

微孔滤膜及其在同位素中的应用(上)

中国科学院上海生物化学研究所四室

微孔滤膜过滤技术为我们在研究各种生命现象中,提供了一种简单、方便,但又是很重要的方法。它不但可以根据孔径大小应用于收集各种沉淀、细胞和细胞器,而且根据微孔滤膜能够结合蛋白质和结合核酸的性质,建立了很多结合测定法。

微孔滤膜过滤技术有几个显著的优点:
(1)简单——只需微孔滤膜和一般的吸滤装置,不要任何特殊仪器。(2)方便和重复性好——样品在同一片均匀的微孔滤膜表面进行分离、沉淀、洗涤、干燥和测量放射性,这样不存在因样品的转移而引起损失,从而增加了重复性。(3)快速——收集有样品的微孔滤膜可以很快地充分洗涤。而用经典的离心法收集沉淀和洗涤,不但操作繁琐而且花费很多时间。特别应用多歧管的过滤装置,可以同时进行几十个样品过滤,一天之中可能完成上百个样品的微量分析。另一方面,单个样品的收集和洗涤,能在几秒钟内完成,适用于研究小分子的快速转移动力学。

由不同材料制成的不同孔径的微孔滤膜几乎适用于任何一种类型的生化和分子生物学实验。这里就它们在液体闪烁测定中的应用作一些介绍。

微孔滤膜

微孔滤膜可以看作是一种特殊的收集器。所有的滤膜根据它们的组成、性质和滞留颗粒的机理可以分成两大类——深层型滤膜和网状型滤膜。在考虑应用微孔滤膜过滤技术之前,对各种滤膜有一些了解是必要的。

深层型滤膜

深层型滤膜通常由一些超短纤维或颗粒物

质压制或粘合形成薄膜。滤膜内部是许多错综弯曲的通道使液体可以流过,通道的大小是无规则的、可以变化的。根据纤维的粗细和紧密程度,所有深层型滤膜可以制成厚薄不同的粗松型和细紧型。普通滤纸和玻璃微粒纤维滤膜属于深层型滤膜。

深层型滤膜处处可以吸附和滞留颗粒物质,因此它们的颗粒收集能力是很强的。然而深层型滤膜有一个固有的局限性,即因为纤维内部联结的无规则性和缠绕无方向性,使深层型滤膜没有一个绝对的孔径大小(封二图3)。

网状型滤膜

网状型滤膜在物理性质和滞留颗粒的方法上和深层型滤膜完全不同。网状型滤膜是高度均匀的,具有规则的空间孔穴(封二图4)。它具有很明确的颗粒滞留界限。如果颗粒的最小直径超过网状滤膜的孔径,则此颗粒不能通过滤膜,而全部停留在滤膜表面上,因此它的滞留级别在理论上是绝对的。

各类型号的微孔滤膜孔径范围从0.025—14.0微米。构成微孔滤膜的材料也很广泛,以Millipore公司产品为例,有纤维素的混合酯(MF-Millipore),醋酸纤维素(Celotat[®]),聚四氟乙烯(Fluoropore[®]),聚酰胺(Duralon[®]),聚氯乙烯(Polyvic[®]),四氟乙烯(Mitex),其他还有用聚酰胺增强了的MF-Millipore (Microweb[®]),抗溶剂的微孔滤膜(Solvinert)。根据实验需要的性能,总可以选择到一种合适的微孔滤膜(表1)。其他生产厂商还有Gelman, Schleicher & Schull, Oxoid 和 Sarlorius, Nuclepore 等,后者仅生产特殊的聚碳酸酯膜,系用核放射冲击制备。在生化实验中,应用较广泛的滤膜有:

1. MF-型微孔滤膜——由纤维素混合酶

(主要是硝酸纤维素)组成,适用于把生物高分子结合到滤膜上去的测定工作。MF-型有十二种不同孔径的滤膜。例如, HAWP 025 代表 0.45 微米的白色平片,滤膜直径是 25 毫米。而 HABG 047 则表示 0.45 微米孔径的黑色编网格片,滤膜直径 47 毫米。滤膜直径有 13, 24, 25, 47, 90, 142, 293 毫米七种规格,在液闪工作中最常用的是 24 或 25 毫米的滤膜,过滤面积约 2.8 平方厘米。

我国也有不少单位试制微孔滤膜,上海医学院产品在用于 cAMP 的测定中发现比西德 Schleicher 和 Schuell 厂同类产品优越,与 Millipore-HAMK 产品相近。

2. C-型微孔滤膜——完全由醋酸纤维素组成。适用于样品需要溶解后进行液闪测定的工作。也可用在希望样品不被滤膜结合的实验中。

3. 玻璃纤维深层型滤膜——由玻璃微粒、纤维和丙烯酸粘合剂制成的 AP 20 (高密度,厚度约 0.3 毫米)和 AP 25 (低密度,厚度约 0.9 毫米),它们比网状型微孔滤膜的滞留效率低,但有较高的滞留容量。此外还有玻璃纤维与石棉混合制成的滤膜。我国一些造纸厂也有类似产品。Malt 和 Miller 曾报道,用玻璃纤维滤膜(Whatman 厂的 GF/A 型)在液闪测定中计数效率比 Millipore HA 高。我所工作也有类似结果。近年来在核酸工作中玻璃纤维滤膜渐渐取代了 MF-型滤膜,除了效率因素外,它的过滤速度比 MF-型 HA 快得多,可能也是一个重要因素。

4. F-型微孔滤膜——由聚四氟乙烯(PTFE)组成。适用于抗溶剂的实验中,因为聚四氟乙烯不受强碱、强酸和有机溶剂的影响。

微孔滤膜的一般性质

1. 孔径的均一性——微孔滤膜的孔径大小是很均一的。例如平均孔径 0.45 微米的滤膜,其孔径变化范围要求在 0.45 ± 0.02 微米(图 1)。

2. 高度多孔性——每平方厘米微孔滤膜表面上有几百万个毛细孔,它们约占总体积的 80%。

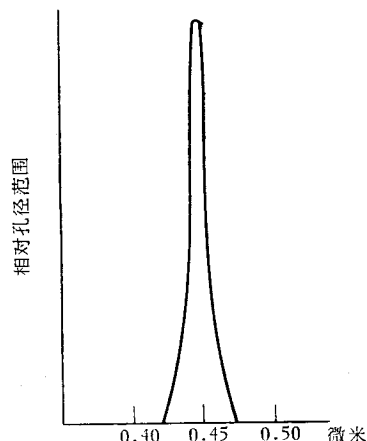


图 1 0.45 微米微孔滤膜的孔径分布曲线

3. 高流速——高度多孔性和孔径的构型,使得微孔滤膜的流速比具有同样滞留颗粒能力的滤纸片至少大 40 倍。

4. 厚度——根据型号不同,厚度范围平均值一般为 125—150 微米,厚度变化控制在 ± 10 微米。微孔滤膜的重量约 5 毫克/平方厘米。

5. 可溶性物质——微孔滤膜制备时含有润湿剂和甘油,约占滤膜重量的 3%,这些物质都可以在使用前洗涤滤膜而除去。

6. 残留液体——直径 25 毫米的微孔滤膜在它的内部能残留约 0.05 毫升溶液。真空吸附也不能除去这些液体。微孔滤膜的干燥需在 100℃ 下加热 60 分钟。

7. 化学性质和热稳定性——化学禁忌见表 1。在氧气存在、温度高于 125℃ 的条件下,微孔滤膜会自身分解。无氧时可耐受到 200℃。

8. 残余灰分——于 800℃ 下灼烧 25 米的纤维素滤膜,产生的灰分应少于它原始重量的 0.5%。

9. 阻塞——一般讲,较大孔径的微孔滤膜有较快的流速。但微孔滤膜很易被和它孔径差不多大小的颗粒或较大颗粒的碎片所阻塞。大的颗粒不会阻塞滤膜孔穴,但流速则由于这些颗粒的堆积而减小。

深层型玻璃微粒纤维滤膜在阻塞前,其颗粒负荷量比网状型微孔滤膜大,但是深层型滤膜的绝对收集效率较差。这可用双层滤膜

(深层型滤膜放在网状型微孔滤膜之上)来达到高度的颗粒滞留能力,而且也能绝对滞留颗粒。

最后还必须指出,在表 1 中的流速是用纯

水实验得到的结果,而在用样品实验时的流速可能变慢,甚至慢很多。

滤膜的选择

根据实验材料的颗粒大小,溶剂系统或结

表 1 一些常用微孔滤膜的规格和性质

滤膜型号	平均孔径 (微米)	流速* (秒)	起泡点** (PSi)	化 学 配 伍	
				可 用	不 可 用
MF					
RA	1.2	1	12	稀酸,稀碱,脂肪族和芳香族烃类,非极性液体,稀醇等	酮类 醚类 乙醇 强酸 强碱
AA	0.80	2	16		
DA	0.65	3	21		
HA	0.45	6	32		
PH	0.30	7	40		
GS	0.22	15	55		
VC	0.10	100	100		
VM	0.05	340	150		
Celotate					
EA	1.0	4	14	醇类,稀酸,稀碱,脂肪族和芳香族烃类,非极性液体	酮类 醚类 强酸 强碱
EH	0.5	7	28		
EG	0.2	17	55		
Fluoropore					
FA	1.0	>1	4	所有的强酸,强碱,有机溶剂	—
FH	0.5	>1	7		
FG	0.2	1	13		
玻璃纤维滤膜					
AP 20	深层型没有绝对孔径大小	3	—	—	—
AP 25		1			

* 流速是 25℃ 时 10 毫升水在 13.5 PSI 压力下通过 25 毫米滤膜所需的时间 (F-型滤膜系用甲醇)。
** 起泡点是迫使空气通过水润湿的滤膜所需的压力 (F-型滤膜系用甲醇润湿)。

合蛋白质、结合核酸的性质来选择合适的微孔滤膜。此外也可以用实验来决定。例如,当收集放射性细菌悬浮液时,可把它滤过一系列依次降低孔径的滤膜层。然后分开滤膜,分别进行液闪计数测定。选用的滤膜应是能滞留放射性细菌中最小孔径的滤膜,而在滤膜上能滞留量的多少却不是取舍因素。因为部分,甚至大部分是被覆盖在它上面较大孔径的滤膜收集了,当用一片小孔径滤膜时,都能绝对收集在此滤膜上。类似的方法也能用于选择收集沉淀最恰当的滤膜。

过 滤 装 置

最简单的过滤装置和普通的吸滤装置相同

(图 2)。当需要收集滤液时可用吸滤管代替吸滤瓶。我所自制的过滤头是用不锈钢材料,滤筒的上下部分借螺纹旋紧,中间有一个四氟乙稀的 O 形垫圈 (图 2A),此外也有玻璃滤筒用夹钳固定的 (图 2B)。

国外有各种规格的多歧管过滤装置商品,可同时进行 12—30 个样品的操作,图 3 的多歧管过滤装置系由聚氯乙烯材料制成,垫圈材料是硅橡胶,网状支持片材料是聚丙烯,管架内可容纳 15 毫升试管。

在过滤前几小时,微孔滤膜要用相应的溶液浸润。在要求严格的工作中,每片滤膜应漂在溶液的表面上,让它自然浸润沉降,这样可把滤

(下转第 44 页)

携带信息: Bittner (1968 年) 在蛄蛄上做实验, 当输入的脉冲频率变化时, 一部分肌肉的收缩由另一部分肌肉的收缩所代替。

②用脉冲之间的间隔来携带信息: Perkey (1968 年) 在 *Aplysia* 或蛄蛄上做实验, 证明突触后细胞的反应对突触前脉冲间隔的变化敏感。

③脉冲在时间上的分布: Wiersma 与 Adams 最初进行了这方面的试验 (1950 年), 他们发现甲壳类的神经肌肉接头对脉冲序列的时间模式非常敏感。此外, 有 Segundo (1966 年) 和 Wilson (1968 年) 等人的实验。

④信息与到达的脉冲数有关: 电鱼, 刺激越强, 输出的脉冲数就越多 (Hagiwara, S 等 1963 年)。

⑤信息由某些输入脉冲的统计参数来表

达。

可见, 实验研究还只限于一些低等动物, 而且是很初步的。但是, 要搞清楚大脑的秘密, 解开神经脉冲编码的秘密无疑是它的前提之一。

主要参考资料

[1] McCulloch, W. S. et al.: *Bull. Math. Biophysics*, 5, 115, 1943.
[2] 南雲仁一: 生体システム, 日刊工業新聞社, 昭和 46 年。
[3] 南雲仁一: バイオニクス, 共立出版株式會社, 昭和 41 年。
[4] 木村正行: «自己組織系構成論», 共立出版株式會社, 昭和 48 年。
[5] 塚原伸晃: «数理科学», 9, 67, 1973。
[6] 永野俊: «数理科学», 9, 44, 1973。
[7] 甘利俊一: «数理科学», 1, 177, 1975; 2, 81, 1975。

[本文于 1977 年 1 月 28 日 到]

(上接第 47 页)

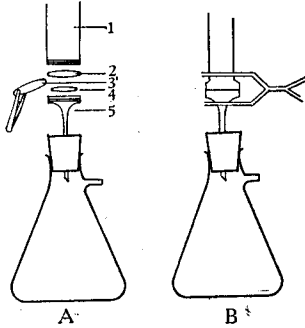


图 2 过滤器

1. 滤筒上半部; 2. 四氟乙烯 O 形垫圈;
3. 微孔滤膜; 4. 多孔不锈钢支持片;
5. 滤筒下半部

膜孔穴的空气赶出, 不致减少真正的过滤有效面积。此外在加样前, 要用相应的溶液吸滤洗涤微孔滤膜。

由于浸润了的微孔滤膜很“嫩”, 若用眼科小镊子操作会留下很清晰的纹迹, 甚至影响到过滤效果。所以一般需用平面镊或缝纫镊 (把

尖端磨圆)。

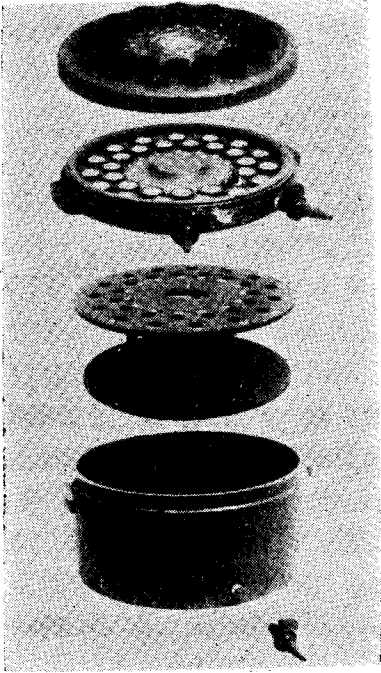


图 3 多歧管过滤器

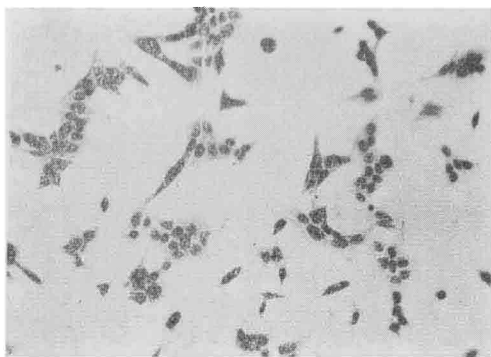


图1 实验组

Eca-109 细胞在 dbc AMP 及茶碱作用下 5 天, 细胞增殖受到抑制, 细胞密度稀, 细胞形态也变得瘦长起来 100×

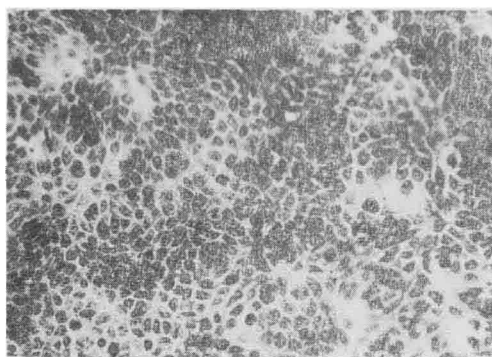


图2 对照组

Eca-109 对照组, 培养 5 天, 细胞密度大 100×

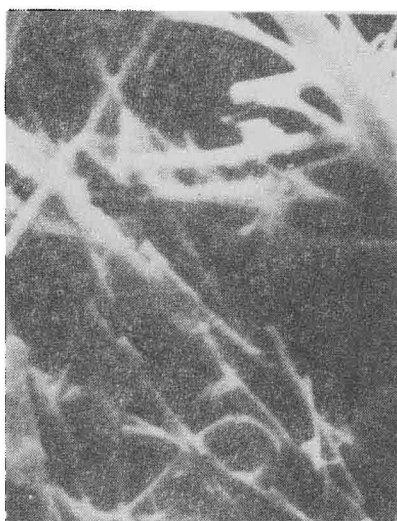


图3 玻璃微粒纤维滤膜的扫描电镜图
(2,500 倍)

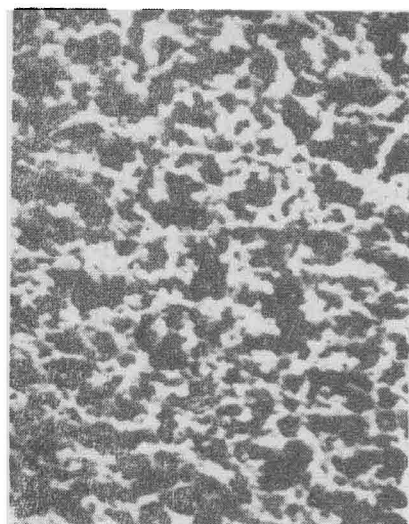


图4 0.45 微米 MF-型微孔滤膜的扫描电镜图谱
(2,500 倍)

(上接第17页)

而红外吸收光谱的强度是透过率的对数转换, 显然是麻烦的。

7. 拉曼光谱试样制备简便, 又便于做高低温测试, 退偏振度测量(决定分子的对称性)以及分析各种有色物质的拉曼光谱(即共振拉曼光谱)。如液体样品池, 可用一般硬质玻璃做毛细管样品池, 装上样品就可分析。对于不稳定的或贵重的样品可以直接测试(安瓶瓶包装), 而红外光谱样品处理很麻烦。

8. 拉曼光谱法可以研究超微量样品的分析(做到毫克级和微克级)。本仪器对乙酰苯样品取 0.5 微升, 就可轻而易举的获得乙酰苯拉曼光谱图。

9. 从制造上分析, 拉曼光谱在可见区, 无论是光源、色散元件(光栅), 还是接收元件(如光电倍增管)来源很容易。而红外光谱对这些元件还有一定困难。不过拉曼光谱仪在制造上精度要求高、复杂而且难度大。

[本文于 1977 年 4 月 30 日收到]