻碍细胞的恢复。

我们的结果表明, 在 KI 的敏化作用中人类红细胞的质膜会受到额外损伤(图 2)。人类肝癌细胞经 KI 敏化、质膜被额外损伤后, 是否其修补 DNA 断链的能力受到影响:

1. 能引起质膜额外损伤的 KI 浓度并不抑制肝癌细胞修补 DNA 断链的能力。我们的实验结果中, 当 KI 浓度低于 8mM, 修补能力不受抑制; 而这种浓度在红细胞实验中是会引起质膜额外损伤的。据文献报道, 含碘化合物浓度在 0.1—10mM 时, 都会对细菌的辐射杀伤引起显著的敏化作用^[5,6,9]。所以发生肝癌细胞质膜额外损伤无疑是存在的, 但没有见到 DNA 断链修补能力受抑; 如果质膜在哺乳类细胞 DNA 断链修补中起重要作用, 就不会不表现修补受抑的现象。

2. 我们在 10,000rad 照射组中见到, 当 KI 浓度达到 16mM 以上时, 肝癌开始表现修补 DNA 能力部份受抑的趋势(表 1), 这可解释为: ① KI 浓度增高, 导致质膜损伤加重; ② 由于照射剂量增大(照射时间延长)和 KI 浓度增高, 在照射过程中 KI 进入细胞而引起细胞内部结构额外损伤的可能性增大; ③ KI 浓度过高, 产生高渗。有人报道, 在照前^[12]或照后^[13]用低渗或高渗溶液处理 20 分钟, 会妨碍哺乳类细胞的恢复, 致使存活率下降。本实验中的 DNA 修补能力部份受抑, 可能是细胞存活率下降的一个原因。在我们的实验全过程中, 细胞与 KI 接触的时间远远超过 20 分钟, 对于含 KI 浓度较高的样品, 高渗作用是很难避免的。

(上接第 72 页)

层析方法分离总量为 1 A 左右的四个核苷酸的图谱。(过去分离四核苷酸时一般要求总量应大于 10 A)。表 1 是分析样品中四核苷酸的实际含量和用本仪器测试的结果对照。其中 C、U 组分结果偏低是柱回收率低所致。(在 10 A 以上四核苷酸分离中亦有此现象), 结果还是很令

3. 关于 KI 存在下受照的某些组修补效果略高于没有 KI 存在的对照组的问题, 目前无法作出解释。

总之本研究的总结果表明, 人类肝癌细胞质膜受到敏化剂 KI 的额外损伤后, 其 DNA 断链重接修补的能力没有被消除; KI 浓度不超过 8mM 时, 修补能力没有受到任何影响。这似乎表明, 这种真核细胞的质膜对于 DNA 的重接修补是无关紧要的。之所以与大肠杆菌^[11]不同, 可能是由于真核细胞 DNA 及其质膜之间, 在结构及生理上的关系不如细菌的密切。还需要进一步用其他真核细胞探讨这个问题。

日本大阪大学医学部近藤宗平教授曾寄赠荧光测定用的药品二氨基苯甲酸等; 实验中受到郑德存和贾先礼等同志的协助; 谨此一并致谢!

参 考 文 献

- [1] Myers, D. K.: *Int. J. Rad. Biol.*, 19, 293, 1971.
- [2] 陈去恶, 甘大清: 《实验生物学报》, 1979 年, 第 12 卷, 257 页。
- [3] Parodi, S. et al.: *Mutation Res.*, 54, 39, 1978.
- [4] Swenberg, J. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72, 732, 1976.
- [5] Dean, C. J. et al.: *Nature*, 196, 1324, 1962.
- [6] Dean, C. J.: *Brit. J. Radiol.*, 35, 73, 1962.
- [7] Shenoy, M. A. et al.: *Science*, 160, 999, 1968.
- [8] Alexander, P.: *The initial effects of ionizing radiation on cells* (R. J. C. Harris ed.), Academic Press, p. 9, 1961.
- [9] Kada, T. et al.: *Int. J. Rad. Biol.*, 17, 407, 1970.
- [10] Mullenger, L. et al.: *Nature*, 216, 372, 1967.
- [11] Alexander, P.: *Radiation damage and sulphhydryl Compounds*, Proc. of a panel organized by IAEA, Vienna, Oct. 63, 1968.
- [12] Raaphorst, G. P. et al.: *Int. J. Rad. Biol.*, 29, 433, 1976.
- [13] Utsumi, M. et al.: *Rad. Res.*, 77, 346, 1979.

[本文于 1981 年 2 月 18 日收到]

人满意的。

参 考 文 献

- [1] 章蔚娟等: 《生物化学和生物物理进展》1980 年第四期, 第 74 页。
- [2] 李清泉等: 集成运算放大器原理和应用。第一版, 科学出版社, 北京, 1980 年。
- [3] George Niel: *Electron Design* 21, 4, 1973.