

氧瓶燃烧法制备 ^3H 生物样品

中国科学院上海生物化学研究所五室代谢组

在液闪技术中,样品的制备是很关键的一步。根据实验材料的性质,可供选择的方法很多。由于液闪的测量是在非极性溶剂中进行的,而要测定的生物样品又大多是亲水性物质,这就构成了液闪测量技术中的一对矛盾。为解决这一矛盾而提出的各种样品制备方法不外乎两大类型,一类是将样品分散悬浮在闪烁液中(悬浮法、乳化法),或沉淀吸附在滤纸片、玻璃纤维膜制成的盘片或其他固体支持物上(纸片法)的非均相测量;另一类是加入助溶剂或长脂肪链季胺类组织溶解剂,使样品与闪烁液互溶的均相测量(消化法、燃烧法等)^[1]。这两类方法都有利弊,研究者可根据自己实验室的条件和实验要求加以权衡选择。

燃烧法制备样品,是属于均相测量的一种。这种方法是把 ^3H , ^{14}C , ^{35}S 标记的有机物及生物组织彻底氧化为相应的氧化物,再用各种方法吸收在闪烁液中进行测量。对 ^3H 来说,只要用冷阱收集燃烧生成的氘水便可。 ^{14}C 和 ^{35}S 分别生成 $^{14}\text{CO}_2$ 和 $^{35}\text{SO}_2$ 气体,它们可用苯乙胺、乙醇胺等有机碱吸收,再加入闪烁液测量。由此可见,燃烧法的主要优点是把所有的样品,均能以同一种的化学形式测量,这就允许把不同来源的样品进行直接比较,例如在动植物的示踪实验中需要测定不同组织中的放射性分布,只要不考虑组织中放射性代谢物的形式,就可用燃烧法来制备测定的样品。燃烧法的回收率和测量效率也是比较高的。所以凡要测定任何类型的样品,只要这类样品不完全溶解在闪烁液的溶剂中,那么干脆就把它烧掉,这样,所有与其他样品制备方法(悬浮法,乳化法,融解法等)有关的一些困难(如颜色淬灭,化学发光等)都可克服。

用氧瓶燃烧法制备 ^3H 和 ^{14}C 样品是在六十年代开始的^[2],随后围绕着为了测定低放射性样品、加大样品的用量、防止爆炸以及加快处理样品速度等问题,进行了各种改进设计^[3-6],都取得了满意的结果。我所自从开展 ^3H 标记化合物的合成和动物示踪工作以来,在 Kelly 和 Ober 等人所描述的方法基础上^[2,4],结合我们的条件,设计了一套用于测定 ^3H 生物样品的氧瓶燃烧装置,经过二年来使用,测定了上千个样品,结果是满意的。由于装置简单、操作方便、结果可靠,适合目前我国一般同位素实验室使用,现特将该方法介绍于后,并结合我们的体会,对某些操作细节,尽量作仔细的描述。

一、氧瓶燃烧装置及器材试剂

1. 燃烧瓶及燃烧匙

一升三角烧瓶(GG-17 或九五硬质玻璃料制成)若干只,配上合适的橡皮塞。橡皮塞在使用前用氢氧化钠溶液煮洗。取直径约 1.6 毫米的镍铬电热丝弯制成燃烧匙,固定并悬挂在橡皮塞上,放入三角烧瓶内(图1)。燃烧匙的高度不宜太低,应离瓶底约 2—3 公分为宜。如太低,样品燃烧时有黑烟凝结瓶底,造成不完全燃烧;如太高,瓶的空间小,样品引燃后会造成瞬时局部氧浓度过低,亦会产生样品不完全燃烧的现象,且有可能烧着橡皮塞。另外在绕制燃烧匙时,螺纹不宜太密,因为太密的螺纹也要产生样品的燃烧不完全。

2. 聚光点燃装置

最早是用电极的方法引燃样品,即燃烧匙实际上是由二电极组成^[2],近来发展有红外线聚焦点燃的方法^[4],简化了燃烧匙的结构,操作也较安全。我们用 750 瓦幻灯放映灯泡作光

源,用二块凸透镜聚焦,装置如图 2 所示。

3. 引燃用黑纸芯

为了尽量减少样品燃烧时辅助物的重量,除了选择合适的胶囊外,引燃用的黑纸芯用轻质薄纸做成。我们用打字蜡纸的衬纸涂上墨汁,干燥后剪成 5 毫米×15 毫米左右的小条备用。

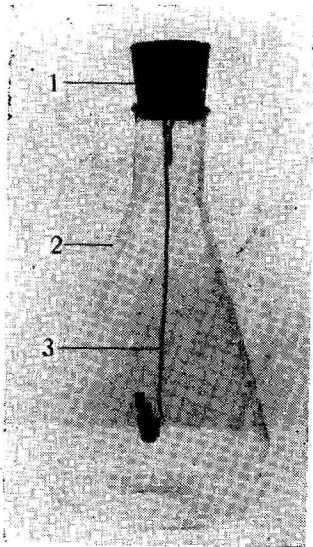


图 1 烧瓶燃烧装置

1——橡皮塞; 2——1 升三角烧瓶; 3——燃烧匙

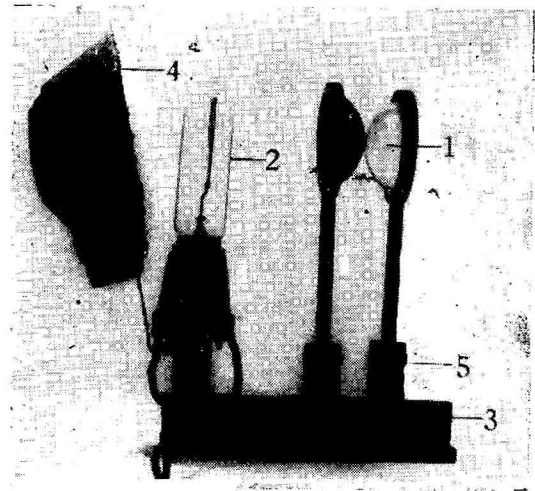


图 2 聚光点燃装置

1——凸透镜; 2——幻灯放映灯泡; 3——支座;
4——反光灯罩; 5——透镜支架

4. 样品干燥板

用 10 毫米厚的长方形铝板(160 毫米×100 毫米)做成。在铝板上钻有深 8 毫米、直径 8 毫米的小孔。将盛有剪碎的湿组织或组织匀浆的

胶囊放在每一个小孔内,在 80℃ 的烘箱或电热板上干燥二小时,放在干燥器中待测(图 3)。

5. 氧气钢瓶一只,装上具有流速装置的氧气表供氧用。

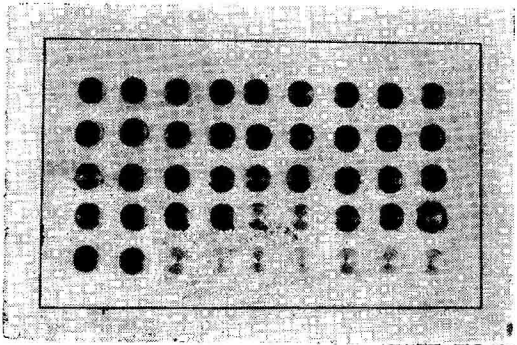


图 3 样品干燥板

6. 医药用 0 号空心胶囊,盛样品用,为了防止溶解,可先将胶囊放在甲醛蒸气中固定。

分析纯无水乙醇,洗涤燃烧生成的氚水用。

闪烁液由每升二甲苯含 PPO 4 克、POPOP 0.4 克组成。

7. 搪瓷盘及洗照片用塑料盘若干只,盛干冰-丙酮冷却剂用。

二、操作方法

1. 操作步骤

由氧气钢瓶以每分钟10升的流速向三角烧瓶中通入氧气约一分钟,与此同时,把经干燥盛有样品的胶囊放入燃烧匙中,在胶囊内插入一黑纸芯,约有一米的纸芯露在胶囊外面。通氧结束,迅速把燃烧匙放入烧瓶内盖紧,在通风柜内,有机玻璃屏后面,用聚光点燃装置引燃样品。即开亮灯泡,在透镜前用右手拇指与中指捏住瓶颈,食指轻压瓶塞,将三角烧瓶稍稍倾斜,使燃烧匙中胶囊上的黑纸芯落入聚光透镜的焦点上,迅见黑纸冒起白烟,瞬即燃烧,发出白炽光焰,待燃烧结束,燃烧匙被烧得通红,立即将烧瓶放在盛有干冰-丙酮的搪瓷盘内,使氚水冷凝冻结在瓶底,15 分钟后自干冰冷却剂中取出,与室温平衡后(约 10 分钟),打开橡皮塞,取出燃烧匙,准确加入 6 毫升无水乙醇,再盖紧瓶塞,倾斜烧瓶,轻轻转动,使无水乙醇充分淋

洗瓶壁,然后吸出 4 毫升乙醇洗涤液,加到盛有 12 毫升闪烁液的计数瓶内,摇匀,用 NE 8312 液闪谱仪计数,外标源道比法校正。

2. 器皿的清洗

将三角烧瓶用自来水冲洗数次后,再用肥皂粉和毛刷充分洗刷瓶壁,用自来水冲净后,用蒸气冲洗 2—3 分钟,这样可保证消除“记忆效应”。蒸气冲洗装置系用二升磨口圆底烧瓶配上一蒸气喷头做成(图 4)。冲洗时将三角烧瓶复在喷头上便可。

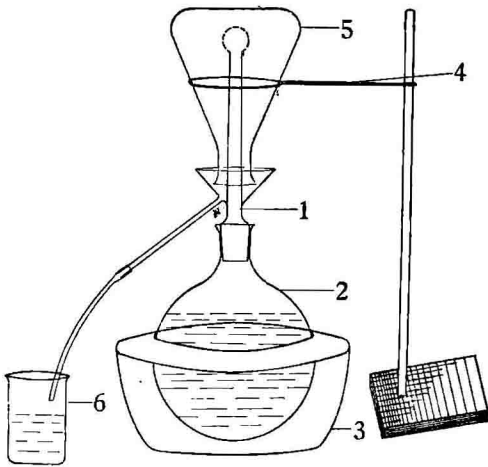


图 4 蒸汽冲洗装置

1——蒸气喷头; 2——圆底烧瓶; 3——电热套;
4——铁支架; 5——三角烧瓶; 6——烧杯

燃烧匙用稀盐酸浸泡一、二小时,用自来水冲洗,烘干。橡皮塞用肥皂粉洗净,干燥备用。

三、实验结果及讨论

建立一个测定方法,很重要的指标就是这方法的重演性(精确度)和被测样品的回收率(准确度)。在同位素示踪实验中,若要确定不同组织中的放射性回收,只有通过外加标记物来实现。为要检验本方法的回收情况,我们用 ^3H 标记的脱氧胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR)作了外加回收实验,外加的方法是用不同量的标记物加在小滤纸片上干燥后燃烧。另外将标记物直接加在闪烁瓶中测量,作为外加标记物的绝对量,将通过燃烧步骤测得的数值和它比较,求得放射性回收百分率。表 1 是 ^3H -TdR 在滤纸片

上的回收率,每一标记物用量做二个复样。从回收情况来看,除加 1 微升的二个样品偏高外,其余从 2 微升开始至 5 微升的样品回收是好的。关于 1 微升样品回收偏高的问题,可能是用微量注射器加样时的误差所造成。

表 1 ^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷加在滤纸上的回收率

	^3H -TdR 加入量 (微升)	每分钟 脉冲数 (cpm)	测量效 率(E) (%)	每分钟 衰变数* (dpm)	回收率 (%)
燃 烧 法	1	10346	23.5	65590	126.15
	1	10395	23.5	65904	126.73
	2	18806	24.5	114709	110.31
	2	17040	24.0	106062	102.00
	3	26768	24.0	166861	106.98
	3	24014	22.5	159625	102.34
	4	35117	23.5	223039	107.24
	4	32809	23.5	208971	100.48
	5	40564	22.5	269122	103.52
	5	36888	22.0	251031	96.56
直接加样	2	27495	26.5	103566	
	5	70521	27.0	261003	

* 燃烧法每分钟衰变数的算法:

$$\text{dpm} = \frac{\text{cpm}(\text{样品}) - \text{cpm}(\text{本底})}{E} \times 1.5$$

表 2 ^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷在不同组织中的回收率

组织名称	组织量 (毫克)	每分钟 脉冲数 (cpm)	测量效 率(E) (%)	每分钟 衰变数* (dpm)*	回收率 (%)
全血	70	16571	24.5	101026	97.15
全血	57	16032	23.5	102331	98.40
肝脏	55	16931	26.0	97275	93.54
肝脏	57	16686	25.5	97741	93.99
脾脏	50	16695	27.0	92361	88.82
脾脏	51	16917	25.5	99099	95.29
肾脏	56	16784	25.5	98317	94.54
肾脏	50	16797	25.0	100362	96.50
睾丸	54	16209	25.0	96834	93.11
睾丸	53	16422	24.5	100114	96.27
脂肪	80	13987	21.5	97095	93.37
脂肪	81	14680	23.0	95281	91.62

* dpm 计算方法同表 1。每一组织样品加入 2 微升 ^3H -TdR, 即 10^5 dpm (103566 dpm)

为了模拟 ^3H 生物样品的测定,我们又将 2 微升的 ^3H -TdR 加到不同量的不同组织中测定放射性的回收,表 2 是各种组织外加标记物的回收结果,从结果看,不论在回收百分率方面

或二个复样的重演性方面都是满意的。有关重演性问题,我们还做了体内实验。即将 ^3H -TdR 注射给小白鼠,经一定时间后取不同量的各组织测定,然后再换算成单位湿组织重的放射性(表 3),二个复样的数值是比较接近的。

表 3 ^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷在小白鼠体内分布

组织名称	组织量 (毫克)	每分钟 脉冲数 (cpm)	测量效 率(E) (%)	每分钟 衰变数 (dpm)*	单位组织 重衰变数 (dpm/ mg)
肝脏	50	36571	24.5	223903	4478
肝脏	65	37662	24.5	230583	3547
脾脏	40	6244	23.5	39855	996
脾脏	30	5464	23.5	34876	1162
肾脏	45	19800	24.0	123750	2750
肾脏	65	29037	25.0	174222	2680
脂肪	60	1888	23.0	12312	205
脂肪	60	1848	23.0	12052	200
睾丸	60	7571	24.0	47.317	788
睾丸	55	6169	24.0	38556	701
骨骼	55	2035	25.0	12210	222
骨骼	40	1397	23.5	8916	223

小白鼠腹腔注射 ^3H -TdR (每克体重 1 微居里) 40 分钟后杀死取各组织

* dpm 算法同表 1

^3H -TdR 比度: 34 居里/毫克分子

氧瓶燃烧法,虽然文献中有着各种改良装置,但大多结构比较复杂,操作繁琐,我们采用 1 升三角烧瓶作燃烧瓶,普通的镍铬电热丝作燃烧匙,取得了比较满意的结果。这种材料易得、清洗方便的装置,为建立这一方法创造了条件。但这方法需要大量干冰-丙酮冷却剂,这不仅增加了制备样品的费用,而且对不产干冰的地区来说,使用本方法就受到了限制。样品燃烧后,燃烧生成的氘水先行冷冻,而后加入无

水乙醇淋洗,而不是像 Ober 等人所建议的那样,把吸收燃烧产物的试剂事先放在燃烧瓶内,再引燃样品。这就消除了样品燃烧时火星溅入吸收剂而引起爆炸的危险,并且由于吸收剂是在烧后而不是烧前加入的,这就减少了氧在吸收剂中的溶解量,也就是减少了氧的淬灭作用。因此通常我们用这方法的测量效率均在百分之二十以上(见表 1, 2, 3)。可是吸收剂乙醇本身有一定的淬灭作用,若考虑改用混有一定量助溶剂(乙二醇甲醚)或乳化剂(Tritonx-100)的闪烁液直接淋洗烧瓶,或许能进一步提高测量效率,也省略了一步操作程序,这有待于以后改进。

目前的装置只能用于氘的测定,但稍加改进也可用于 ^{14}C 样品的制备。在制备像脂肪一类样品时,为了防止样品熔融从燃烧匙中漏出,我们用不锈钢薄片冲一凹形小皿垫在燃烧匙内,解决了这一困难。对于挥发性的 ^3H 样品,在样品干燥过程中可能会有损失,在使用本方法时必须注意。

参 考 文 献

[1] L. W. Price.: *Lab. Pract.*, **22**, 181, 1973.
[2] R. G. Kelly et al.: *Anal. Biochem.*, **2**, 267, 1961.
[3] H. E. Dobbs: *Anal. Chem.*, **35**, 783, 1963.
[4] R. E. Ober et al.: *Int. J. Appl. Rad. Isotopes*, **20**, 703, 1969.
[5] J. D. Lowis: *ibid.*, **23**, 39, 1972.
[6] J. I. Peterson et al.: *Anal. Biochem.*, **31**, 189, 1969.

[本文于 1978 年 3 月 27 日收到]

名词解释

杂交技术(分子杂交) Hybridisation technique
(Molecular hybridisation)

鉴定来源不同的两条多核苷酸链上碱基顺序同一性的一种检验手段。两条具有互补的碱基顺序的 DNA 链,在溶液中一起冷却时,将形成一个双链结构,互补

的一条 DNA 链和一条 RNA 链也同样能形成双链结构(形成 DNA-RNA 杂交体)。DNA 的“熔解”,即变性或使其双链螺旋解开形成单链,可以在溶液中将温度升高到超过 T_m (熔解温度)时发生;“退火”,即重组,则在缓慢冷却时发生。这样的杂交实验曾用肿瘤病毒多核苷酸和来源于未经感染的细胞的 DNA 进行,以探讨细胞 DNA 是否有可能为病毒基因译码(形成稳定的杂交体被认为表明有译码的可能)。