

固相闪烁晶体用于液闪测量的评价

宋兰芝 侯桂珍

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

提 要

本文介绍两种固相闪烁晶体制样及测量方法并与乳化剂闪烁液相比较。 ^3H , ^{14}C , ^{125}I 及 ^{35}S 其计数效率($E\%$)分别达 34.1%, 89.9%, 60.3% 及 77.4%。液相及两种固相闪烁体间的变异系数($CV\%$)范围为 5.1%—10.3%, 同系列样品对不同厂家型号的液闪谱仪, 测量效率趋一致。其测量效率、精确度、平行度等近于或优于液相测量。对数波谱分析表明无需淬灭校正并可用于双标记测量。用固相闪烁体制样不需闪烁液, 故无毒、无污染、污物体积小且使用方便, 克服了液体闪烁测量的不足。因此是较理想的可推广的新型样品制备与测量技术。

关键词 固相闪烁晶体, 闪烁滤片, 闪烁小杯

前 言

液体闪烁测量技术已在生物学、医药学、农业、核能、环境、天文、地质、考古、石油探矿等学科领域发挥着重要作用。估计全世界约有数万台液体闪烁谱仪在工作, 每年耗费达二三百毫升闪烁液, 测量样品二三亿个^[1]。这些闪烁液与放射性样品构成了庞大的放射性污染物, 而放射性废液处理又极为困难, 消耗了人力、物力, 又造成了环境的污染。

各国科学工作者都期望克服液体闪烁测量的缺点, 试图创造出节约闪烁液, 使用方便, 少放射性污染的液闪测量制样技术。近年贝克曼公司提供了全新的固相闪烁晶体(solid scintillators)制样技术、闪烁滤片(ready filter, F)和闪烁小杯(ready cap, C)^[2,3], 并已在很多研究工作中应用, 都得到较满意的结果^[4], 如基因调控方面, 氯霉素乙酰转移酶报道基因的表达^[5]; 类胡萝卜素的代谢研究^[6]; 胸腺嘧啶核苷的参入^[7,8]; 红细胞的定量放射免疫分析^[9]; LT B₄ 拮抗物的受体结合分析^[10]; 聚丙烯酰胺

凝胶上标记蛋白质分析^[11]等。目前国内有如塑料闪烁薄膜^[12]; 闪烁液涂布测量瓶内壁; 滤膜或纸片浸泡闪烁液等固相制样方法的研究, 但还未被广泛应用。

本文对贝克曼公司提供的两种新的固相闪烁晶体进行了评价, 在用于 ^3H , ^{14}C , ^{125}I 和 ^{35}S 核素的测量时与通用的乳化剂液相闪烁测量做了对比, 另外在不同厂家及不同型号的液体闪烁谱仪上测量的计数效率也进行了比较。

材 料 和 方 法

一、核素与标准物

1. ^3H (甲基)-胸腺嘧啶核苷, 25Ci/mmol, 中国科学院上海原子核研究所。

2. ^{14}C -尿嘧啶核苷, 53mCi/mmol, 中国科学院放射医学研究所。

3. ^{125}I -胰岛素, Kit, 海军放免技术中心。

4. $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 水溶液, 10mCi/ml, 中国原子能科学研究院。

5. ^3H 标准源, ^3H -W standards, LKB, Wallac.

6. ^{14}C 标准源 ^{14}C -W standards, LKB, Wallac.

7. ^{125}I 标准源, Amersham.

二、闪烁体

1. 乳化剂闪烁液 (L): PPO(0.4%)-POPOP(0.03%)-甲苯闪烁液: Triton X-100(2:1).

2. 固相闪烁晶体: 闪烁滤片 (F), 闪烁小杯 (C), 由贝克曼公司提供.

三、液体闪烁谱仪

1. Beckman LS-9800, 测量道宽 0—1000.

2. $^{\circ}\text{LKB}$, Wallac LSC-81000, 道宽 0—2000.

3. Packard 4000, 道宽 0—1700.

4. Beckman DP-5500 γ -测量仪, ^{125}I 道.

四、方法

1. ^3H 与 ^{14}C 固体标准源, 直接置入 5ml 闪烁液中, 再加入 100 μl 重蒸水.

2. 经过温育培养, ^3H (甲基)-胸腺嘧啶核苷参入小鼠肝细胞 DNA 分子, 用高氯酸处理组织, 提取液用无菌重蒸水作逐级倍比稀释, 各取样品 100 μl , 分别置入 L、F、C 三种闪烁测量体系中.

(1) 乳化剂闪烁液 5ml, 加入 100 μl 样品后充分混合, 静置待测.

(2) 闪烁滤片经缓冲液充分浸泡后, 滴加 100 μl 样品, 红外灯下保持 50 $^{\circ}\text{C}$ 充分烘干或自然风干, 置塑料测量瓶内待测.

(3) 100 μl 样品直接加入闪烁小杯中, 烘干方法同(2).

3. ^{14}C -尿嘧啶核苷参入小鼠肝细胞 RNA 分子(方法同 2).

4. 放射免疫分析测定胰岛素与细胞膜上受体的结合. 经 25% PEG 沉淀后, 取上清液(游离部分) 100 μl 分别滴加在闪烁滤片及闪烁小杯中烘干待用. 沉淀(结合部分)置测量管中于 Beckman DP-5500 γ -测量仪上进行 γ -测量, DPM 标定用 ^{125}I 标准源.

5. $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 用重蒸水稀释, 取 100 μl 分别加入三种闪烁体系中.

五、各种样品计数效率 ($E\%$) 的计算(不经淬灭校正)

1. ^3H 和 ^{14}C 标准源分别在乳化剂闪烁液中用不同厂家生产的液闪谱仪上测定 CPM, 再从公式

$$E\% = \frac{\text{CPM}}{\text{DPM}} \times 100\%$$

求得 $E\%$ (源). ^3H 标准源 DPM 经半衰期校正.

2. 从得到的 $E\%$ (源) 和各样品液相测量的 CPM, 计算 DPM(L).

3. 以 DPM(L) 为基准和液、固相闪烁体系测量到的 CPM, 计算: $E\%$ (L) (乳化剂液相, 液闪测量), $E\%$ (F) (闪烁滤片, 液闪测量), $E\%$ (C) (闪烁小杯, 液闪测量).

4. 以 ^{125}I 标准源于 γ -测量仪上测得的效率 $E\%$ (^{125}I), 计算出 ^{125}I -胰岛素结合部分样品的 DPM, 以此为基准计算各种样品在 γ -测量仪及液闪谱仪上的效率: $E\%$ (B- γ) (结合部分, γ -测量), $E\%$ (C- γ) (闪烁小杯, γ -测量), $E\%$ (F), $E\%$ (C).

六、变异系数 ($CV\%$) 的计算

根据公式:

$$CV\% = \frac{Sx}{\bar{X}}$$

$\bar{X}$: 当样品数 = n 时, CPM 或 $E\%$ 的平均值.

Sx : 当样品数 = n 时, CPM 或 $E\%$ 的标准偏差.

结果与讨论

一、固相闪烁晶体测量与乳化剂液相闪烁体测量比较

某种核素的放射性样品采用不同的闪烁体制样方法, 在同一台仪器上测量得到的计数效率 ($E\%$) 能直接地反映出各种闪烁体系对能量转换率的水平, 因此当排除淬灭因素外, $E\%$ 值与闪烁体系的光子产额呈正相关. 表 1 的结果是在 Beckman LS-9800 液闪谱仪测量的计数效率, 表明除闪烁滤片用于 ^3H 测量 $E\%$ 比

表1 计数效率 (E%)

核素 闪烁体	^3H	^{14}C	^{125}I	^{35}S
闪烁液	32.3	87.6	57.8	77.9
闪烁滤片	2.0	22.3	25.5	42.0
闪烁小杯	34.1	89.9	60.3	77.4

较低外,两种固相闪烁体皆可用于 ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{35}S 及相当能量的核素放射性测量。而且与液相的乳化剂闪烁体系比较(表2) 闪烁小杯的效率百分比 (C/L%) 皆近于100%,即闪烁小杯在一定范围内可替代用闪烁液体体系的均相或乳状液测量,尤其适用于稍大量(小于200 μl)的水溶性样品的测量。闪烁滤片的相对效率百分

表2 固相对液相闪烁效率百分比(%)

核素	^3H	^{14}C	^{125}I	^{35}S
F/L (%)	6	25	44	54
C/L (%)	106	103	105	100

L: 液相闪烁体, F: 闪烁滤片, C: 闪烁小杯

比虽不甚高,但用于细胞,大分子及放射免疫结合分析,能将通常需分离及测量两步骤完成的工作,只需一步即可完成。在相对测量中仍然适用。

二、同一系列样品在不同厂家与不同型号的仪器上测量的计数效率比较

从表3可见,每种闪烁体在不同的仪器上

表3 各种闪烁体在不同型号仪器测定计数效率

E%, (F/L C/L)		仪器		Beckman		Beckman		LKB-Wallac		Packard	
制样方式				DP-5500		LS-9800		LSC-81000		4000	
^3H	液相 (L)					32.3	100	32.3	100	31.5	100
	闪烁滤片 (F)					2.0	6	2.2	9	1.9	6
	闪烁小杯 (C)					34.1	106	33.9	105	30.5	97
	醋酸纤维素膜					21.0	65				
^{14}C	液相 (L)					87.6	100	84.3	100	88.6	100
	闪烁滤片 (F)					22.3	25	21.6	26	20.9	24
	闪烁小杯 (C)					89.9	103	82.7	98	80.8	91
^{125}I	液相 (L)			57.8	100	57.8	100	57.8	100	57.8	100
	闪烁滤片 (F)					25.5	44	22.9	40	25.5	44
	闪烁小杯 (C)			57.8	100	60.3	105	59.6	103	57.1	99

的E%极接近。仅以 ^{14}C 为例,其乳化剂液相、闪烁滤片及闪烁小杯在几种仪器上测量,计算它们的平均变异系数(CV%)分别为2.6%,3.2%及5.6%,即在各仪器间测量结果趋势一致。

Beckman LS-6000 型液闪谱仪设有特殊的符合门电路时间 (electronic gate time) 及窗宽设置 (window settings), 能全部吸收来自固相闪烁体较强的及长寿命的光子, 使测量窗能自动选择最佳条件, 因此与普通型仪器比较, 对液相测量其效率没有变化(54%), 而固相闪烁体测量, 其效率可由35%提高到54%^[4]。若与 Beckman LS-6000 型液闪谱仪测量的计

表4 贝克曼 LS-6000 型液闪计数效率

核素	闪烁小杯 (E%)	闪烁滤片 (E%)
^3H	>30	>20
^{14}C	80—90	70—90
^{125}I	75—85	50—70
^{32}P	90—100	70—95
^{241}Am	95—100	

数效率比较(表4)^[2], 在普通仪器上闪烁滤片效率不低于 LS-6000 型的20—30%; 闪烁小杯不低于其10%为“可用”条件。我们的测量结果表明, 在无特殊门电路校正的仪器上, 两种固相闪烁晶体都是适用的。

三、精确度检验

当排除操作误差后，精确度主要是检验闪烁体本身的质量。获得的稀释度曲线(图 1) 呈

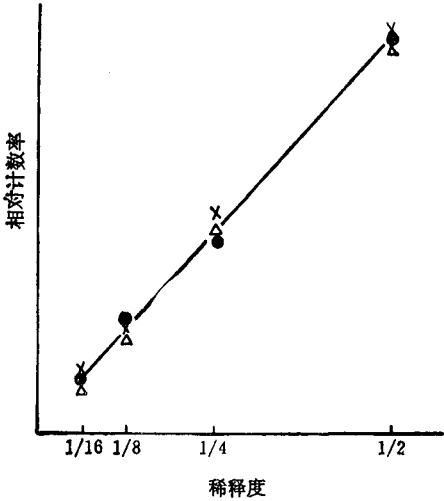


图 1 ³H-胸腺嘧啶核苷参人的稀释度曲线
●液相 ×闪烁滤片 △闪烁小杯

直线形；结合度曲线(图 2) 为典型的抛物线形。如以液相的曲线为基准，闪烁滤片与闪烁小杯曲线各点的波动最大只有 5% 的偏离，而且变化趋势是一致的。从乳化剂及两种固相闪烁体间的变异系数(CV%：³H, ¹⁴C, ¹²⁵I 分别为 2.8%，1.1%，4.2%) 皆小于 5% 可以看出，固相闪烁晶体在进行相对测量中可替代液相闪烁体。

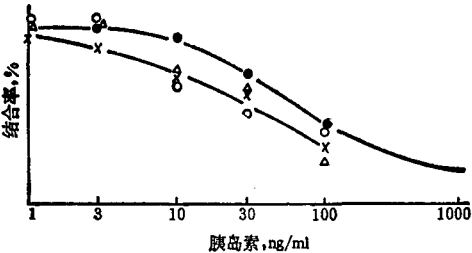


图 2 ¹²⁵I-胰岛素与膜受体结合度曲线
●液相, γ-测量 ×闪烁小杯, γ-测量 △闪烁小杯, 液闪测量 ○闪烁滤片, 液闪测量

四、平行度检验

闪烁滤片及闪烁小杯作为新的液闪测量制样技术用于低能 β-辐射的超微量测量, 产品的平行度极为重要。我们用变异系数 CV% ≤

10% 作为检验平行度的标准。从表 5 可见, 当平行样品数 $n = 5$ 时, 除个别样品外, CV% 大多小于 10%, 符合平行标准。

表 5 平行样品间变异系数 (CV%)

核素 \ 闪烁体	闪烁液	闪烁滤片	闪烁小杯
³ H	11.3	10.3	7.7
¹⁴ C	3.9	5.1	5.2
¹²⁵ I	3.8	5.5	6.4
本底	10.5	13.4	11.0

五、对数能谱分析

对 ³H, ¹⁴C, ¹²⁵I 及 ³⁵S 等核素的三种制样方法进行了对数能谱分析。仅以 ¹⁴C 能谱为例(图 3) 分析。其他种核素皆类似。

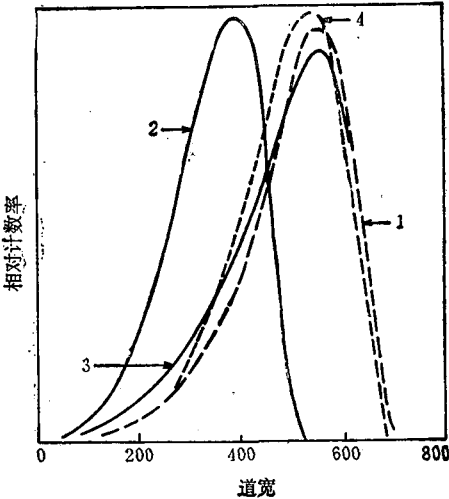


图 3 ¹⁴C 的对数能谱分析

1. ¹⁴C 标准瓶 2. 乳化剂液相 3. 闪烁滤片 4. 闪烁小杯

1. 与无淬灭标准瓶比较, 乳化剂液相测量能谱的最大能量变窄, 而固相闪烁体测量则略加宽, 但仍在光电倍增管的响应范围之内, 因而这就使固相闪烁体在一般液闪谱仪上测量成为可能。

2. 对数能谱曲线“峰值值”——在能谱分析中, 计数率最高的峰值在对数能谱上所在位置的数值。与标准瓶比较, 乳化剂液相闪烁测量的峰值值向左、向低能方向漂移; 两种固相晶体闪烁体的峰值值则保持不变或略向右、向高

能方向漂移。这说明脉冲高度增加,能发射出较强的光子或对同样能量的粒子能产生较多的长寿命的光子。在固相闪烁体系中能量是在无机介质分子内部传递,因此不存在化学淬灭因素的影响。这也就是固相闪烁体在测量时无需淬灭校正的原因。

3. 用固相闪烁体测量几种核素得到的对数能谱可见到(图4), ^3H 与 ^{14}C 或 ^3H 与 ^{35}S 的峰位值分布在不同的能量范围,因此固相闪烁晶体可用于双标记的制样测量。

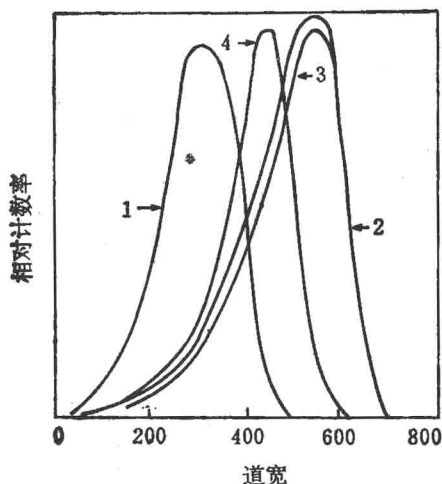


图4 对数能谱分析(闪烁小杯)
1. ^3H 2. ^{14}C 3. ^{35}S 4. ^{125}I

六、固相闪烁体系的使用方法与评价

放射性液体样品用贝克曼公司提供的两种固相闪烁晶体制样方法进行液闪测量,方法极为简便(图5)^[2,3]。(1)对于样品的要求:小于 $200\mu\text{l}$ 体积的无色、非挥发性的样品溶液;其浓度最好低于 1mol/L 。(2)将样品直接加在涂有固相闪烁晶体的闪烁小杯中;或加在预先在缓冲液中浸泡过的闪烁滤片上,缓慢抽滤(比普通玻璃纤维滤膜上的流速要低)。(3)在低于 70°C 温度下烘干或自然风干。(4)将闪烁小杯或滤片置于普通测量瓶中。(5)液闪谱仪全开窗,非外标准淬灭测量 CPM 值。(6)测量之后,闪烁小杯或滤片可直接作为废物处理;如有必要,样品亦可回收。

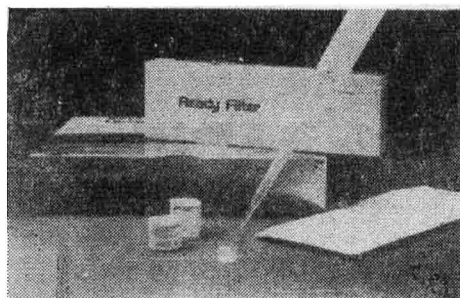


图5 闪烁滤片与闪烁小杯

贝克曼公司产品

固相闪烁晶体测量有很多优点:①使用方法简便;②无需有机的又有毒性的闪烁液,而本身无毒性;③无液体的小体积固体放射性废物,能节约大量的废物处理经费;④使用安全,保护环境不受污染;⑤测量瓶不需洗涤且可反复使用;⑥不需要淬灭校正;⑦样品可回收。当然,它们仍有不足之处,如样品需要烘干;样品有过量的颜色及过高的克分子浓度将会影响测量的准确性。

结 束 语

固相闪烁晶体制样方法与测量技术的推出是液闪技术方法学上的一种革新。本实验室试用贝克曼公司提供的固相闪烁滤片和闪烁小杯,其测量的计数效率,精确度,平行度等与乳化剂液相闪烁体制样法比较均符合要求,能用于多种核素及各类生物样品研究,并且可在普通的液闪谱仪上计数测量。与液相方法比较,其优点突出,价格也不高。因此我们认为,这种固相闪烁晶体在我国同位素应用与液体样品测量中是可以广泛推广应用的。

本工作得到曹昭根、蒋汉英、唐建国、李杰的帮助,在此一并致谢。

参 考 文 献

- 1 杨守礼,江丕栋,林汉主编. 液体闪烁测量技术的进展与应用. 北京: 科学出版社,1987: 11—12
- 2 Beckman Bulletin. The counter solution for sample preparation, U S A: Beckman Instruments Inc, 1989: 7836
- 3 Beckman Bulletin. Ready filter discs common questions and answers, the counter solution. U S A: Beckman Instruments Inc, 1989: CS 1/002

(下转第 162 页)

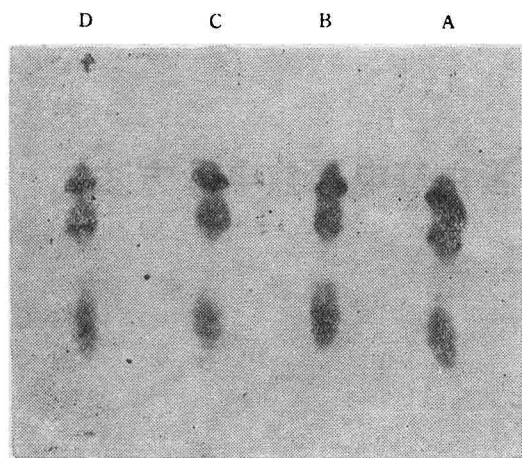


图2 改良的血清蛋白醋酸纤维膜等电聚焦

A,B,C, D 为同一样品,其中 A,B 加样量为 1 μ l;
C, D 加样量为 0.5 μ l

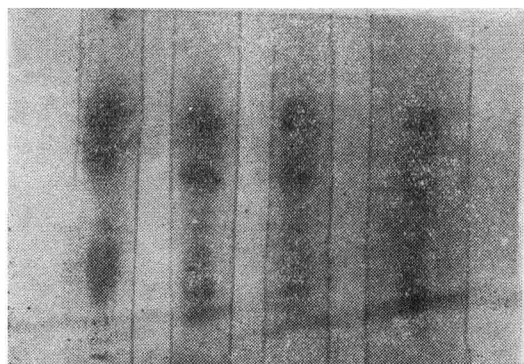


图3 延长聚焦时间($\geq 2h$)对改良的血清蛋白
醋酸纤维膜等电聚焦的影响

白质的吸附能力明显减弱而影响分离效果^[5]。Ambler 等发现未经甲基化处理的醋酸纤维素膜大多在聚焦 45min 后才出现电渗作用的影响,增加 Ampholine 和载体混和液浓度可降低电渗作用^[6]。我们对血清蛋白进行等电聚焦电泳的结果见图 2。

我们也发现电渗作用在聚焦时间较长时比较明显,该现象一般在加样后进行聚焦接近 2h 时出现。其表现为电流持续下降接近零时,突然开始增加。受电渗作用影响的电泳结果见图 3。我们认为这种影响可能与高电压聚焦时间较长有关。

本实验结果表明:用醋酸纤维素膜代替聚丙烯酰胺凝胶进行等电聚焦电泳,结果可靠,而且具有简单、经济和快速的优点。尽管它的分辨率相对较差,但对于基础生化和临床检验中一般蛋白质的分离分析,以及结合特异的染色方法进行同工酶的酶谱测定等,均能达到要求。值得在一般实验室推广应用。

参 考 文 献

- 1 Harada S. *Clin Chim Acta*, 1975; 63: 275
- 2 Ambler J. *Clin Chim Acta*, 1978;88:63
- 3 王同明. 生物化学及生物化学检验技术. 南京: 江苏科学技术出版社,1981: 191—194
- 4 Cocco C, Marini M, Rizzotti P. *Clin Biochem*, 1987; 20: 399
- 5 张普民, 李茂深. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16 (3): 242
- 6 Ambler J. Walker G. *Clin Chem*, 1979; 25(7): 1320

[本文于 1989年12月30日收到, 1990年3月 19日修回]

(上接第 141 页)

- 4 Beckman Bulletin. *Counting radioactivity using solid scintillators, the counter solution*. U S A: Beckman Instruments Inc, 1989: CS 1/004
- 5 Ronald N Hines *Ready cap application*. USA: Beckman Bulletin, 1989: 7842, T-1672-NUC-89-10
- 6 Sudhakar Welankiwa. *Ready cap application*. U S A: Beckman Bulletin, 1989: 7842, T-1678-NUC-89-14
- 7 Sandra R Smith. *Ready cap applications*. USA: Beckman Bulletin 1989: 7842, T-1673-NUC-89-11
- 8 Steven White, Velfonl Alkhass-Adeh. *Technical information*. USA: Beckman Bulletin, 1989: T-1691-NUC-89-29.
- 9 Eleanor L Wright Ronald P Taylor. *Ready cap applications*. USA: Beckman Bulletin, 1989: 7842, T-1671-NUC-89-9
- 10 Robert H Keith, Tsai B S. *Technical information*. USA: Beckman Bulletin, 1989: T-1695-NUC-90-1
- 11 Holly Groelle. *Ready cap applications*. USA: Beckman Bulletin, 1989: 7842, T-1681-NUC-89-19
- 12 乐加昌, 肖京城. 核化学与放射化学, 1985;(1)

[本文于1990年4月19日收到, 6月11日修回]