

“切伦科夫辐射”在生物学示踪中的应用

陈舜华 林丽宽 李藻发
(生物学系)

摘 要

本文报告了应用国产FJ—353液体闪烁计数器,在水溶液中对 ^{32}P 所标记的一些生物样品:消化的红血细胞溶液和低活性的水稻幼苗RNA提取液进行切伦科夫计数的结果,样品的计数率一般比G—M计数法提高约2—4倍左右。

在生物样品中存在颜色时会产生淬灭而使计数率下降,这可以通过脱色或用其他淬灭校正法消除。

当带电的快速粒子以均匀速度通过透明介质时,其电磁波脉冲使粒子轨迹附近的物质暂时极化,同时每一个极化的粒子都成了辐射中心,并放射出电磁波,这些电磁波互相干涉而抵消,当带电粒子速度 $V \geq \frac{c}{n}$ (c 为光速= 3×10^{10} 厘米/秒, n 为介质折射率)时,就会互相迭加而产生电磁辐射,即“切伦科夫辐射”。

根据“切伦科夫辐射”的原理,人们利用水作为介质,方便地测量高能 β 核素如 ^{32}P , ^{24}Na , ^{90}Sr — ^{90}Y , ^{86}Rb 等的放射性,采用这种方法能够测量高能 β 辐射体的低水平放射性,山田昭二(1962)^[1]报告了应用切伦科夫辐射可探测水中的浓度低达 10^{-7} 微居里/毫升的 ^{90}Sr — ^{90}Y 。不少学者已把这种技术用于生物样品的测量上。Hannelore等(1964)^[2]测量组织薄片样品(重量30—50毫克)中的 ^{24}Na (在水溶液中)的放射性,Gould等(1972)^[3]报导了在光(合)磷酸化的研究中应用切伦科夫计数技术测量 ^{32}P 的优越性。上海农科院(1977)^[4]应用切伦科夫计算法,用 ^{32}P 示踪研究土壤中的磷肥形态。

我们从生物学示踪的实际需要出发,考虑到样品数量多,有的样品体积大或活性低的特点,有必要建立切伦科夫计算技术,因而对此作了一些初步的试验。

材料与 方法

1. 仪 器

FJ—353国产液体闪烁计数器(测量条件: $H.V. = 1300$ 伏, $A.B.$ 道衰减 $\frac{1}{2} \times 1$ 道宽 $0.5 \sim 5$ 伏);样品瓶:低钾玻璃瓶。

FH—408国产自动定标器(测量条件: $H.V. = 1200 \sim 1300$ 伏);计数管:箔窗式 β

● 本文承陈俊民付教授审阅,黄丽如,李玉杏曾协助部分实验动物取血工作。

G—M 钟罩型计数管。

2. 材 料

① 核素： $\text{Na}_2^{32}\text{HPO}_4$ 为北京 401 所提供。

② 生物材料与方法：

A. 血液样品：健康人血由广州市血站所提供；鸡、兔、豚鼠血取自本系动物饲养场。鸡自翼下动脉取血，兔、豚鼠于心脏穿刺取血。

B. 血球的标记：取 $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ 10 微升含有 4—6 微居里^(5,6) 于 10 毫升离心管中，并用 0.1 毫升生理盐水稀释摇匀，加入 2 毫升抗凝血（或 2.5 毫升抗凝血内含 0.5 毫升 1640 细胞培养液）摇匀，取 0.2 毫升全血准备消化，其余血样在 37℃（鸡血为 40℃）水浴中孵育 1—1.5 小时，每隔 15 分钟摇动一次，保温完毕，在 3000 转/分离离心机中分离血球，小心吸去上清液，并用生理盐水将沉淀的血球洗涤三次，使洗涤液接近本底水平，弃去上清液（不要移去红细胞），并用生理盐水回复至原来体积，取 0.2 毫升血球悬液（即标记红细胞）准备消化。

全血及血球之消化：参考动物组织的消化方法^(7,8) 将上述全血和血球样品 0.2 毫升（或 0.25 毫升）置于试管中，加入 2 毫升甲酸，1 毫升过氧化氢，1 滴辛醇，把试管置于水浴（80℃）中消化约 10—30 分钟，至消化液呈淡微黄色为止。另取 0.2 毫升悬浮血球，加入 3 毫升蒸馏水使溶血，作不退色的对照，观察颜色淬灭的影响。

C. 样品的测量：用注射器定量取 100 微升之消化血样 2—3 个平行样品，然后加入 5 毫升蒸馏水于闪烁瓶中，另取等量血样在测量小碟上于红外线灯下烘干，分别在液体闪烁计数器及 G—M 计数器上（样品与 G—M 计数管距离 2 厘米处）测量其放射性。

D. 水稻幼苗的标记（RNA 的提取和测量）：取水稻三叶期秧苗 60—80 株，洗去根部泥沙，移入 ^{32}P 比活性为 0.5 微居里/毫升的 Knop 培养液中，置于室温 19℃ 及 25℃，经 24 及 48 小时，取出幼苗叶片，作 RNA 的提取。

水稻叶片 RNA 的提取，按 J.H.Cherry (1973)⁽⁹⁾ 的方法略加修改，准备称取 200 毫克（两个平行样品）于玻璃研钵中加入 4 毫升冷甲醇在冰浴上匀浆，匀浆液在 3500 转/分下离心 5 分钟弃去上清液，再用 4 毫升冷甲醇（二次），4 毫升 0.2M 冷高氯酸（二次），4 毫升冷乙醇（二次）洗沉淀离心，均弃去上清液再加 5 毫升乙醇乙醚（2:1），置于 50℃ 水浴中处理 30 分钟，离心弃去上清液，在沉淀物中加入 5 毫升 0.5M 氢氧化钾，在 37℃ 中抽提 16 小时，离心所得上清液即为 RNA 提取液。

RNA 提取液的测量：把上述 RNA 提取液全部移入闪烁瓶中进行测量，样品所带的黄颜色可用酸中和至无色，再进行放射性测量。

本实验所得之数据，经标准差 $\delta = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$ 统计处理。

实 验 结 果

(1) 用 ^{32}P 对红血细胞的标记

实验表明以 ^{32}P 标记的人和各种动物的血球标记效率,在G—M计数器和切伦科夫辐射的测量中,其结果相接近。 ^{32}P 对人血球的标记效率为25.8%及26.7%,兔血球为13.5%及15.4%,豚鼠为22.9%及23.7%,鸡血都为3.2%。各种样品的标记效率虽较接近,但其计数效率却有明显差异,见表1。在颜色淬灭效应的试验中,经消化退色处理的样品比不消化带红颜色的样品,切伦科夫计数率提高1.5—1.7倍,结果如表2所示。

表1 用 ^{32}P 标记血液Cerenkov计数与G—M计数CPm比较

	全 血			血 球			血球标记效率	
	A Cerenkov 计数	B G—M计数	$\frac{A}{B}$	C Cerenkov 计数	D G—M计数	$\frac{C}{D}$	% Cerenkov 计数	% G—M计数
人	10101±2213	3212±918	3.1	2706±492	830±192	3.3	26.7	25.8
兔	13624±2149	3921±101	3.5	2101±103	530±84	4.0	15.4	13.5
豚鼠	13514±333	4509±130	3.0	3209±8	1035±81	3.1	23.7	22.9
鸡	9630±643	2760±370	3.5	312±81	90±10	3.5	3.2	3.2

表2 颜色淬灭对计数率的影响

	标记血球经消化和退色处理			未经消化和不退色处理			
	A Cerenkov 计数	B G—M计数	$\frac{A}{B}$	C Cerenkov 计数	$\frac{A}{B}$	D G—M计数	$\frac{B}{D}$
人血球	3198±244	620±21	5.2	2064±63	1.5	585±10	1.0
兔血球	2783±95	850±10	3.3	1711±90	1.6	691±10	1.2
豚鼠血球	3000±157	711±102	4.2	1776±69	1.7	681±9	1.0

(2) ^{32}P 标记的RNA提取液的测量结果

以 ^{32}P 标记的水稻三叶期幼苗,用上述方法进行RNA提取,由于活性太低,把每个样品的全部提取液(约5毫升)装入计数瓶中,切伦科夫计数的结果如表3。实验表明,在合适水稻生长的温度(25℃)下处理, ^{32}P —RNA提取液的CPm为137±17,而室温19℃处理组,由于温度偏低,其 ^{32}P —RNA提取液的CPm明显降低为64±25。48小时取样的结果,由于示踪时间延长,植物能充分吸取 ^{32}P 合成体内物质,因此RNA提取液的计数率在两种温度下都比24小时增高一倍,分别为353±92及146±21。加酸退色后 ^{32}P —RNA提取液各组的计数率都有所提高。

表3 用 ^{32}P 标记的水稻幼苗RNA提取液测量结果

取样时间	未退色的 ^{32}P -RNA 提取液 (CPm) (B)	加酸退色的 ^{32}P -RNA 提取液 (CPm) (A)	$\frac{A}{B}$	未退色的 ^{32}P -RNA 提取液 (CPm) (D)	加酸退色的 ^{32}P -RNA 提取液 (CPM) (C)	$\frac{C}{D}$
	24小时			48小时		
25°C幼苗	137±17	237±10	1.7	353±92	587±197	1.7
19°C苗幼	64±25	115±31	1.8	146±21	202±18	1.4

讨 论

(1) 由于磷是组成红细胞的成份之一, 当 ^{32}P 进入红血球后与非放射性磷酸根离子一起迅速地参与磷代谢活动(包括磷酸化作用)^[5], 在新生成的磷酸酯分子以及血细胞中含磷的组分中, 便含有 ^{32}P , 根据有关资料, 用 ^{32}P 对正常人血球的标记效率为18—25%^[6], 也有报导为30%, 我们的实验结果为25.8%, 与上述报导相接近。至于 ^{32}P 对动物血球的标记效率较少报导。前人的工作着重应用各种核素标记血球, 研究血细胞的寿命, 或用于测定动物血容量以及研究血浆中磷脂代谢的速率等等。我们用对人的血球标记的实验条件和操作步骤多次重复, 应用于鸡血细胞的标记, 但标记效率较低, 仅为3.2%, 鸡为鸟类动物, 血球的结构与其他哺乳动物不同之处是其红血球有核, 至于标记效率为什么这么低? 是否由于细胞膜透性有所不同还是由于细胞化学成份的特性, 使 ^{32}P 难与结合, 抑或其它原因, 有待进一步的研究。

鼠、兔红血球的标记效率也有所不同, 这些结果说明不同种类动物血液中磷代谢作用有很大的差异, 我们通过用 ^{32}P 标记各种红血球, 然后用切伦科夫计数法和G—M计数器的测定法分别测量其标记效率, 并比较两种测量方法的计数效率。实验表明, 两种方法所测得的标记效率颇为接近, 但其计数率则有差异, 前者比后者高2—4倍, 这是由于水样本身可以直接作为发光体, 放射性物质能够比较均匀地分散在水相中, 而当用G—M计数管来测量 β 粒子时, 则由于 β 粒子通过计数壁, 才能被记录, 在几何效率上不能象前者达到100%, 因而切伦科夫计数效率就比较高。

(2) 核酸是生物体所特有的、分子量很大的物质, 含有C、H、O、N、P等五等元素, 来源于生物材料的核酸有一定比例的含磷量, 因此用 ^{32}P 能够对核酸进行标记^[10, 11], 本实验仅用200毫克鲜重植物样品进行提取, 由于材料量少, 加上提取过程的损失和标记效率, 计算效率等等因素, 因此 ^{32}P -RNA的活性是很低的。由于切伦科夫计数具有测量体积不受限制的特点, 我们可以方便地把样品的全部体积装进闪烁瓶中进行计数。不久前Paul等^[12]应用切伦科夫计数对 ^{32}P -RNA, ^{32}P -DNA, ^{32}P -酯类等的植物提取液进行了提高 ^{32}P 计数效率的研究, 他们在水溶液中加入一定量的Tritonx—100, 对上述样品能很好地提高 ^{32}P 的计数效率。

(3) 生物样品中存在的或实验过程产生的颜色, 在进行切伦科夫计数之前要进行

脱色, 否则计数效率明显下降。这是由于切伦科夫辐射也同样受到颜色淬灭的影响, 因为颜色缩短了光子的平均自由路程, 减少光输出。在我们上述实验中, 血液不经消化处理而带红颜色以及碱性 RNA 提取液不加酸中和而带黄颜色, 都使计数率明显下降, 这是由于这些颜色吸收了切伦科夫光的一部分的结果^[3]。颜色淬灭也可用内标准法、外标准法等等加以校正^[13]。

(4) 切伦科夫辐射技术的优越性:

在水溶液中应用切伦科夫辐射技术, 对³²P示踪的样品进行放射性测量, 有许多优越性。水是最好的溶剂, 各种生物学反应都是在水介质中进行的, 因此, 以水为溶剂进行切伦科夫计数, 与液体闪烁测量技术比较显得更为简便、快速、经济, 样品制备极为简单, 样品测量后还能回收。

另外, 可测样品量很大, 现用的闪烁瓶体积可达20毫升, 克服了闪烁液系统溶水量有限的缺点, 对于一些活性较低的提取液如³²P-RNA, ³²P-DNA等样品, 可以测量其全部体积, 这是G-M计数法所不能比拟的。

参 考 文 献

- [1] 山田昭二, 同位素应用译丛, 1963, 2, 18—22.
- [2] Braunsberg H., Gugver A., *Anal. Biochem.*, 10 (1965), 86—99.
- [3] Gould, J, M, et al., *Anal. Biochem.*, 50, (1972), 540—548.
- [4] 王遗宝, 张国强, 上海农业科学, 1979, 3, 22.
- [5] И.И 伊万诺夫, 放射性同位素在医学和生物学中的应用, 人民卫生出版社, 1957, 238—240.
- [6] Smith P.H.S., *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes* 25 (1974), 3, 137—139.
- [7] FOX B. W., *Techniques of Sample Preparation for Liquid Scintillation Counting*, North-Holland Publishing Company, (1976), 123.
- [8] Houtman A. C., *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 16 (1965), 2, 65.
- [9] J, H, 彻里, 植物分子生物学实验指导, 科学出版社, (1979), 81.
- [10] Kisselev O. I. et al., *Molec. & Cell. Biochem.*, 6 (1975), 2 149—153.
- [11] Volckaert G. et al., *Anal. Biochem.*, 83 (1977), 1, 228—229.
- [12] Chow P.N.P., *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 31 (1980), 1, 25.
- [13] Faires R.A. et al., *Radioisotope Laboratory Techniques*, BuHerworths, London, (1973), 230.

Application of Cerenkov Emission in Biological Tracer

Chen Shunhua Lin Likuan Li Zaofa

Abstract

By using FJ—353 Liquid scintillation counter made in China, the Cerenkov emission of biology samples labelled with ³²P in aqueous solution can be determined. The Cerenkov counting of the solution of red Blood cells and the extract of low-activity rice seedling RNA is reported.

The Cerenkov counting rate is about two to four times as high as that in Geiger—Muller counter.

The quenching effect of the colors in the biology sample may lower the counting efficiency, It can be eliminated after decolorization of the sample or corrected by some other means.