

核酸蛋白检测仪

——用于液相色谱中的一种紫外测定装置

章蔚娟 于德源 陈根新 刘爱琴

(中国科学院上海生物化学研究所)

我所试制的核酸蛋白检测仪系液相色谱中的一种紫外检测装置,在生物化学、有机化学、药理学研究中经常使用,也可在临近工业流程处做监控分析用。仪器配上层析柱、恒流泵、自动收集器及梯度仪等即组成一完整的液相色谱分离分析装置。

本检测仪通常用来测量柱层析洗脱液中样品含有的核酸或蛋白浓度的变化。HD-73-3 型核酸蛋白检测仪由核酸检测器和蛋白检测器两部分组成,可单独使用一只,也可将两者串联使用,即将洗脱液先后分别流经两部分,于是记录仪可单独绘出或同时分别记录出同一样品在 260 毫微米和 280 毫微米两个波长处的透光度,后者对测定样品中是否含有核酸或蛋白是有用的。本检测仪如配上阻抗变换装置,可进行量程扩展,以提高检测灵敏度。如记录仪使用对数记录纸,则可直接示出光密度值。

工作原理

本检测仪工作原理的根据是光吸收定律。其原理方框图见图 1。光源发出的光束经过透紫黑玻璃或称黑色滤光片和滤色液使光源的光束中仅含 253.7 毫微米或 279.4 毫微米的单色光,单色光通过样品池射到光电倍增管的阴极窗口上,因样品吸收而引起的光能的变化,通过光电倍增管而转换成电能的变化,此变化输入记录仪,从而在记录纸上绘出光吸收图谱。

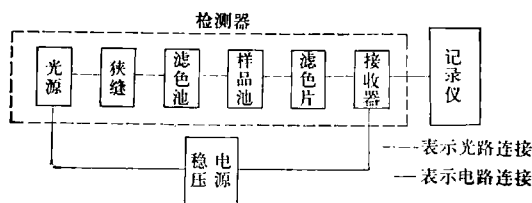


图 1 核酸蛋白检测仪原理方框图

仪器由紫外检测器、电源和记录仪三部分组成。左为核酸检测器,右为蛋白检测器,均由光源、滤色器、样品池和光电倍增管组成。两检测器上都有聚乙烯管的样品进口和出口及调节光量旋钮。光源分别由低压汞

灯(主要提供 253.7 毫微米谱线)和空芯阴极灯——锰灯(主要提供 279.4 毫微米谱线)组成。滤色器由透紫黑玻璃和滤色液组成。汞灯和锰灯发出的光束中除 253.7 毫微米和 279.4 毫微米谱线外,尚含有其它波长的谱线,为保证仪器的单色性,必须滤去其余谱线。透紫黑玻璃把 400 毫微米以上的可见光滤去,滤色液把紫外光部分非主谱线滤去。图 2 图 3 示出了自配的 260 毫微米和 280 毫微米滤色液与进口的相应的紫外干涉滤光片在英国 Unicam sp-1800 分光光度计上作波长扫描(波长从 200—380 毫微米)所绘出的光吸

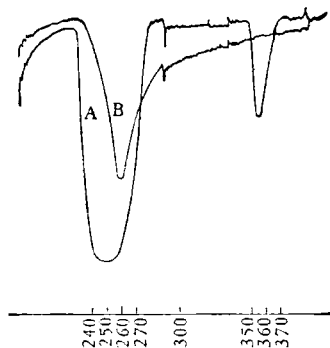


图 2 自配 260 毫微米滤色液(A)与进口干涉滤光片(B)光吸收图谱对照

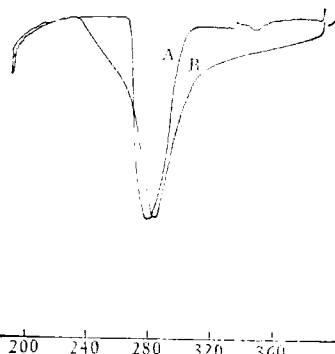


图 3 自配 280 毫微米滤色液(A)与进口干涉滤光片(B)光吸收图谱对照

收图谱(量程为0—2光密度满刻度)。从图3中看出260毫微米滤色液在波长355毫微米处光吸收较小,有一透过峰,然而由于低压汞灯发出的是离散光谱,在此波长处无谱线发出,故不影响仪器的单色性。我们把灯源加上相应的滤色液和透紫黑玻璃在分光光度计上进行单色性测试,表明除253.7毫微米和279.4毫微米谱线通过外,无其它谱线通过。测试结果见图4。

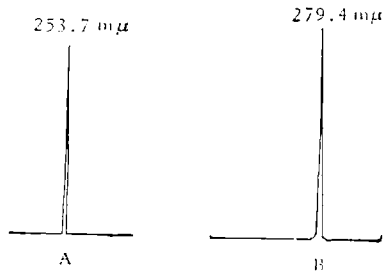


图4 仪器单色性的测试结果
A—Hg灯 B—Mn灯

电源由两套相同的稳定性良好的直流稳压电源组成,原理见线路图5。保证检测仪性能除单色性外,需要仪器长期稳定。用一般液相色谱仪分离分析,特别是制备样品,时间常达几小时甚至几十小时,因此要求输入记录仪的信号能长期保持稳定。这除要求灯源性能稳定和光电倍增管具有小的暗电流外,主要要求电源必须稳定。为使电源稳定,在低压电源部分采取了如下措施:(1)辅助电源采用两级稳压管稳压,并以具有温度补偿的2DW7C作最后一级稳压管。(2)主电源部分为提高温度稳定性,放大器采用差动放大,并用对管S3DG6作放大管。放大器的基准电压用两只2DW7C串联,以提高取样比;为提高放大器的放大倍数,用DZ₃、R₂、R₃BG₄组成的恒流源作为放大器BG₃的集电极负载,提高了放大器的动态阻抗。(3)调整管采用BG₁、BG₂、BG₃组成的复合管,提高电流放大倍数,

使输入BG₁几微安的基极电流能使BG₁输出电流在300毫安以上。而BG₃的集电极电流,设计在0.6毫安左右,这样由于外电源电压变化及负载的变化所引起的输入BG₁基极电流的变化,对BG₁工作点影响不大。(4)复合调整管BG₂、BG₃的集电极不与BG₁集电极相连,而直接接到辅助电源的输出端,使BG₂、BG₃的集电极电压稳定,从而使BG₂、BG₃输出到BG₁的基极电流只因BG₃的集电极电压变动而变化,从而提高了电源的稳定性。采取以上措施及选择合适的工作点,并使BG₂、BG₃、BG₄、BG₅、BG₆的电流放大倍数 $B \geq 60$,BG₁的 $\beta \geq 30$,此电源的电压稳定系数能做到小于 10^{-4} ,内阻小于0.01欧姆。光电倍增管所需的高压是由稳压电源输出的低压(24伏左右)经BG₆、BG₇组成的推挽式直流变换器加上整流滤波电路而获得的。本仪器高压调准在760伏左右,若需改变,可调节取样电位器VR,由于高压电源没有采用高压负反馈电路,故电源内阻较大,但因负载是固定的,其稳定性能满足要求。GP 2Hg 低压汞灯激发电压需600伏以上,因此直接用光电倍增管高压激发,通过串接一限流电阻,使汞灯电流调节在3—4毫安。锰灯激发电压360伏左右,用另一组高压线圈输出400伏直流电压,串接一限流电阻使锰灯电流调节在7—9毫安。这样,一组电源就同时解决了光电倍增管和灯源的供电。

记录用XWD-200型双笔记录仪,量程为0—10毫伏,未加对数变换器,故光电倍增管输出的电流直接通过-2K负载电阻接到记录仪输入端,调节光量大小使层析柱无样品加入时,记录仪指针达到10毫伏(即透光度100%,相当于分光光度计上作空白对照)。如需提高检测灵敏度,可在光电倍增管输出端接一阻抗变换器,以扩展量程,一般灵敏度可提高3—4倍,阻抗变换器原理线路图见图6,但加上阻抗变换器后,其噪音及漂移相应加大,且场效应管BG₁、BG₄需严格挑选配对及选择零温度系数工作点,否则,不扩大量程时,

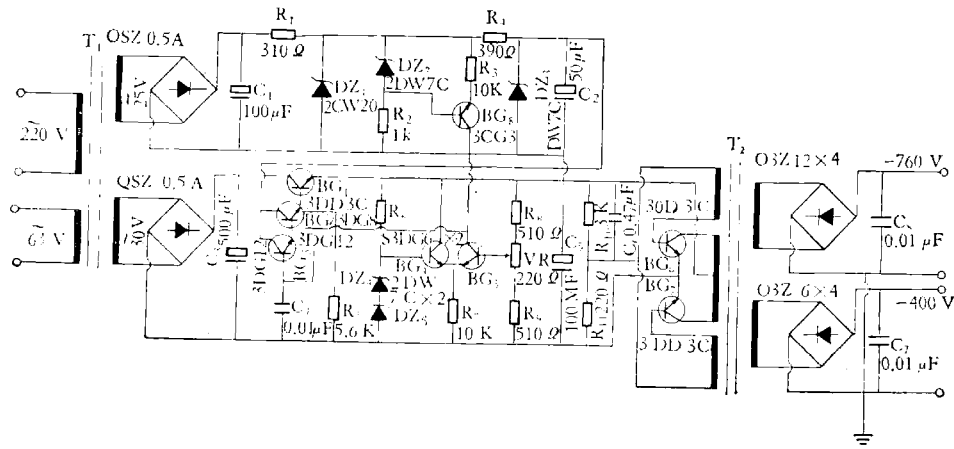


图5 HD-73-3型稳压电源线路图

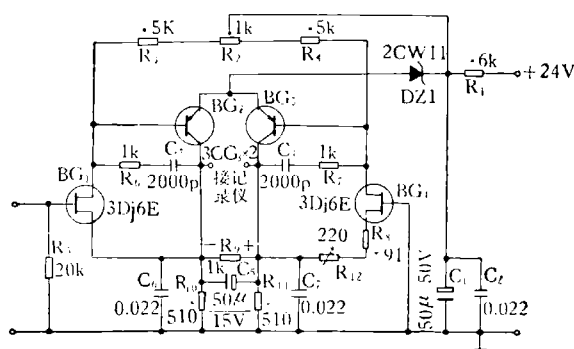


图 6 HD-73-3 型阻抗变换器原理线路图

其漂移也比未加阻抗变换器时大。

仪器技术特性

1. 工作波长: 253.7 毫微米, 279.4 毫微米
2. 检测灵敏度: 0.03OD (光密度)
3. 基线漂移: 8 小时漂移小于 5%
4. 噪声: 小于 $\pm 1\%$
5. 工作时间: 可连续工作 24 小时以上
6. 流式样品池容积为 200 微升。

流式样品池容积比分光光度计普通样品池容积(3 毫升)小, 但由于采用垂直流式样品池, 故光程比分光光度计上普通样品池光程小, 前者为 3 毫米左右, 后者为 10 毫米。根据光吸收定律:

$$A = \lg \frac{1}{T} = \epsilon Cl$$

其中 A 为光密度或称吸收率, T 为透光度或称透射比, ϵ 为克分子消光系数, C 为样品浓度, 单位: 克分子/升, l 为光程, 单位: 厘米。当 $l = 1$ 厘米时, $A = \epsilon C$, 当 $l = 0.3$ 厘米时, $A = 0.3\epsilon C$, 所以同一样品在检测仪上光密度读数要比分光光度计上低 3 倍左右, 故该仪器检测灵敏度较低, 但样品浓度可测到 60.0 左右, 仪器线性良好, 因不用阻抗变换器时, 其线性完全由光电倍增管线性决定。仪器预热时间较长, 一般需开机半小时到一小时, 基线才能平直稳定, 个别情况要 2 小时以上, 视灯的质量而定。

使用 情 况

我所 1973 年研制成第一台核酸检测仪, 1975 年鉴定后, 至 1979 年已试制生产了四种型号近 30 台, 供应所内外。1979 年试制了 HD-73-4 型, 4 型将核酸检测和蛋白检测分为两个独立单元, 体积减小, 并加了电磁阀, 使有样品时, 流出液用部分收集器收集, 无样品时, 流出液进入废液缸。记录仪采用带有电定接点的 XDW-102 型单笔记。

为了与国外同类仪器性能进行比较, 曾把同一样品先后流经瑞典 LKB 公司生产的 UVI CORD (检测波

长为 253.7 毫微米) 和自己试制的核酸检测仪。从两台记录仪上分别绘出光吸收图谱 (图 7), 可看出图谱形状完全相同, 仅峰宽不一样。这是因为 UVI CORD 记录仪走纸速度为 2 厘米/小时, 我们记录仪为 3 厘米/小时。同时, 由于样品池直径不一样 (即光程不一样), 峰高不同。

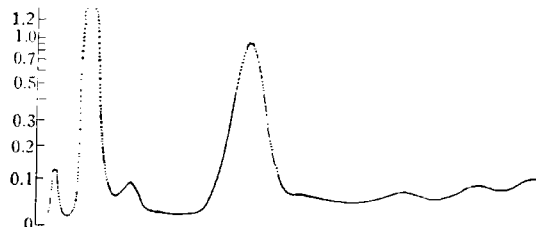


图 7 (上)

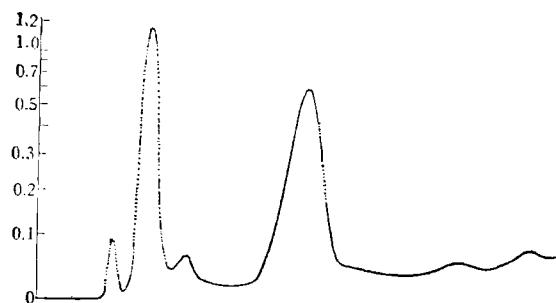


图 7 (下)

图 7 用 LKB 产 UVI CORD (上) 和自制核酸检测仪 (下) 所测同一样品图谱的比较, 图 8 是三核苷酸 U_p 、 C_p 、 C 酶解后, 上柱, 分别用水、0.005N 的 HCl 和 0.05N 的 HCl 洗脱, 在 HD-73-3 型核酸蛋白检测仪上得到的三个组成图谱, 图中深色线所绘出的是在波长

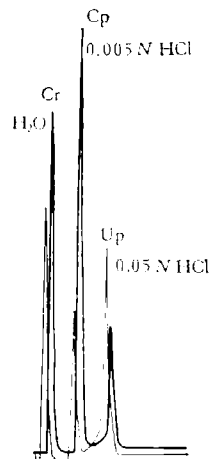


图 8 用 HD-73-3 型核酸蛋白检测仪所测得的 U_p 、 C_p 、 C 酶解组成图

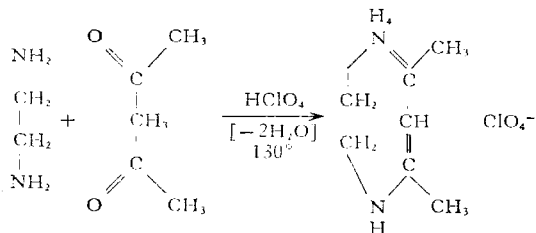
C——胞苷 C_p ——胞苷酸 U_p ——尿苷酸

279.4 毫微米处的吸收峰, 浅色线是波长 253.7 毫微米处的吸收峰。

附录: 260 毫微米和 280 毫微米 滤色液原料的合成及配制

一、(2,7)-二甲基-二氮-(3,6)-环庚二烯-(1,6) 过氯酸盐的制备。

反应式:

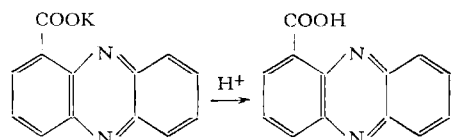
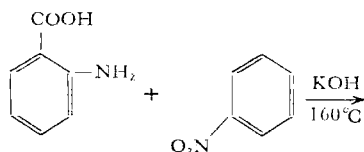


在配有冷凝管梨形瓶(500 毫升)中加入 10 毫升干燥的乙二胺、于冰水浴中加入 10 毫升乙酰丙酮。摇匀后折去冰浴, 加热至 130℃, 维持半小时, 并不时振摇。在温度 120—140℃ 减压抽去未反应原料, 放冷, 并于冰水浴中加入 20 毫升 70% 过氯酸。摇匀后加水约 50 毫升, 使溶解。放入冰箱, 有结晶析出。滤出结晶约 8 克。熔点 120—130℃。溶于热水, 加活性炭, 过滤, 滤液放冰箱, 得结晶产物 5 克, 熔点: 140—140.5℃。

参考文献: Helv. 23, 1144 (1940)

二、吩嗪-1-羧酸的制备

反应式:



25 克邻氨基苯甲酸、25 克新蒸的硝基苯及 100 克 KOH 在通风橱内用研钵研成糊状, 放入 500 毫升圆底烧瓶, 配以回流冷凝管。油浴加热至 145℃ 时, 逐步融化成黑色浆状物。油浴升温至 160℃, 并继续加热, 保持在 160℃, 30 分钟。冷却至 100℃ 时, 通入快速蒸气蒸馏, 以除去挥发性杂质及未反应的硝基苯(约需 2 小时)。水溶液冷却, 滤出沉淀下的钾盐, 并在漏斗上以甲醇洗多次, 至沉淀呈黄绿色。将该沉淀溶于少量水, 滤去不溶物, 清液以 N-HCl 酸化得淡黄绿色沉淀。此沉淀以甲醇加活性炭加热溶解, 滤去活性炭, 滤液放置得结晶产物。反复用甲醇重结晶两次, 得淡金黄色针状结晶, 1.60 克, 熔点: 242—244℃。

参考文献: U. S. 3, 367, 765 (Cl 71—67)

三、滤色液的配制:

1. 260 毫微米滤色液的配制

按每毫升含 $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.58 克和 (2,7)-二甲基-二氮-(3,6)-环庚二烯 (1,6) 过氯酸盐 0.25 毫克配制即成。

2. 280 毫微米滤色液的配制

把每毫升含吩嗪-1-羧酸 0.15 毫克的溶液以 1:1 的比例与所配制的 260 毫微米滤色液混和即成。吩嗪-1-羧酸不易溶于水, 可加几滴 1N 的 NaOH, 使溶液 pH 呈中性即可。

(2,7)-二甲基-二氮-(3,6)-环庚二烯 (1,6) 过氯酸盐及吩嗪-1-羧酸, 系由我所钏经义同志帮助合成。特此致谢。

[本文于 1979 年 3 月 27 日收到]

FM-1 型冰点渗透压计

忻伟钧 戴稼禾 梁子钧

(上海第一医学院生物物理教研组)

渗透压是维持人体内环境相对稳定的重要因素之一。在临床医学实践中, 了解它有极重要的意义。

渗透压的测定方法, 大体可分为半透膜直接测定和非半透膜间接测定两大类。基于体液中含有的渗透压活性溶质, 具有不同的分子量, 从而难以选择一种适当孔径的半透膜进行直接测定。因此, 目前除大分子

即胶体渗透压采用半透膜测定外, 测定体液总的渗透压, 仍采用非半透膜的间接方法, 即蒸汽压降低法, 沸点升高法和冰点下降法。其中, 由于冰点下降法简便易行, 精确度较高, 且无不良作用, 更适用于生物样品测定, 从而得到较普遍的应用。为了满足国内医学基础理论和临床研究需要, 我们研制出了数字式 FM-1