

SSY-101 色谱扫描仪试制

孙炳荣 韩 琪

(中国科学院上海植物生理研究所)

电泳、色层分离法,在生物化学、分子生物学、临床化学、药理学、食品化学、免疫学等领域中,一直是一个极为有效的分离方法。过去用分光光度计测定洗脱色谱带(柱)上所溶解的洗脱液,来检测色谱带(柱)上的组份及含量。这种方法较烦琐,并带来较大的误差。后来国外许多生化工作者^[1, 2, 3]用现成的分光光度计进行改制,使电泳柱或色层片以一定的速度垂直通过分光光度计出口狭缝射来的光束,从而对电泳柱或色层片上各色谱带扫描。在记录纸上显示扫描结果和各图谱的面积,求出在色谱上各个组份的百分比。近年来,国外有了较先进的专门用于色谱扫描的仪器^[4]。这种仪器的问世,使电泳、色层分离法这一技术的应用更广泛,并为色谱分离法的高速、高精度测定奠定了基础。

本文介绍一台自己设计并试制的单光束积分色谱扫描仪。仪器上的全部元件及组件,都是国内成批生产的。经过一个阶段的使用表明,这仪器能对各种聚丙烯酰胺凝胶电泳及醋酸纤维盐或纸状薄层片进行扫描测定。因而,它可以广泛地应用于生物化学、分子生物学、医学等研究领域。本仪器的色谱带分辨本领优于20微米,重现性优于1%。

仪 器 结 构

SSY-101 色谱扫描仪(下面简称扫描仪)由三部分组成:(1)光度计(包括光源、单色器等),(2)放大器(包括检测器、前置放大器、对数放大器等),(3)显示系统(包括记录仪、电压-频率转换器,即V-f转换器、数字读出器等)。仪

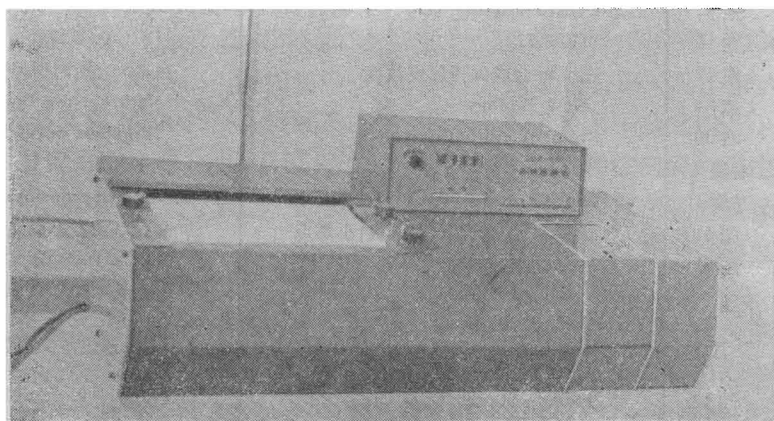


图1 SSY-101 色谱扫描仪外形图

器外形图及方框图示于图1, 2。

下面对扫描仪的三个主要组成部分的结构和性能进行详细分析。

光度计

光度计是扫描仪的重要组成部分,其结构原理示于图3。由光源(钨灯)辐射的连续光谱通过透镜(2)、反射镜(3)进入狭缝(4),再由Littrow型色散系统分光后从狭缝(4)射出的单

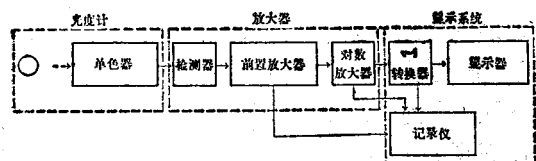


图2 扫描仪结构方框图

色光,经过光楔(7)、聚焦透镜(8)、(9)以及扫描光束狭缝(10)垂直入射到扫描架上的样品。平面反射镜(3)置于准直镜(5)的焦平面上,光楔(7)用于调节光度计的100%透过线及0吸收线。

由这样构成的光度计,波长范围为360—800毫微米,360—600毫微米的波长精度为 ± 3

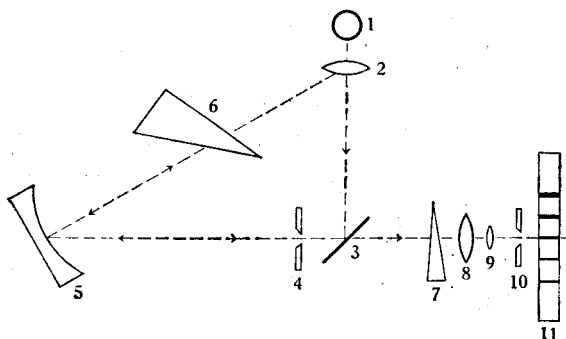


图3 光度计原理图

(1) 钨灯; (2) 透镜; (3) 反射镜; (4) 狭缝; (5) 准直镜; (6) 棱镜; (7) 光楔; (8)、(9) 聚焦透镜; (10) 扫描光束狭缝; (11) 扫描架; (12) 检测器

毫微米, 600—800 毫微米的为 ± 4 毫微米,足以满足色谱扫描分析的需要。

放大器

放大器由检测器、前置放大器(图4)、对数放大器(图5)等组成。检测器光电管 T_1 (GD-7)(光谱响应范围: 350—850 毫微米)将透过扫描样品的光转换成电信号,于是在高阻 R_1 (50M)、 R_2 (500M)(图4)的两端形成电压降,经源极输出器 T_2 (3DJ6)转换后,由晶体管 T_3 (3CG14)进行放大,然后又经

T_5 (3AX81)几乎100%的反馈。由于负反馈较强,因此输出信号较稳定。为了获得较好的温度补偿作用,晶体管 T_4 (3DG6)串在场效应晶体管的下端,这保证了仪器在一般环境中正常使用,同时也避免了过大的“零点”漂移。

如果只要测定扫描样品的透过率,则由前置放大器(图4)的AB两端输出,经适当衰减后,可分别直接送到记录仪及积分器进行显示。如果需要测定扫描样品的光吸收,则把AB两端输出的信号送入对数放大器(图5)后,再分别引入记录仪和积分器进行显示。我们这里采用的对数放大器原理示于图5。图中运算放大器 A_1 (5G23)和对称管 T (5G921)组成有补偿的对数转换线路。转换输出的信号又通过第二只运算放大器适当放大后,可以获得我们所

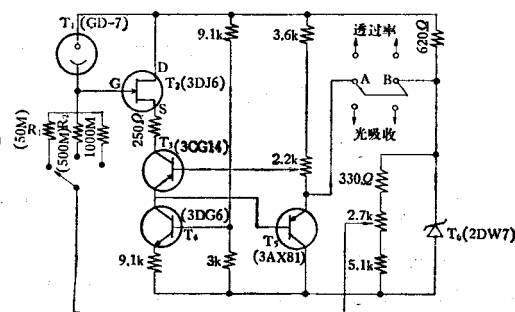


图4 前置放大器原理图

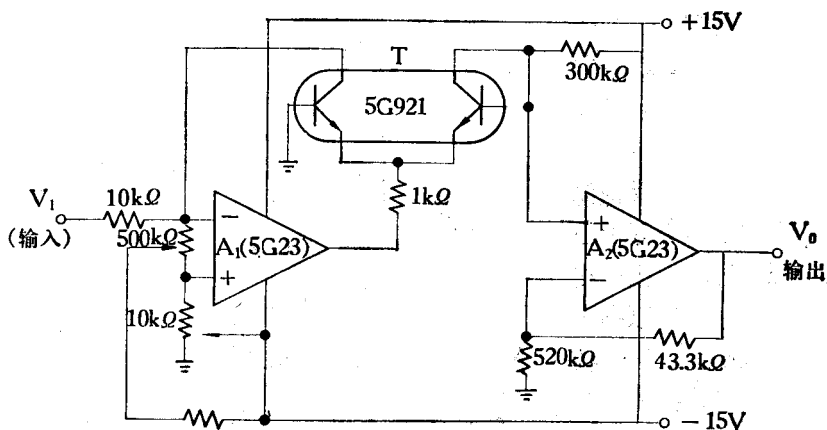


图5 对数放大器原理图

* 电阻依电路调试需要选用

需要的特性。我们设计的对数放大器,在三个数量级范围内,放大器有较理想的线性(见图6)。

显示系统

扫描仪显示系统由记录仪及 V-f 转换器、数字显示器组成。记录仪是用于显示扫描样品的透过或吸收图谱。在本仪器中采用快速（通过标尺全行程小于 0.5 秒）、高灵敏的 KT 型记录仪，量程为 $\times 1$ 、 $\times 2$ 、 $\times 5$ 毫伏。

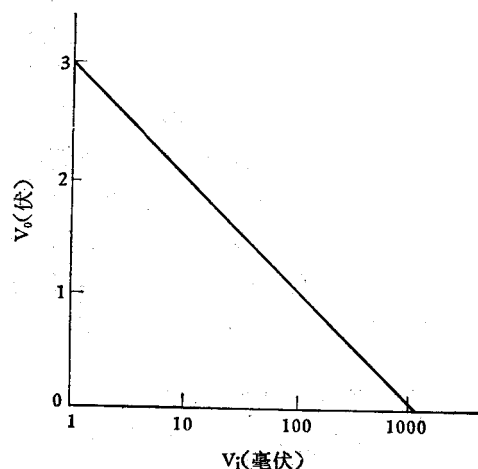


图 6 对数放大器特性图

V-f 转换器 (图 7)^[5] 是用来将前置放大器 (测定应透过率时) 或对数放大器 (测定光吸收时) 输出的信号电平转换成相应的脉冲频率。在图 7 中, T_5 为单结晶体管弛张振荡器, T_4 给 C 充电, 充电电流由 R 上的电压降测定, 并且与差分放大管 T_1 、 T_2 的输入电压相比较, T_3 将它们的差值信号放大后, 通过 T_4 去控制电容充电电流, 这一负反馈保持 R 上的电压降等于输入电压, 这样产生的充电电流, 使输出频率正比于输入电压。这一转换器的性能为: 输入电压: $0 \sim \pm 5$ 伏, 电流负载 5 毫安, 输出频率 $0 \sim 100$ 周, 线性 0.1%, 稳定性 0.01%。

关于积分数字显示

部分, 我们采用 5G657 作为计数触发、5G632 作为八段译码器, 专门配用八段荧光数码管, 将 8421 码表示的十进制数在八段荧光数码管里以 0 到 9 表示出来。为了考虑在仪器配套测定中的重现性, 我们采用五位数字显示。读数清晰, 效果良好。

扫描仪性能测试及其应用举例

扫描仪性能测试

标志扫描仪性能的指标有许多, 这里我们仅对扫描仪的主要两项指标进行测定。

(1) 色谱带分辨本领的测定 用六条不同透过率的红色涤纶膜模拟色谱带制成色卡, 经扫描仪扫描后的图谱示于图 8。从图中可以得出, 当谱带间间隔为 7 微米, 10.6 微米 (图 8 中的图谱 a, b) 时, 两谱带峰分离不清, 当谱带间间隔为 13.3 微米时 (图 8 中 c), 两谱带峰分得较清楚。这说明扫描仪的色谱带分辨本领的低限在 13.3 微米左右。

(2) 百分组份重现性测定 我们采用同一牛血清白蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳样品重复测定三次的重现性来表示。测定结果列于表 1 及图 9 中。

由表 1 可看出, 扫描仪百分组份的重现性优于 1%。

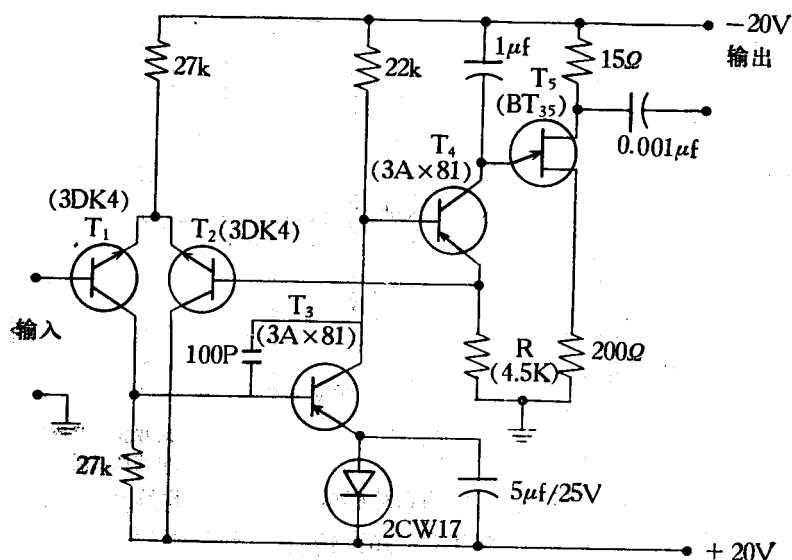


图 7 V-f 转换器原理图

表 1 百分组份测定的重现性*

色 谱 带 位 置	重 复 次 数 百 分 值 及 百 分 组 份	1		2		3		误 差
		积分读数	百分组份 (%)	积分读数	百分组份 (%)	积分读数	百分组份 (%)	
I		451	66.5	460	66.9	458	66.8	±0.3
II		178	26.3	177	25.7	177	25.8	±0.3
III		45	6.63	47	6.88	45	6.57	±0.3
IV		4	0.58	4	0.59	5	0.73	±0.1

* 在 7.5% 凝胶电泳上 20 微克牛血清白蛋白的样品,扫描波长: 580 毫微米,扫描速度: 10 毫米/分

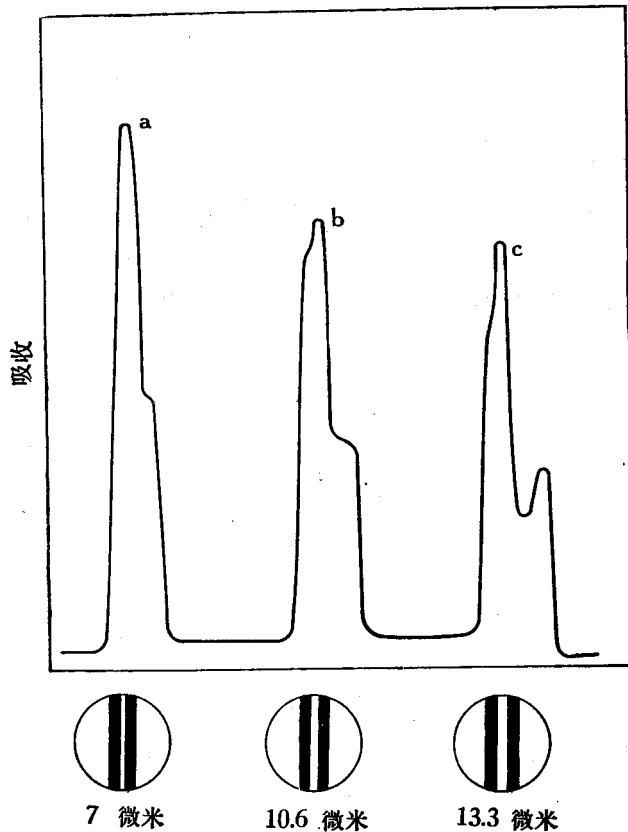


图 8 色谱带分辨本领测定

上图: 扫描图谱; 下图涤纶膜色卡(示意图)

色谱带的间隔测定方法: 用 0—25 毫米的外径千分尺测定头发的外径, 然后用生物显微镜(上光厂)观察头发及涤纶膜色卡间隔在目尺上的读数, 两者一比就求得涤纶膜色卡的间隔。如: 头发用千分尺测得直径为 40 微米, 在显微镜(放大 40 倍)下观察, 目尺的读数为 3 毫米, 而 b 吸收峰对应的涤纶色卡的间隔在同台显微镜的同一放大倍数下观察, 目尺的读数为 0.8 毫米, 则涤纶色卡的间隔 = $40 \text{ 微米} \times (0.8/3) = 10.6 \text{ 微米}$

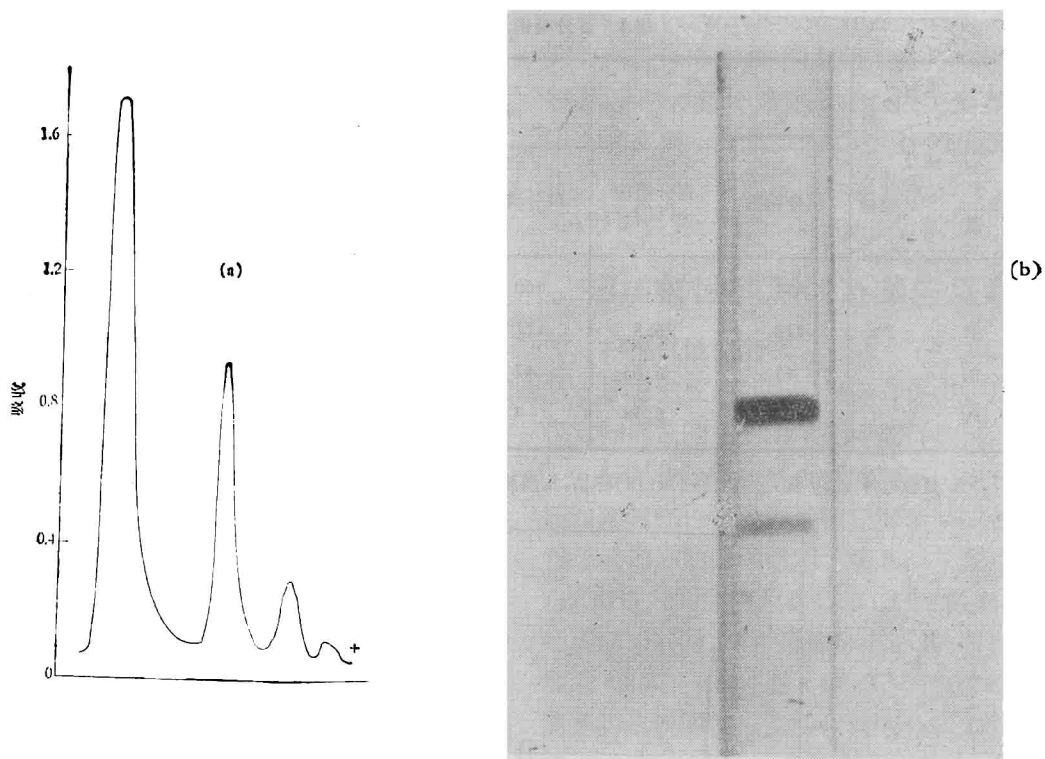


图9 在7.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳上20微克牛血清白蛋白扫描图谱及其电泳照片
(a) 扫描图谱; (b) 凝胶柱照片。扫描波长: 58 毫微米, 扫描速度: 10 毫米/分

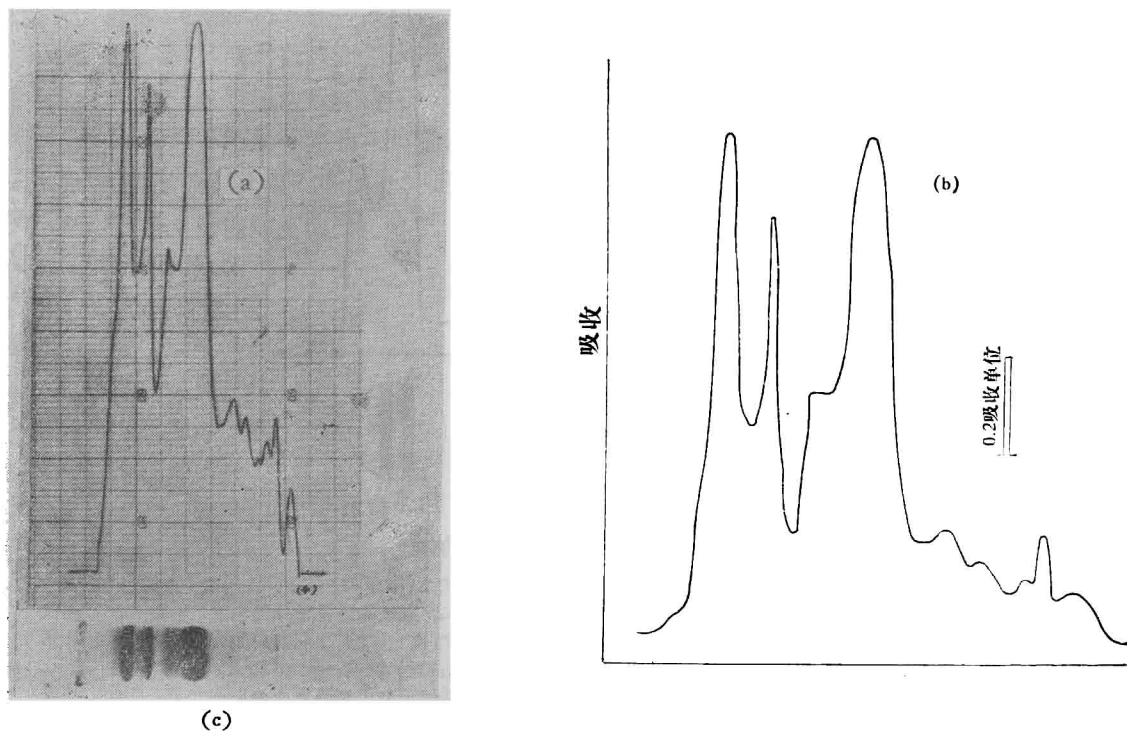


图10 在6.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳上0.1毫克固氮酶钼铁蛋白制备物分离的扫描图及电泳照片
(a) 是直接用电泳柱扫描的图谱; (b) 是将正片(c)扫描后得的图谱;
(c) 是电泳照片。扫描波长: 580 毫微米, 扫描速度: 10 毫米/分

应用举例

经过一阶段的反复使用证明,扫描仪不仅能对聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳、毛细电泳以及醋酸纤维、纸状薄层等进行扫描,并且还能对上述各样品的照相正负片进行同样的扫描,两者效果基本相同,下面举几个例子。

例一、图 10(a) 是在 6.5% 聚丙烯酰胺凝

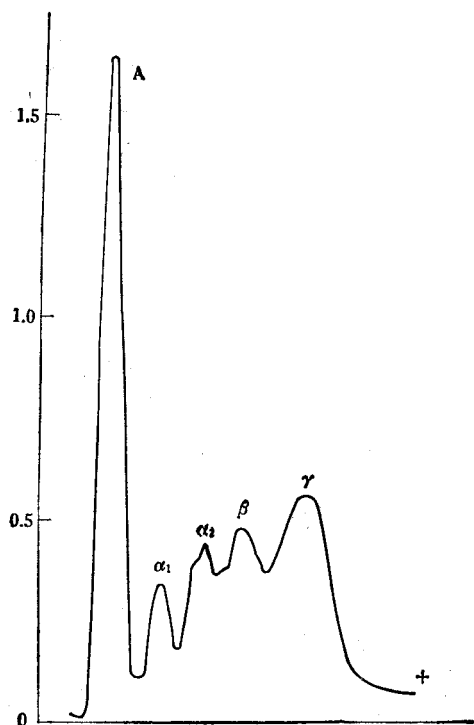


图 11 在醋酸纤维薄层上肝炎病人血清组份分离后的扫描图谱

扫描波长: 495 毫微米, 扫描速度: 10 毫米/分

胶电泳柱上, 0.1 毫克固氮酶钼铁蛋白制备物分离的扫描图谱。在电泳柱(图 10(c))上四个主要色带反映在扫描图谱上是四个吸收峰。通过积分峰下的总面积, 求出各组份的百分比分别为 22.8%, 12.4%, 12.0%, 39.0%。

例二, 图 11 是在醋酸纤维薄层上肝炎病人血清中各组份分离后的扫描图谱。血清中的五种组份在图谱上反映出五个吸收峰, 经过积分峰下的总面积后, 计算得各组份的百分比分别为 50.5%, 3.8%, 9.6%, 9.6%, 26.6%。

例三, 图 10(b) 是用例一样品正片(即色谱图的照片, 见图 10 中的 (c)) 进行扫描后的图谱。如果将 (b) 与 (a) 进行比较, 不难看出它们相互是对应的。

结 束 语

实践使用表明, 这里介绍的扫描仪, 某些主要指标(如色谱带分辨本领、重现性), 赶上了国外同类仪器的水平。但仪器的整机结构及自动化等方面还存在些问题。在此我们诚恳地希望有关工作者提出宝贵的意见, 以便进一步提高。

参 考 文 献

- [1] Dravio A. R. et al.: *J. Chromatog.*, 41, 53, 1969.
- [2] Taber A. W. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 600, 1964.
- [3] Loening U. El.: *Biochem. J.*, 102, 251, 1967.
- [4] 藤原镇男等著: 《生物分析化学演习》。
- [5] Voelkey W. H.: *Electronics*, 37, 73, 1964.

[本文于 1978 年 4 月 6 日收到]

微 电 泳 用 恒 流 电 路

陈 俊 强 朱 培 阁

(中国科学院上海生理研究所)

通过尖端直径小于 1 微米的微管, 把极少量的化学物质注在细胞极小的某一区域内, 以研究细胞对各种化学物质的反应, 这是细胞生物学和神经生物学常用的研究手段。虽然可用

加压的方法, 从微管中推出化学物质, 但它有一些缺点, 例如容易造成细胞损伤, 化学物质从微管尖端向外自由扩散难以克服, 注入物质的量和时间不易精确控制等。而用电流来控制化学