

国产 49 型玻璃纤维滤纸在同位素液体闪烁测量中的应用

上海第二医学院基础部同位素室
上海第二医学院免疫研究室
上海中医研究所

当前玻璃纤维滤纸在生物样品软 β 射线的测量中已日益广泛应用。但国内过去尚无此类滤纸供应。我们在以前的工作中曾用酸碱消化法对组织细胞内核酸等生物大分子进行均相测量,处理样品时方法比较繁杂,实验周期长,成本也高。为此,我们与上海红光造纸厂配合,摸索了国产 49 型玻璃纤维滤纸在细胞样品软 β 射线测量中的应用。

材料与方 法

滤纸 国产纤维滤纸,又称空气净化滤纸,简称 49 型滤纸。由上海红光造纸厂研制提供。其孔径可阻止 0.3 微米粒子通过,滤过率仅万分之一(即过滤效率为 $\geq 99.99\%$)。滤纸厚为 0.25—0.3 毫米,吸水性能强,抗张强度 >230 克。根据滤器板及测量杯底面积大小制成相应大小之滤片。我们使用的滤片直径约 2 厘米,使用时预先于生理盐水中浸透 1—2 分钟,置抽滤瓶上。将含放射性同位素之细胞样品弃上清液后,重新悬浮再滴于滤片中心,随即用 10 毫升生理盐水洗涤,再用 5 毫升 5% 三氯醋酸固定样品,最后用 3 毫升无水酒精洗涤、脱水、脱色。滤片于 60—70℃ 烘箱中 15 分钟烘干。冷却后置 5 毫升 0.3% TP、0.01% POPOP (或 0.6% bis-MSB) 二甲苯闪烁液中,由国产 YSJ-76 型液体闪烁测定仪测量。结果以 1×10^6 淋巴细胞或白细胞数的每分钟计数 (cpm) 或所加放射性的 % 数表示。若为全血样品,则预先低渗处理红血球,其余操作方法同前。

同位素 胸腺嘧啶脱氧核苷 (^3H -TdR), 比活 5 居里/毫克分子。由上海原子核研究所供应,用量为 1 微居里/毫升培养液。

细胞培养 培养液为 RPMI 1640 2—3 毫升(每管),取肝素化外周全血或分离淋巴细胞,以植物血凝素 (PHA) 激活之。在 37℃ 下培育 72 小时,淋巴细胞混合培养则为 6 天。同位素掺入时间一般为终止前 20—22 小时。

植物血凝素 自广东红肾豆中提取,由本院自制半精制干粉,用生理盐水或 1640 稀释,放低温冰箱保存。

实验结果与分析

(一) 线性关系

1. 水溶性 ^3H -TdR 测量之线性关系

用微量注射器分别吸取 0.02 微居里/10 微升, 0.04 微居里/20 微升, 0.06 微居里/30 微升

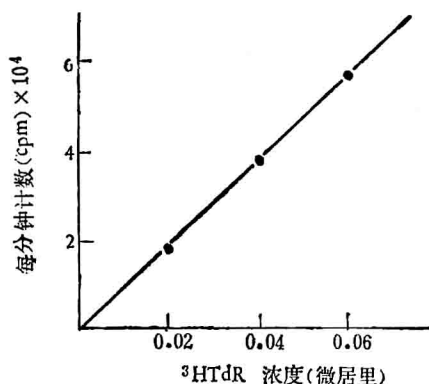


图 1 水溶性 ^3H -TdR 测量的线性关系

³H-TdR, 滴于滤片上,边滴边吹干,于 5 毫升闪烁液中测量结果见图 1。

2. 全血样品白细胞数量与 ³H-TdR 掺入强度的线性关系

取 0.3 毫升肝素化全血,分管培养,每管加 ³H-TdR 及 PHA 刺激,总共培养 72 小时。低渗破坏红血球后,再将白细胞悬液混合,计数每毫升内白细胞数,分别吸取 10 万、20 万、30 万、40 万已标记白细胞悬液于滤片上,抽滤、洗涤、烘干、冷却后测量(图 2)。

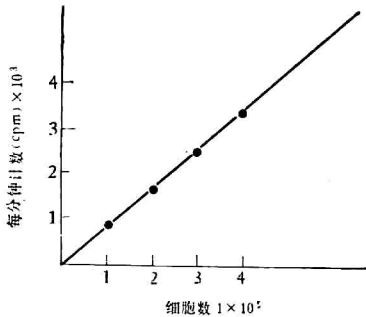


图 2 全血样品不同白细胞数与 cpm 的线性关系
cpm 为三个复管均值 CV 为 3.4—5%

3. 分离淋巴细胞与 ³H-TdR 掺入线性关系

健康人肝素化全血,经聚蔗糖-泛影葡胺(Ficoll-Isopaque $d = 1.077$) 梯度离心分离淋巴细胞,每组接种不同量细胞数,每管所加 PHA 与 ³H-TdR 相等,样品处理如前所述,结果如表 1。

表 1 PHA 激活的分离淋巴细胞与 ³H-TdR 掺入的线性关系

接种淋巴细胞数 (1×10^6)	cpm $\pm$ SD(CV) $n = 3$
对 照	172
0.1	10725*
0.2	28055 $\pm$ 1439(5%)
0.4	72269 $\pm$ 1360(1.9%)
0.6	108472 $\pm$ 9300(8.5%)
0.8	181713 $\pm$ 4145(2.3%)
1.0	215909*

* 为二个复管

由于理论上应直线通过原点,经直线回归方程求得 $y = 0.209$, $p < 0.01$ 。

上述三种实验线性关系的结果表明,国产 49 型滤纸无论对水溶性 ³H-TdR,全血白细胞或分离淋巴细胞等样品,在一定范围内(如细胞样品在 1×10^6 之内)符合线性关系,各组复管标准差的变异系数(CV)在 1.9—8.5% 之间,复管稳定性尚好。

(二) 测量效率

1. 水溶性 ³H-TdR 样品的测量效率

取水溶性 ³H-TdR 0.04 微居里/20 微升,分别滴在 49 型滤纸、GF/A(英)滤纸及均相法闪烁液中(不含乙二醇乙醚),先由均相法测量求得效率,然后算出 dpm,再求 49 型滤纸及 GF/A 之相对效率,结果三者效率相接近(见表 2)。

表 2 49 型滤纸相对效率(水溶性 ³H-TdR 样品)

	三 种 方 法		
	49型滤纸 $n = 5$	GF/A $n = 6$	均相法 $n = 3$
cpm $\pm$ SD (CV)	38369 $\pm$ 1934 (5%)	42428 $\pm$ 1637 (3.8%)	44096 $\pm$ 779 (1.76%)
相对效率 (%)	39.2	43.4	45

n 为实验复管

2. 全血白细胞样品测量效率

取 0.3 毫升肝素化全血,培养及操作如前,分别采用 49 型滤纸,GF/A 和均相法(样品预先经 $H_2O_2-HClO_4$ 消化)测量各样品的 cpm,比较三者实际应用时细胞样品的相对效率及复管稳定性(见表 3)。

经 ³H-TdR 参入的全血白细胞样品所测 cpm 值,49 型滤纸及 GF/A 滤纸测量相对效率较接近,而 $HClO_4-H_2O_2$ 消化后均相测量者,由于 $HClO_4-H_2O_2$ 及乙二醇乙醚(或甲醚)均有严重的淬灭作用,所以测量效率较低(一般在 25—32%)。故细胞样品测量时,在一定细胞范围,滤片法似乎优于所用的均相法。而 49 型滤纸无论在实际应用价值或复管稳定性方面与 GF/A 滤纸相比均无明显差别。

表 3 全血白细胞样品相对效率及稳定性的比较

复管数	49型滤纸 cpm n = 6	GF/A cpm n = 8	均相法 cpm (HClO ₄ -H ₂ O ₂ 消化)n = 8
1	33188	30917	19315
2	31578	24555	12682
3	31106	28353	14771
4	33406	28940	12110
5	34597	20011	8552
6	29753	23859	14630
7	*22680(色淬灭)	23859	15485
8	*20223(色淬灭)	32415	13805
对照(加 ³ H-TdR)	299	281	279
空白	31	31	85
复管cpm±SD(CV)	30309±2006 (6.6%)	26339±1330 (5%)	13640±3061 (22.4%)
P 值	P > 0.05		P < 0.001

* 有色淬灭未作统计
n 为实验复管

(三) 其他有关测量条件、因素的试测

1. 滤纸正反面测量效果之比较

一般观察滤纸无明显正反面，我们是以细网面为正面。全血样品在制备滤片测量样品时有意改变几何条件，结果见表 4，5。

表 4 滤片正反滴测之比较

cpm 几何条件 滤纸	正滴反测 cpm±SD(CV) n = 6	反滴正测 cpm±SD(CV) n = 6	去滤片后 cpm n = 6
49型滤纸	140506±13700 (9.8%)	137288±3536 (2.6%)	$\bar{X} = 55$
GF/A	145537±14660 (10%)	142880±11530 (8.1%)	$\bar{X} = 67$

n 为实验复管

表 5 滤片叠加测量

cpm 几何条件 样品号	单片测	叠加测
1 2	15424 124919	137922(降低1.7%)
3 4	2845 3394	5863(降低6.4%)

表 4 结果说明：滤片正反面方向改变，对样品测量效率没有明显的影响。对于滤片样品其他几何条件的变化，例如反面滴样反面测量或反面滴样正面测量，甚至将滤片贴于测量杯壁测量效率亦无显著改变。

表 5 进一步表明，两张滤片样品叠加后测量结果与分别测量之和较为接近。表 4，5 均说明 49 型滤纸透光性能良好，而且除去样品滤片后，闪烁液仍在本底水平(个别因拣破滤片者除外)。这就为非均相细胞样品的测量提供了有利条件，不仅有助于复管的稳定性，而且闪烁液可重复使用，节省了大量人力物力。样品叠加后，测量效率略有下降，除仪器误差外，可能与部分光子被吸收有关。

2. 闪烁液体积与 cpm 测量值之关系

同一样品于不同体积之闪烁液中测量结果如表 6 所示，闪烁剂在 2—6 毫升范围，其 cpm 值变化不大，除非将闪烁剂倒尽后，仅保留样品滤片浸透的情况下，其测定值才有明显的下降，而 5 毫升闪烁液已充分满足测量的要求。比均相法省闪烁剂。

表 6 闪烁剂体积与 cpm 之关系

放射性强度 样品号 闪烁液量(毫升)	cpm		
	1	2	3
5	6086	6546	4990
倒去	4677	5402	4371
2	6118	6782	4960
4	6286	6669	5079
6	6195	6530	4954

(四) 应用初步结果

我们利用国产49型玻璃纤维滤纸在临床及实验研究中初步进行某些方面的探索工作，应用实例如下：

1. 肿瘤病人免疫状态的测定

肝素化静脉全血 0.2 毫升，经 PHA 刺激，37℃ 培养 72 小时，于终止前 20 小时，加入 ³H-TdR，以测定淋巴细胞合成脱氧核糖核酸的能力。实验分别观察了正常人及头颈部恶性肿瘤

患者的细胞免疫功能, 借以判断肿瘤病人免疫状态与预后的关系。10 例正常人淋巴细胞的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入强度为: $\text{cpm}/1 \times 10^6$ 淋巴细胞为 $\bar{X} \pm SE = 25 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^4$, 而部分恶性肿瘤病人显著低于正常, $\bar{X} \pm SE = 12.2 \times 10^4 \pm 2.9 \times 10^4$, 经数理统计 t 值 = 2.779, $P < 0.05$, 两组有显著差别(表 7)。

表 7 肿瘤病人细胞免疫状态

病 例*	诊 断	$^3\text{H-TdR}$ 掺入强度 $\text{cpm}/1 \times 10^6$ 淋巴细胞
夏××	上颌窦癌转移下颌骨中心性癌	0.18×10^4
马××	腮腺癌, 手术后复发	0.91×10^4
庞××	腮部黑色素瘤	0.46×10^4
徐××	口腔圆柱瘤肺转移	11.70×10^4
胡××	牙龈横纹肌肉瘤	12.30×10^4
胡××	颊部腺瘤, 复发	15.10×10^4
刘××	腮腺粘膜表面癌	16.20×10^4
镇××	颊癌复发	16.80×10^4
曹××	腮腺恶性肿瘤	19.80×10^4
丁××	黑色素瘤淋巴转移	29.00×10^4

* 病例由上海第二医学院附属第九人民医院口腔颌面外科提供

初步表明用同位素掺入法测定细胞免疫功能是有一定意义的, 且比形态上观察淋巴细胞转化率更为客观。

2. 小牛胸腺提取物对小白鼠胸腺细胞自动掺入 $^3\text{H-TdR}$ 的影响

$^3\text{H-TdR}$ 掺入细胞 DNA 法亦适用于衡量胸腺细胞的分裂增殖速度以及一些制剂对它的影响。已知青年动物的胸腺细胞自动分裂 (Spontaneous division) 极为旺盛, 只要在适当的培养条件下即能掺入 $^3\text{H-TdR}$, 我们摸索了这个体外系统 (培养条件等与外周淋巴细胞相近似) 用作某些 T 细胞抑制剂活力测定的方法。下列实验结果初步说明由小牛胸腺中提取的抑制物质 (Lymphocyte chalone, 主要成份是蛋白质) 有抑制小白鼠胸腺细胞对 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的作用 (表 8)。

3. 植物血凝素活力测定

体外 PHA 能刺激外周血中淋巴细胞 DNA 合成增加一事, 已为人们所了解。因而借助于

表 8 小牛胸腺提取物对小白鼠胸腺细胞自动掺入 $^3\text{H-TdR}$ 的影响

实验批数	加抑制物质 (毫克/毫升)	$\text{cpm} \bar{X} \pm \text{SD}$ ($n = 3$)	抑制率 (%)
一	0 (对照组)	23660 ± 3502	0
	0.125	24169 ± 1439	0
	0.25	18904 ± 2639	20
	0.50	13739^*	42
	0.80	10078 ± 576	57
二	0 (对照组)	15557 ± 1933	0
	0.50	7576 ± 595	51
	1.0	4366 ± 369	72

* $n = 2$; 反应系统: 每培养管总体积 2 毫升 1640 (20% 小牛血清) 每管含小鼠 (4—6 周) 胸腺细胞 1×10^7 , 于 37°C 保温 3 小时后加入 $^3\text{H-TdR}$ 1 微居里/毫升, 继续培养 1 小时后收获细胞进行测定。抑制物质由本院生化教研组提供, 并参加部分实验工作

$^3\text{H-TdR}$ 掺入强度 (cpm) 能够反应 PHA 之活力, 本实验取 0.3 毫升肝素化全血, 以不同 PHA 浓度刺激, 结果如图 3 所示。

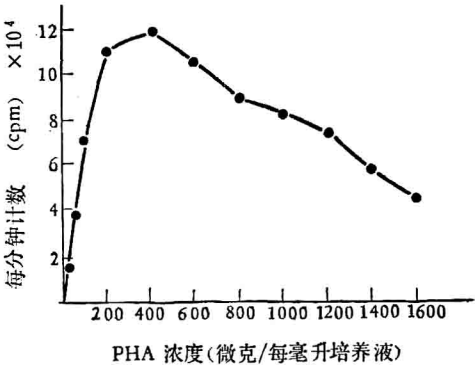


图 3 PHA 活力测定

从测定结果可以清楚地看出 PHA 刺激最佳浓度为 400 微克/毫升培养液, 此效价与红血球凝结法及形态检查结果一致, 这表明本实验方法能够敏感地反应 PHA 的抗原活力。

4. 健康人双相混合淋巴细胞培养

哺乳动物带核细胞表面存在某些共同的器官特异性抗原, 所以将两个无关供体的外周淋巴细胞混合培养时, 由于淋巴细胞受到异体抗原的刺激而发生淋巴细胞增殖, DNA、RNA 合成增多, 因此用 $^3\text{H-TdR}$ 掺入则能部分地反应两个无关供体间组织特异性抗原相容的程度,

表 9 双相混合淋巴细胞培养所测结果

对照组 cpm	实验组 cpm	刺激指数
2845(AA)	45437 (AX)	19.6
701 (BB)	34084 (BX)	27.5
3772(CC)	27942 (CX)	10.1
1202(DD)	56288 (DX)	36.7
2048 (EE)	48522 (EX)	25.3
1778 (XX)	—	
2304 (FF)	98743 (FY)	40.8
2532 (YY)	—	
3176(GG)	52902 (GZ)	19.1
2375 (ZZ)	—	
35519(HH)	146557 (HJ)	7.1
22522 (II)	143377 (IJ)	10.1
5809 (JJ)	—	

对照组 AA, BB, CC…… JJ 为各个不同的供、受体自身培养的组别

实验组 AX, BX, CX……IJ 为各双相混合淋巴细胞培养之组别

刺激指数 =
$$\frac{\text{实验组 cpm 绝对值}}{\text{两个相应自身培养对照组 cpm 之和} \times \frac{1}{2}}$$

(下转第 47 页)

若 ³H-TdR 参入指数低,则相容性程度较好,反之则相容性程度较差。这样便为器官移植选择相适合的供体提供一定的依据。

实验方法是采用健康人外周血分离的淋巴细胞。实验组各取供、受体 0.5 × 10⁶ 淋巴细胞混合培养,培养液为 RPMI 1640 (含 20% 同种血清或 AB 血清)保温 37℃ 6 天。对照组取自身淋巴细胞 1 × 10⁶,培养条件同前,按所收获淋巴细胞之多少,确定 2—3 只复管。测量方法同前。

实验结果以 cpm 绝对值和刺激指数表示。各实验组相应的对照值是分别取其自身对照的半量之和。如表 9 和图 4 所示。

小 结

我们对国产 49 型玻璃纤维滤纸在软 β 射线液体闪烁测量中的有关性能及在医学研究中的某些方面应用,进行了初步的摸索。实验资料

水源中乙型肝炎病毒污染的可能性

中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组
上海第六人民医院检验组

乙型肝炎可以因注射器消毒不严、与乙型肝炎病人长期接触等途径进行传播,也可以通过吸血昆虫(蚊子、臭虫)传播。为了解是否尚存在其它的传播途径,我们曾对各种水源进行了乙型肝炎表面抗原(HB_sAg)的检测。

材 料 和 方 法

HB_sAg 和抗-HB_s 由上海第六人民医院检验组供给。抗-HB_s 的效价是 (1:256), (对流电泳法)。¹²⁵IHB_sAg 用氯胺 T 方法标记^[1]。琼脂糖-抗-HB_s 免疫吸附柱参照抗-AFP 免疫吸附柱的方法制备^[2]。

HB_sAg 的检测 用免疫粘附血凝法 (IAHA)、反向被动血凝法 (RPHA) 和放射免疫琼脂糖扩散自显影法。后者琼脂糖的浓度为

0.6%, 缓冲液是 pH 8.6, 0.025 M 巴比妥钠-盐酸溶液。抗原孔的孔径是 5 毫米, 抗体孔的孔径是 4 毫米, 抗原孔和抗体孔的间隔 3 毫米, 抗原孔加入 ¹²⁵IHB_sAg 的量是 30,000 脉冲/分, 检测用的抗-HB_s 是 1:1600 稀释度溶液, 扩散时间为 48 小时。

待测水样的处理 每份水样取 100—200 公斤, 加入工业苯酚, 使其最后浓度为 0.5%, 存放二天。将水通过抗-HB_s 免疫吸附柱 (柱内径约 1 公分, 内加琼脂糖珠-抗-HB_s 5 毫升), 流速 7—10 公斤/天, 流毕后先用蒸馏水洗去杂质, 再用 25 毫升 3M 硫氰酸钾洗脱, 流出液迅速用水透析, 并浓缩至 1 毫升, 作 HB_sAg 检测。

电泳标本的制备 待测的浓缩样品以

(上接第 5 页)

各种酵母株的最适酶浓度也不相同,例如对数生长期 2·982 面包酵母最适酶浓度为 20—30 毫克蛋白/克湿酵母。

三、蜗牛酶的保存和反复使用

将制备好的蜗牛酶干粉制剂分装于安瓶中抽气封管并在冰箱中存放。根据我们的经验在这样条件下保存的蜗牛酶几年之后仍能保持很高的活力。

为了节省蜗牛酶的用量,国外有人提出反复使用的办法^[6],步骤如下:酵母细胞经蜗牛酶作用形成球形体。离心以后上清液再用高速离心一次(105,000 g 左右,20 分钟)。除去沉淀后的上清液加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 使其饱和度

达到 65%(每 100 毫升加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 39.8 克)并在 5℃ 放置保存。当重新使用时可将上述存液进行离心(10,000g,5 分钟)。沉下的蜗牛酶即可再度用于消化酵母细胞壁,据说,用这种方法处理,蜗牛酶可以反复使用 6 次。

参 考 文 献

- [1] Bhojwani, S. S.: *Nature: New Biology*, **239** (88), 29, 1972.
- [2] Fogel, S.: *Genetics*, **48**(3), 321, 1963.
- [3] Eddy, A. A.: *Proceedings of the Royal Society of London*, **149**, 937, 1958.
- [4] Utter, M. F.: *Journal of Bacteriology*, **88**(6), 1762, 1964.
- [5] 潘家秀等:《蛋白质化学研究技术》,1962年。
- [6] Schatz, G. et al.: *Methods in Enzymology*, **31**, 632, 1974.

[本文于 1977 年 11 月 15 日收到]

(上接第 10 页)

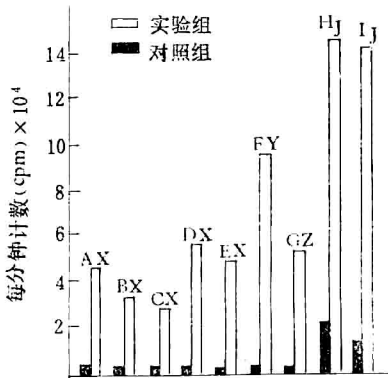


图 4 双相混合淋巴细胞培养试验

表明,国产 49 型滤纸,对于各种细胞样品的放射性测定,在一定细胞数范围内(0.1×10^6 — 1×10^6 细胞,全血 0.1—0.3 毫升)线性关系良好。滤纸的抗张程度、吸水性能、透光度均较好。复管的稳定性也较满意,同位素标记的细胞样品用 49 型滤纸与国外同类滤纸 GF/A 相比效率无显著性差别,叠加实验说明滤纸吸收

光子的现象轻微,(仅降低 1.7—6.4%)基本上达到同位素液体闪烁测量要求。

测量样品经生理盐水、三氯醋酸、无水酒精洗涤、固定、脱水、脱色抽滤后,游离同位素可洗去,对照管 cpm 值均接近本底要求,拣去样品滤片后,除个别外(如拣破纸片等)闪烁液可在本底水平,闪烁液可重复使用。

我们通过上述工作,初步认为:49 型玻璃纤维滤纸在软 β 射线液体闪烁测量中,尤其是对细胞样品的直接定量测量,较为准确、快速、经济、简便。测量方法有一定的推广价值。

由于国产玻璃纤维滤纸在液体闪烁测量中的使用时间短,工作做得粗浅,尚有待今后工作中不断总结,加以提高。

参 考 文 献

- Schrier, B. K. et al.: *Methods in Cell Biology*, **13**, 105, 1976.

[本文于 1977 年 10 月 19 日收到]