

微孔滤膜及其在同位素中的应用 (下)

中国科学院上海生物化学研究所四室

微孔滤膜的液闪计数

很多用微孔滤膜的微量分析都需要用液闪仪测定收集在滤膜上样品的放射性。这个过程包括:放射性样品收集或吸附在滤膜上,洗涤滤膜以除去未渗入的放射性,然后把干燥的滤膜放置在闪烁计数瓶中,再加入闪烁液进行测量。闪烁液是由溶剂(最常用是甲苯、二甲苯和二氧六环)和闪烁体(最常用是 PPO 和 POPOP)配制成的。

液闪计数在生物学中应用极其广泛,因为二种最常用的放射性示踪物—— ^3H 和 ^{14}C ——都是软 β 射线,它们的平均能量是 0.005 和 0.05 百万电子伏特,因此当它们通过物质时会迅速损失能量。但在液闪测定中,由于检出的闪烁液和放射核子紧密地接触,计数损失可减到最小。

液闪计数测定中最大的问题是,各个不同测定样品之间的计数效率的变化。计数效率是样品中每分钟计数值 (cpm) 和每分钟真正的蜕变数值 (dpm) 的比值,即计数效率 = $\frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$ 。除非已知真实的计数效率和经过校正,否则一个样品的计数和另一个样品的计数是不能相比较的。下列三个因素可能影响到计数效率偏低:(1) 自吸收;(2) 化学淬灭;(3) 颜色淬灭。

不均相系统

当收集的样品在闪烁液中不溶解时,此计数系统称为不均相系统。不均相系统的样品制备过程是最简单的:(1)干燥携有样品的滤膜,以除去持留在滤膜内的洗涤液(水、三氯醋酸、乙醇或其他),因为这些洗涤液会引起计数效率降低。(2)用芳香族烃类配制的闪烁液不会溶解滤膜和收集的样品(表 2)。

表 2 各种微孔滤膜和常用闪烁溶剂的配伍

滤膜类型	甲 苯*	二 甲 苯*	二氧六环**
MF-型	透 明	透 明	溶 解
C-型	透 明	透 明	溶 解
F-型***	不透明	不透明	不透明
玻璃纤维型	透 明	透 明	透 明

* 用干滤膜,如溶液除不完全,则滤膜有一部分不透明;

** 水润湿的滤膜;

*** 收集在 F-型滤膜上的物质能在特定的闪烁液中溶解。滤膜在计数前要除去,否则不透明的滤膜要堵住到光电倍增管上的光,从而降低了计数效率

不均相系统对测 ^{14}C 和更强能量的 β 射线时具有高效和好的重复性。滤膜在闪烁计数瓶中的方向性要求是不严格的。滤膜是完全透明的,因为闪烁液和滤膜有同样的折光指数。如果滤膜干燥不完全,含有水分时,则在闪烁液中不完全透明。因为 ^{14}C 发出高能射线,因此由于样品自吸收导致的计数效率损失是很低的。又因为样品本身不溶解,因此也不存在由于化学淬灭引起的计数效率降低。此外,携有样品的滤膜可以在计数测量以后从闪烁瓶中取出,闪烁液能重复使用。

不均相系统在计数 ^3H 和另一些软 β 射线时,有时候是不够满意的。由于样品引起的自吸收可能占相当一部分,从而引起计数效率降低。自吸收很大程度上是由于滤膜表面上样品的薄层引起的,而不是滤膜组成物质本身的吸收。我们在 cAMP 含量测定工作中,不均相系统的计数值约为均相系统的 80%。计数值的变低可以采用更有效的第一闪烁体或第二闪烁体来弥补。滤膜在闪烁瓶中的方向性导致的影响 $< 3\%$,数片滤膜在闪烁液中的计数具有叠加性。尤其闪烁液可以重复使用多次,大大节省了闪烁液和闪烁瓶的繁复洗涤。

均相系统

样品完全溶解在闪烁液中即为均相系统。在均相系统中样品本身引起的能量自吸收不成为问题,然而仍可能存在能量的化学淬灭和颜色淬灭。但在均相系统中可采用内标准、道比法和外标准,易测出绝对计数效率,因此可计算出上述原因引起的损失。用均相系统计数 ^3H 和其他低能量 β 射线是很好的,具有高效($^3\text{H} \geq 40\%$, $^{14}\text{C} \geq 85\%$)和重复性好。

大多数生物样品在配制闪烁液的溶剂中是不溶解的,因为甲苯和二甲苯与水的渗混性很差。把生物样品的水溶液(例如蛋白沉淀水解液)加入到非极性溶剂中不可能产生均相系统。对收集在滤膜上的生物样品的均相计数系统还可以采用增加溶解度的方法,例如加入一些增溶剂。最常用的是碱溶液,携有样品的滤膜放在试管中,加数毫升浓 NaOH , KOH 或 NH_4OH 溶解样品,于 50°C 加热则更有利于增加溶解速度,在这种条件下滤膜有时也不完全溶解,但不干扰计数测量。取此水解液加到能与水相渗混的闪烁液中(例二氧六环配制的闪烁液),这样便产生了一个均相系统。此系统传递能量的效率仅为甲苯系统的 70% ,但可加入蔡去提高传递效率。MF-型滤膜与 NaOH 或 KOH 混合时产生棕色,因此溶解收集在 MF-型滤膜上的物质时采用 NH_4OH 。有些样品可用某些季胺(例如 Hyamine hydroxide)进行水解,因为它和甲苯是渗混的。用甲苯配制的闪烁液优点是价廉、效率高,甲苯配制的闪烁液在加入某些有机溶剂(例如乙二醇甲醚)和蔡后也可直接溶解微孔滤膜。

为了减少碱水解样品引起的化学发光(即非放射性诱发的光子发射),消化物应加酸中和或者样品在计数前于低温暗适应一段时间。

乳化和悬浮

水相中 ^3H - β 粒子的射程范围平均约 0.5 微米,如果能使放射性样品粒子分散到间距离 < 0.5 微米,这样自吸收的损失可以减到最小,可以提高 ^3H 的计数效率。

0.5% PPO, 0.01% POPOP 的甲苯/Triton X-100 (2:1) 闪烁液能接受大于它体积 10% 的

水溶液,即乳化结果是呈现出具有水滴直径 < 0.1 微米的清液。对各种极性、非极性的 ^3H 有机物特别合适。

固体样品也能在分散剂(例 Celite)存在条件下过滤,在乳化闪烁液(PCS 或 Aquasol)中作为细的悬浮液计数。

由于乳化和细悬浮计数方法,样品的能量自吸收问题减小了,但没有完全消除。

结合测定方面的应用

蛋白质和小分子放射性标记物的相互作用,可利用 MF-型微孔滤膜的选择性结合能力,在滤膜上滞留住蛋白质/小分子络合物,而让游离的小分子全部通过。利用改变反应条件,能够阐明大分子/小分子互相反应的机理和动力学。

核酸也能高效地结合到 MF-型微孔滤膜上。在一定条件下,单链的 DNA 结合在滤膜上,而双链的 DNA 不能结合。利用滤膜结合 DNA/RNA 杂交分子而不结合单链 RNA 的条件,可进行杂交研究。此外 mRNA 也能选择性地结合到滤膜上。

核蛋白体和病毒也能结合到滤膜上。在一定的实验条件下,改变离子强度可选择性地洗脱已结合在滤膜上的物质。

当生物样品进行灭菌过滤时(用膜滤技术除去污染在溶液中的细菌),微孔滤膜吸附样品量很少,不会引起样品太大的损失。例如抗血清的滴定度,在过滤前后看不到什么影响。又例如 50 升 5% 牛血清白蛋白溶液灭菌过滤时,通过一片 293 毫米直径的 MF-型微孔滤膜,由于滤膜吸附引起的损失仅 80 毫克,约占 0.003% 。但是在某些实验中,由于过滤时滤膜吸附了一些物质可能成为一个问题。例如当无菌过滤一个非常稀的溶液时,可用 C-型微空滤膜代替 MF-型微孔滤膜,因为醋酸纤维素滤膜比混合纤维素滤膜结合的物质少。任何一种滤膜,用蛋白质溶液进行预处理,能减少对样品的吸附。

但应用在结合测定中,却又希望滤膜对生物高分子(它已与放射性小分子偶联)具有高度

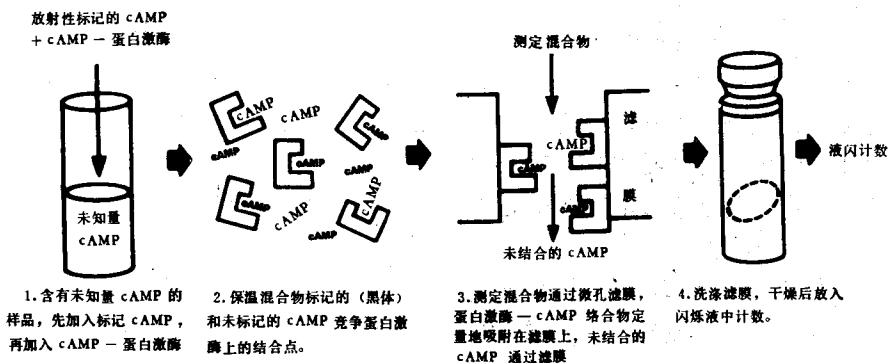
加入的血清蛋白量 (微克)	滤膜滞留的血清蛋白量 (微克)
0	0
100	100
200	190
400	320
600	380

实验系在 25 毫米滤膜上过滤 1 毫升不同量的血清蛋白(用 pH 6, 20 mM 磷酸缓冲液稀释)。Folin 法测定滤液中的蛋白质量

1. cAMP——3', 5'-环化腺苷酸在许多动物组织中以及控制细菌代谢途径中调节激素的感应,称之为“第二信使”。目前许多研究课题是围绕测定激素作用前后组织中 cAMP 的水平。

Stener 等人和 Weinryb 等人用抗体制剂代替蛋白激酶, 改进了 cAMP 测定, 改进后的优点是作用专一, 样品不需纯化即可用于测定。

2. 放射免疫——其他重要的生物组份也能用类似于上述 cAMP 放射免疫法测定。经典的放射免疫法包括加沉淀抗体到抗体-抗原络合



物中,再用过滤或离心收集。微孔滤膜过滤技术可以不需要第二抗体,大大简化和加速了测定。

3. DNA 结合蛋白测定——“受体”是种特殊的蛋白质，它与 DNA 操纵子区域络合而成基因复合物。当小分子的“诱导物”存在于细菌细胞中时，它与受体结合，从 DNA 中释放出受体-诱导物的络合物，基因才能转录。Riggs 等人利用膜滤技术发展了 lac 受体和 lac 操纵子的测定。lac 受体测定是把受体和放射性诱导物一起保温，然后把混合物通过滤膜。受体-诱

导物结合在滤膜上，过量的放射性诱导物被洗掉，然后滤膜再去计数，此放射性即代表了存在于反应混合物中的受体量。*lac* 操纵子 DNA 可混合受体蛋白和含有操纵子区域的 ^{32}P -DNA 而测定。混合物通过微孔滤膜时，受体- ^{32}P -DNA 络合物被滤膜滞留，不含有受体区域的放射性 DNA 不结合到受体上而通过滤膜。其他 DNA 结合蛋白也能用类似方法测定，如 *gal* 受体，*lac* CAP。

核酸结合应用

1. mRNA 分离——Brawerman 等人发展了一种纯化 mRNA 的方法，这是根据微孔滤膜能结合在 mRNA 中发现的特有的长 Poly A 区域。此法比经典的超离心法更为简单和给予更为完全的纯化。这步骤包括：首先用高速离心机分离到聚核糖核蛋白体 (polysomes)，然后将含有大量 mRNA 和 rRNA 的 polysomal RNA 通过微孔滤膜。含有长 poly A 片断的 mRNA 被微孔滤膜滞留，而各种 rRNA 通过。膜滤了 9 毫克兔网状红血球的 polysomal RNA，滤膜吸留了 40 微克物质，主要是 10S 血红蛋白 mRNA。用稀的 SDS 能从滤膜上洗脱下 mRNA。

2. RNA/DNA 杂交检定——Nygard 和 Hall 的最早方法是热变性的单链 DNA 和 ^3H -RNA 在溶液中杂交，然后用微孔滤膜过滤。在中等盐浓度下，滤膜吸附热变性的单链 DNA 和 DNA/RNA 杂交分子，而游离的 RNA 通过滤膜，方法既快又定量。

3. 其他——膜滤技术也用在研究核糖核蛋白体和氨乙酰-tRNA 的相互反应中。病毒也能吸附在微孔滤膜上，这已用于污水处理。

收集方面的应用

绝对收集

具有各种孔径大小的网状型微孔滤膜是根据生物颗粒的大小制造的。图 6 比较了几种常用的微孔滤膜收集的物质大小。例如酵母菌用 1.2 微米的滤膜可以完全收集到，大肠杆菌需用 0.45 微米的滤膜。

应该选择适当型号的微孔滤膜以便收集全

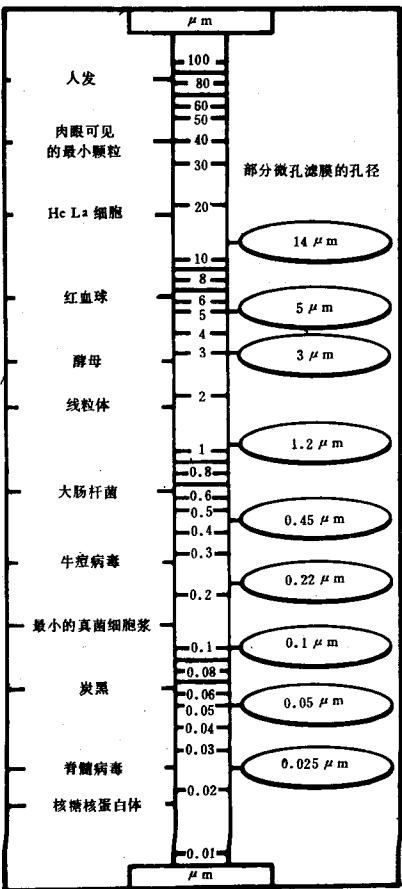


图 6 微孔滤膜孔径和一些生物颗粒大小的比较

部的沉淀。实际上用微孔滤膜收集的沉淀是非常小的，用眼睛看不到它们。当用深层型滤膜时，在进行收集前需加入未标记的大分子到反应混合物中以增大沉淀。图 7 表示了深层型滤

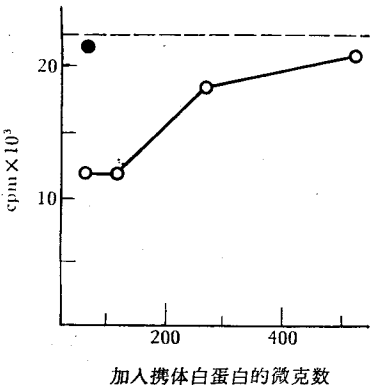


图 7 在携体白蛋白存在下，用深层型滤膜 (○) 和 MF-HA 滤膜 (●) 收集 TCA 沉淀的 ^{32}P -RNA
虚线表示加到样品中的总量

膜和网状型滤膜之间在收集效率上的差别。

酶活性测定

凡与大分子合成有关的酶都可以用标记底物来测定酶活性,即测量其渗入后在酸或有机溶剂中呈不溶性物质中的放射性。这些反应可以加入沉淀剂停止反应,在滤膜上收集沉淀,洗去未渗入的底物后滤膜用去计数。

降解大分子的酶也可以用膜滤技术。例如核酸内切酶用一般的酸沉淀法是不满意的,因为较大分子的寡核苷酸也会随着不溶性底物一起沉淀出来,为了精确测定内切酶活性,停止了酸反应的样品用 S. S 厂生产的硝酸纤维滤膜 A 型过滤,大分子滞留在滤膜上,而寡核苷酸不滞留在滤膜上。

在原则上,凡能把一种放射性前体转移或渗入到一种能选择性沉淀形式的酶的,就都能用膜滤技术测定活性。

转移研究

由大体积培养液中迅速分离细胞和细胞器的方法,使人们能够对小分子的摄取进行精确的动力学研究。Winkler 等人在线粒体内的核苷酸转移研究中比较了微孔滤膜过滤法和经典的离心法。他们发现最初的摄取非常快,在 6 秒钟内已达 50%,这一结果和以前用离心法研究的结果不同。作者认为:以前的工作者得出较大半衰期的结论是由于离心法研究这类快速反应不够精确所引起的。

另一些应用膜滤技术研究小分子转移到细胞器上,包括 ^{45}Ca 转移到线粒体, ^3H -葡萄糖由大白鼠脂肪组织进入血浆膜囊,大肠杆菌的琥珀酸转移和枯草杆菌的丙氨酸转移。

应用重叠过滤法(GS 滤膜放在 SM 滤膜下面)从细胞匀浆颗粒部分快速分离细胞核液,测

定细胞内 ATP 的分布。

受体结合研究

膜滤技术也能用于测量噬菌体快速吸附到细菌上去。吸附到细菌上的标记噬菌体完全被滞留,而没有附加上的噬菌体完全通过滤膜。

Cuatrecasas 研究了 ^{125}I -胰岛素结合到肝或脂肪组织的细胞受体上。用 C-型滤膜过滤,膜滤前用聚乙二醇选择性沉淀可溶性受体-胰岛素,测定了细胞中受体数目和胰岛素-受体相互反应的解离常数。

放射性示踪物的超净

放射性示踪物在贮存过程中可能产生放射自分解产物和其他放射性杂质,它们可能被滤膜滞留和吸附在沉淀上,这样会引起高空白。如果用微孔滤膜预滤,常常可以除去潜在的干扰物质。例如 RNA 聚合酶测定中用的 ^{14}C -ATP,由于存在放射性分解产物,它和 RNA 共沉淀给出空白对照计数可高达 6300 cpm,当 ^{14}C -ATP 溶液在使用前用微孔滤膜预滤,则空白下降到 200—300 cpm。对于超净目的专门有一套微量膜滤设备,即在同位素取样的注射器和针头之间有一圆盘状膜滤装置,常用的滤膜为 0.22 或 0.45 微米。

以上介绍了微孔滤膜的一些性质和讨论了在液闪测定中的一些技术性问题。在具体应用中,结合测定方面是根据滤膜的结合蛋白质和结合核酸的性质,在沉淀收集是根据滤膜的孔径大小,这二种应用中的依据是不相同的。一些滤膜的试制和生产,为我们提供了很好的条件,将促进这项技术在科研工作中发挥一定的作用。

[本文于 1977 年 6 月 8 日收到]

(上接第 47 页)

(3) 缓冲液的选择与要求 常用巴比妥缓冲液或硼酸缓冲液, pH 8.6, 离子强度 0.06—0.09。

(4) 染色液的选择 据有关资料报道和我们的实践,溴酚蓝、氨基黑 10B 和偶氮胭脂红等染色剂,对血清白蛋白的结合力都要高于球蛋白,所以有的主张将电泳结果分别乘以校正系数,但并未得到普遍采用。

在膜电泳中,一般都乐于选用氨基黑 10B,因其着色力强,亦较稳定。

此外,将醋酸纤维膜电泳与免疫扩散技术相结合,亦可进行免疫电泳,其原理与琼脂免疫电泳相同,不过是以醋酸纤维膜代替琼脂胶板,以浸入样品的膜条代替抗体扩散槽,这种方法操作比较简便。(未完待续)