

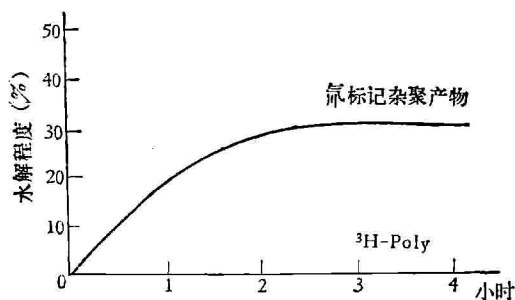


图 6 比较 RNase A 降解 ^3H -poly A 及
氚标记杂聚产物的效率

氚标记杂聚产物。其原因可能有二个：(1) G 被聚合进去的量极微，因此被酶解部分的链仍然很长，所以还能被 10% 三氯醋酸所沉淀。(2) G 在 37°C 下不能被聚合进去，而必需以 Mn^{++} 代替 Mg^{++} ，温度提高到 60°C 才能聚合进去^[5]，所以在我们所用的聚合条件下，G 被聚合的量极微，甚至没有。

2. 用 RNase A 酶解氚标记杂聚产物

这一方法的原理是：当 RNase A 浓度很低时，它只能酶解 C、U 的 RNA，而酶解 ^3H -poly A 的速度极慢，以致检测不出。但若提高酶量，则 RNase A 也能酶解 ^3H -poly A。我们的结果正是如此。在 500 微升反应系统中含有 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5)，0.5 微克 RNase A， ^3H -poly A (54,000 cpm) 或氚标记杂聚产物 (44,000 cpm)。在 37°C 下温育，按常规纸片法检查 10% 三氯醋酸沉淀的放射性计数，结果见

图 6。从图 6 中可见在低酶量时， ^3H -poly A 完全不能被酶解，而氚标记杂聚产物有 30% 被酶解，并且在 2 小时后就达平衡。这说明氚标记杂聚产物中含有 C 和/或 U。

从以上二个实验可见氚标记杂聚产物中除含 A (腺嘌呤) 外，还含 C 和/或 U，但 G 的含量极微，甚至没有，以致检测不出。

检测杂酶活力时，标记底物的比放射性与检测灵敏度关系很大，因此制备比放射性高的底物是提高检测杂酶灵敏度的关键。

[8-Br] 5'-ADP 吸附在“201×8”阴离子交换柱上，用 0.08 M + 0.001 N HCl 洗脱，此流出液曾直接通过“769”颗粒活性炭柱除盐，再用 2% NH_4OH 的 50% 乙醇的水溶液洗脱，结果收率甚低，故改为 DEAE-纤维素脱盐以提高收率。

参 考 文 献

- [1] Getz, M. J. et al: *Biochem. Biophys. Acta*, 287, 485, 1972.
- [2] Richardson, C. C.: *Procedures in Nucleic Acid Research* 2, 813, 1971.
- [3] Iida, S. et al: *FEBS. Letters*, 39(3), 263, 1974.
- [4] Ikahara, M. et al: *Chem. Pharm. Bull.*, 17(2), 348, 1969.
- [5] Kimhi, Y. et al: *Method Enzymol*, 12B, 513, 1968.

[本文于 1978 年 4 月 12 日收到]

生物样品中 ^{14}C 的氧瓶燃烧测定法*

唐希灿 石其贤** 俞月桂 梁尤毅

(中国科学院上海药物研究所)

制备同位素生物样品进行液体闪烁测定的方法很多。氧瓶燃烧法由于操作简便，样品取量大，且最终得到的是无色液体，因而能克服一些比放射性低样品在测定时的化学淬灭；或在消化处理样品时引起 $^{14}\text{CO}_2$ 的丢失等缺点，目前

愈来愈广泛地得到重视和应用。我们在进行 ^{14}C -棉酚的吸收、分布和排泄研究时，曾采用过

* 本文曾于 1975 年 7 月 26 日在上海市放射性同位素医学应用交流会宣读讨论。

** 浙江人民卫生实验院药物研究所。

多种方法来处理生物样品,均引起¹⁴C的丢失,影响结果。因此,参照文献报道,着手建立氧瓶燃烧测定方法。在实践中,根据我所实验室条件,作了一些改进。现将氧瓶燃烧的有关装置和程序简述如下。

1. 材料和装置

氧瓶燃烧的简单原理,是将待测样品悬挂于密闭的充满氧气器皿内,点火引燃,使样品完全燃烧为¹⁴CO₂或³H₂O,然后进行定量回收,再作均相或非均相的测量。为此,必需有一套相应的装置。

燃烧瓶 文献报道的式样有多种,各有优缺点。我们采用体积1,000毫升的国产厚壁吸滤瓶,充氧后将样品悬挂于瓶内燃烧。它的优点是取材方便,价廉耐用,易于清洗,工作量较小。瓶的侧管接一段7厘米长医用输液管,充氧时,用套有细橡皮管的止血钳夹住。瓶塞采用国产16号灰白色橡皮塞。

样品燃烧篮的制备 J. D. Davidson 等人曾报道改进的燃烧篮的制备,但仍较复杂。我们是取直径1毫米,长150毫米的铂丝一段,按每边25毫米长折成四方形框架。另取直径0.51毫米镍丝,剪成小段,长40—50毫米,将每小段镍丝的两端分别缠扎在铂丝架上,交叉编织成网,每边7—8根(图1)。织成后沿网片的

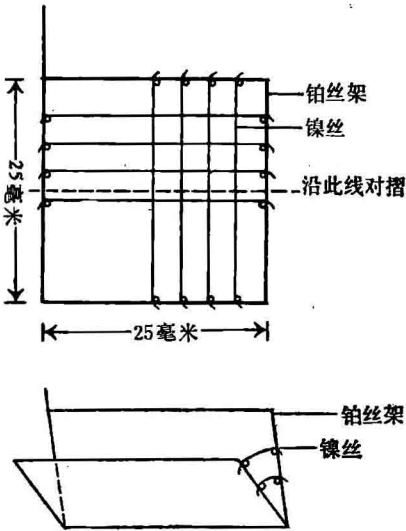


图1 燃烧篮编制示意图

中间水平线向上对折,使成斜槽形,在两侧,需再分别缠扎镍丝,防止样品激烈燃烧时从旁掉落。

燃烧篮支架制备 用打孔器先在吸滤瓶瓶塞中央打一孔,将直径6毫米,长250毫米的玻璃管一端在火上加热,然后趁热稍加力使穿过瓶塞洞口,冷却后管壁与瓶塞紧贴,不会留下任何空隙导致漏气。玻璃管在瓶塞下保留140毫米长最适宜,过短或过长在燃烧时,会燃及瓶塞或触及瓶底。取一段260毫米长的铜丝,在其一端焊接一段直径1毫米的铂丝(长60毫米),然后穿入玻璃管内(铂丝端向下)。玻璃管的上端用石蜡封口,下端加热封口,留出30毫米长一段铂丝在外,它作为传导火花的导线。在玻璃管下端10毫米处接一玻璃棒侧枝,用以固定悬吊样品燃烧篮(图2)。这样就可免除在瓶塞上打二个洞,以安接二个玻璃棒的麻烦。

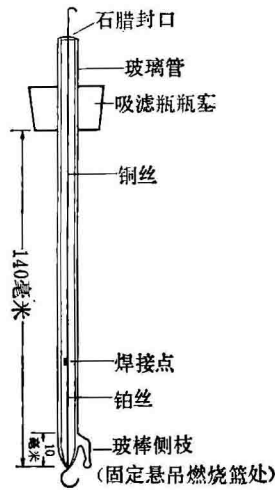


图2 燃烧篮支架制备示意图

样品袋 生物样品燃烧前,需要放置于袋内凉干。将宽24毫米的半透膜,分剪成长17毫米左右的短片(重约50毫克)。在短片的一端对折起一小边,另一端用镊子撑开,即成一袋状。称取的样品放于袋内自然凉干。燃烧时将整个样品袋放入燃烧篮内。据实践,体积1,000毫升的吸滤瓶一次充满氧气后,能将湿重130毫克的凉干样品,或干重30毫克的粪便样品连

同样品袋燃烧完全。

点火 用高频火花真空测定仪发放火花点火。同时将仪器调试到产生不少于3条火花线,然后对准瓶塞上端铜丝连续发放火花。

CO₂ 闪烁液溶剂 我们开始采用苯乙胺,后因来源困难,改用乙醇胺。两者的配方参照文献报道,每升中含有苯乙胺 270 毫升,甲醇 270 毫升、甲苯 460 毫升、PPO 5 克, POPOP 0.1 克或乙醇胺 120 毫升,乙二醇乙醚 400 毫升,甲苯 480 毫升, PPO 6 克, POPOP 0.2 克。市售苯乙胺和乙醇胺需先经减压蒸馏、处理后的苯乙胺和乙醇胺均呈无色,放置于冰箱内备用。上述配方中,我们把甲苯(溶解有 PPO 与 POPOP)与苯乙胺、甲醇、或乙醇胺、乙二醇乙醚分开配制。当燃烧完毕后,向吸滤瓶内仅注入苯乙胺、甲醇或乙醇胺、乙二醇乙醚。这样,实验完毕后,仅需用热肥皂水刷洗就能去污。

2. 操作程序

将注射 ¹⁴C 药物的动物放血处死后,称取待测的各脏器。湿组织不超过 130 毫克;干样

品不超过 30 毫克;全血不超过 0.2 毫升。组织块均置于重 6—7 毫克的定量分析滤纸片上称重,然后一并放入样品袋内。样品袋用回形针夹住,悬挂在通风处,在室温下凉干 48 小时,即可进行燃烧。

采用排气法向吸滤瓶内充氧 3—5 秒钟后,塞紧瓶塞。将凉干的样品袋放于燃烧篮内。打开瓶塞,迅速将带有燃烧篮的支架移入瓶内,塞紧瓶塞(图 3),点火。一般在几秒钟内就能使挂在篮边一小片半透膜首先点燃(图 4),接着波及样品袋。一般在数十秒钟内燃烧过程完毕。然后将吸滤瓶移入盛有冰水的平底瓷盆内,冷却 5 分钟,使瓶内的 ¹⁴CO₂ 下沉。用注射器吸取乙醇胺、乙二醇乙醚混合液 8 毫升(苯乙胺、甲醇为 7 毫升),沿着吸滤瓶的侧管橡皮管管壁缓缓注入瓶内,此时在原先夹止血钳的外端再补夹一把止血钳,在两把止血钳之间插入注射针头,松开原先靠近侧管口的止血钳,将 CO₂ 吸收液注入瓶内,然后仍将原先的止血钳夹住,取走外侧止血钳。上述操作可避免针头

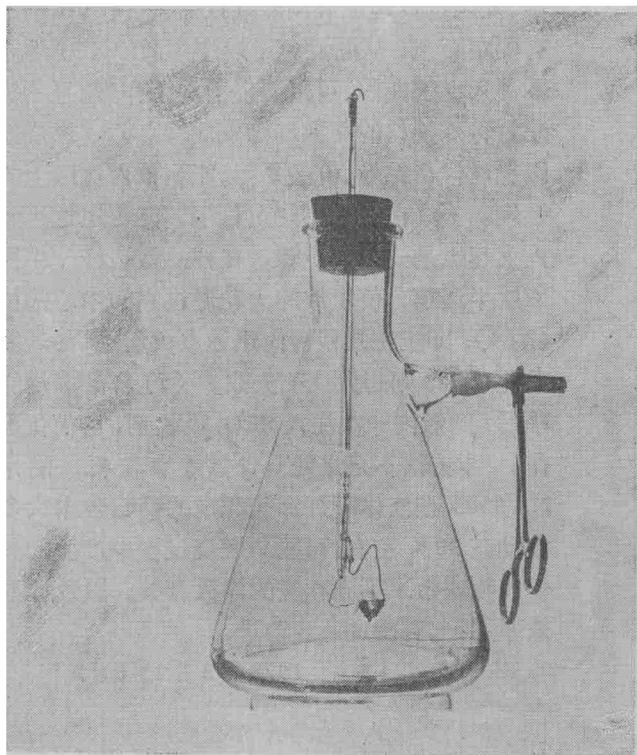


图3 样品移入充满氧气吸滤瓶内准备点火燃烧

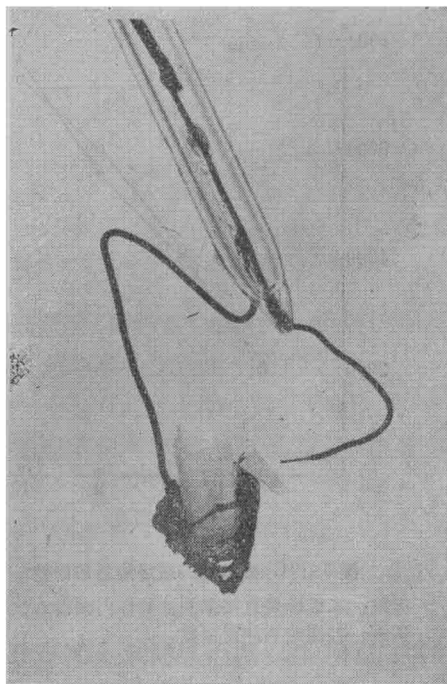


图4 样品移入燃烧篮内、在篮边放置一小片半透膜,使火花通过它引起燃烧

在橡皮管上扎洞导致漏气,从而影响量的回收。注入吸滤瓶内的吸收液使其均匀沾满瓶底,并在冰水中继续放置 25—30 分钟,然后使瓶内吸收液沿原先注入瓶内时已沾及的瓶底、侧管及侧管至流入瓶底的侧壁区域,来回轻轻荡洗 10 余次,务使瓶内各部位的 $^{14}\text{CO}_2$ 吸收液充分混匀,才能保证准确回收。从瓶内吸取 6 毫升加到放有 5.5 毫升甲苯闪烁液的计数杯内,然后在液体闪烁测定仪上测定。每个测定样品均用内源标准进行淬灭校正。

3. 回收试验

将 ^{14}C -棉酚溶解于甲苯内,每毫升 300 微克。用微量注射器分别吸取 ^{14}C -棉酚 3、6、9 和 12 微克,加到计数杯内,杯内放苯乙胺闪烁液 10 毫升,经内源标准校正后测得的读数分别为 1,983, 4,174, 5,999 和 7,326 dpm。将上述浓度的 ^{14}C -棉酚分别滴加于样品袋内肝组织上,凉干后燃烧,经内源标准校正后测得的读数为 2,043, 4,004, 5,512 和 7,650 dpm,回收率分别为 103, 95.9, 91.8 和 104.4% (图 5)。在放置不同重量的心脏、肝脏或是粪便样品袋内,加入定

表 1 正常生物样品加入 ^{14}C -棉酚经氧瓶燃烧后的回收率

样 品	湿 重 (毫克)	回收率(%) (平均数±标准差)
心 脏	57—74	103.4±5.8
肝 脏	50—60	101.3±1.8
	82—92	98.3±11.7
粪 便	22—32*	96.1±3.3

* 干重

量的 ^{14}C -棉酚,凉干后燃烧,回收率分别为 96.1—103.4 (表 1)。用苯乙胺吸收 $^{14}\text{CO}_2$ 的回收率为 99.6 ± 7.3 (18 次试验)。用乙醇胺的回收率为 95.3 ± 12.2 (10 次试验)。二者均有较好的回收 $^{14}\text{CO}_2$ 能力。

4. 小结

本文介绍的氧瓶燃烧测定法,所需装置取材方便,价廉耐用,工作量小,具有满意的回收率,因此适宜于制备液体闪烁测定的同位素生物样品。经 1 年余的实践,认为有如下优点: (1) 瓶塞上略去加固装置,并不影响量的回收,且能提高实验安全性。在上千次的燃烧试验中,发生过数起燃烧剧烈导致瓶塞冲出,由于没有固定瓶塞,从而避免了爆炸事故。(2) 甲苯不进入燃烧瓶内,可以减轻清洗工作量,且不需配置特殊规格的瓶塞与橡皮侧管。(3) 燃烧篮以镍丝代替铂丝,价廉易得,能耐数百次以上的燃烧。(4) 在氧瓶燃烧过程中,能否迅速达到点火起燃是一关键步骤,在样品篮边挂一小片双层半透膜,使发放的火花通过它的中心部位 (图 4),即能在几秒钟内迅速点火起燃,如若缺乏此条件,则起火往往失败。(5) 样品燃烧完毕后,向瓶内一次注入 $^{14}\text{CO}_2$ 吸收剂,可简化操作。本方法不足之处是计数效率较低,使用 NE 5503 型液体闪烁探头测定的计数效率大多波动在 30% 左右,可能与燃烧过程中产生的另一些物质带来不同程度的淬灭有关,以致计数效率不一,有待进一步改进。

[本文于 1978 年 3 月 13 日收到]

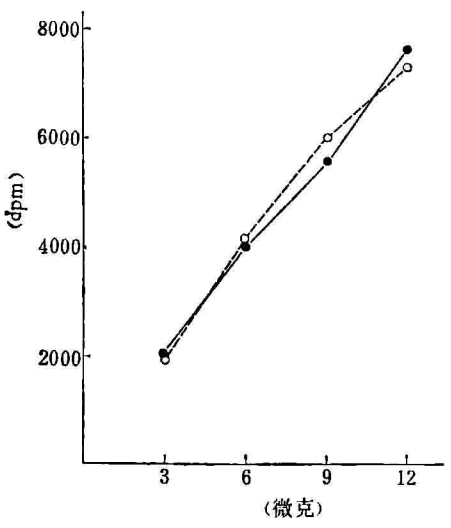


图 5 ^{14}C -棉酚经氧瓶燃烧后的回收

虚线: 未经燃烧直接加到计数杯内测得的读数。
实线: 经燃烧后测得读数。