液体シンチレーション・カウンターによる 生体物質の水溶液の新測定法

草 間 慶 一

静岡大学・文理学部・化学

1964年12月15日 受理

^3H または ^{14}C でラベルされた核酸やその関連化合物などの生体物質の水溶液を、液体シンチレーション・カウンターで測定する新方法として、トルエン- PPO - POPOP 溶液 10 ml に、1 M ハイアミン・エタノール溶液 0.5 ml を混ざると、0.3 ml までの水溶液を加えても -8°C で均一相であり、 ^3H に対して18%、 ^{14}C に対して53%の好効率で測定できる。とくに核酸のごとき高分子物質の場合でも、沈殿もクエンチングも起こらない。

1. 緒 言

水溶液の試料を液体シンチレーション・カウンターを用いて、その放射能強度を測定するために、Farmer, Bernstein¹⁾ 以来多数の発表がある。しかし、低温で生体物質の水溶液をよい効率で測定しうる方法は、現在まであまり発表されていない。

ハイアミンの 1M エタノール溶液を、トルエン系のシンチレーターに加えることにより、 ^3H または ^{14}C でラベルされた核酸およびその関連物質の水溶液を、好効率で測定する方法を見出したので、ここに報告する次第である。

2. 試薬および方法

2.1 シンチレーター

100%トルエン溶液²⁾ PPO 4 g, POPOP 0.1 g をトルエン 1 l に溶解

70%トルエン溶液 上記のトルエン 1 l の代わりに 700 ml, 無水エタノール 300 ml

ジオキサン溶液³⁾ ナフタリン 50 g, PPO 7 g, POPOP 50 mg をジオキサン 1 l に溶解

Bray 溶液⁴⁾ ナフタリン 60 g, PPO 4 g, POPOP 0.2 g, メタノール 100 ml, エチレングリコール 20 ml, にジオキサンを加えて 1 l にする。

2.2 ハイアミン溶液

1M ハイアミン・エタノールおよびメタノール溶液 市販の Hyamine 10-X (Cl 型)* を 1M になるように (分子量約 480) 無水エタノールまたは無水メタノールに溶解

1M 再結晶ハイアミン・エタノール溶液 4 倍量のトルエンよりハイアミン粉末を再結晶し⁵⁾, 無水エタ

ノールに 1M に溶解

ハイアミン・プロパノールおよびブタノール溶液 これらのアルコールに対しては、1M のハイアミン溶液を作り得なかったので、2/3 または 1/2M 溶液にする (Table 1 参照)。

1M ハイアミン (OH) メタノール溶液** 市販のものをそのまま使用。これはハイアミン粉末を数回再結晶し、メタノールに 1M になるように溶解して、 Ag_2O で OH 型に変えたもの^{5), 6)}。

2.3 方 法

1M ハイアミン・エタノール溶液の 0.5 ml または 1.0 ml を、100%トルエン溶液 10 ml に加える。0.5 ml のときは 0.3 ml まで、1.0 ml の場合は 0.4 ml まで水溶液の試料を加えても、 -8°C で均一相である。

2.4 測定および効率

計数温度が -8°C の実験は Packard Tri-Carb 314 X で、 10°C のは Tri-Carb 314 EX のいずれも自動的の装置で行なった。

Tri-Carb Standards の ^3H および ^{14}C の sealed vial に対して、装置の示す効率が ^3H で 20%, ^{14}C で 60% であるとして、実験の効率を計算した。

3. 結 果

3.1 ハイアミンを溶解するアルコールの種類

ハイアミン溶液 0.5 または 1.0 ml, 100% トルエン

* Hyamine 10-X Di-isobutyl cresoxy ethoxy ethyl dimethyl benzyl ammonium chloride monohydrate. Rohm & Haas Inc., Philadelphia 5, Pa., USA.

** Packard Instrument Company Inc., La Grange, Ill., Catalog No. 6003005.

Table 1 Solubilizing effects of Hyamine in several kinds of alcohol

Temp.	Alcoholic Hyamine 10-X									
	Volume* (mℓ)	OH	Cl form.							
		Metha- nol	Metha- nol	Ethanol		n-Propanol		iso- Propanol	n-Buta- nol	iso-Bu- tanol
		1M	1M	1M	1/2M	2/3M	1/2M	1/2M	1/2M	1/2M
Room	0.5	+	—	+	—	+	+	+	+	+
—8°C	0.5	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Room	1.0	+	+	+	+	+	+	+	—	—
—8°C	1.0	—	—	+	—	—	—	—	—	—

* Counting mixtures contained 10 ml of 100% toluene scintillator²⁾, 0.1 ml of aqueous sample solution and Hyamine solution in Table 1.

** Marking: +, Homogeneous solution.
—, two layer solution or emulsion.

シンチレーター溶液 10 ml に、試料水溶液を 0.1 ml 加えて、—8°C に30分放置したのち、均一相を示していたのは、Table 1 のごとく 1M エタノール溶液を加えた場合のみであった。プロピルアルコールよりも高級のものには、ハイアミンの溶解度が減少するため、1 M 溶液を作成し得ず、1/2M で比較した。この場合はすべてのアルコール溶液で均一相にする効果が見られなかった。

3.2 ハイアミンの精製

ハイアミンを2回トルエンから再結晶してエタノールに溶解すると、無色透明な液が得られるが、市販の粉末を直接溶かすと微黄色を呈する。しかし、測定にさいしてはあまり大なる差がなかったので、以下の結果はすべて、粉末を直接使用した溶液のものである。

Table 2 Temperature effects for efficiency

Efficiency		³ H		¹⁴ C	
		—8°C	10°C	—8°C	10°C
Counting mixture					
Sample* 0.1ml					
100% Toluene scintillator 10ml		16%	11%	53%	37%
1M Hyamine Cl in ethanol 0.5ml					
Sample* 0.1ml					
70% Toluene scintillator 10ml		8	5	31	21
Sample* 0.1ml					
Dioxane scintillator 10ml		Frozen	9	Frozen	24

* Sample: ³H-Uracil or ¹⁴C-Uridine

3.3 温度による影響

計数温度を—8°C と 10°C で、その効率を比較したのが Table 2 である。試料としては ³H- ウラシルおよび ¹⁴C- ウリジンの水溶液を使用した。低温で行なうほうがバックグラウンドも低く効率も良かった。ジオキサン溶液に比べて、本法のほうが—8°C でも 10°C でも効率良かった。

3.4 —8°C での各種シンチレーターの効率の比較

本法、70%トルエン溶液、Bray 溶液の3種のシンチレーターを用い、添加する ³H- ウラシル水溶液の容

Fig. 1 Efficiency of scintillation counting of ³H-uracil aqueous solution in different solvent system.

- △—△ 0.5ml ethanolic 1 M Hyamine Cl, 10 ml of 100% toluene solution (PPO 4g, POPOP 0.1g in 1 l toluene)
- ×—× 1.0 ml ethanolic 1 M Hyamine Cl, 10 ml of 100% toluene solution
- 10 ml of 70% Toluene solution (PPO 4g, POPOP 0.1g in 700 ml toluene and 300 ml ethanol)
- 10 ml of Bray solution (PPO 7g, POPOP 50 mg, naphthalene 60 g, methanol 100 ml, ethyleneglycol 20 ml make to 1 l by dioxane)

量による計数効率の変化を示したのが Fig. 1 である。 ^3H に対する測定として、 ^3H -ウリジンおよび U-MP の水溶液の場合も、Fig. 1 とほとんど同じ結果が得られた。また ^{14}C -ウリジン水溶液に対しての ^{14}C の効率は Fig. 2 に示した。 ^{14}C -ウラシルおよび U-MP でも同様な結果であった。

Fig. 2 Efficiency of ^{14}C -uridine aqueous solution. Solvent systems are same as Fig. 1.

3.5 クエンチング

Table 3 のごとく、酸、アルカリ、塩類溶液に対してほとんどクエンチングを示さない。生物物質としてウリジン、UMP、リボ核酸、いずれも 0.2 ml 中に 10 mg、スレオニン 0.1 ml 中に 6 mg を含む水溶液の場合でも、何らのクエンチングを示さなかった。一方、70%トルエン溶液ではスレオニン 3 mg の添加で 14%、Bray 溶液ではスレオニン 3 mg で 20%、またわずか 0.5 mg のリボ核酸でも沈殿を生成して、50%以上のクエンチングを示した。

4. 考察および結語

水溶液を液体シンチレーション・カウンターで測定する場合によく用いられるのが、ナフタリンを含むジオキサン溶媒系で、20%ぐらいまでの水を加えうる。しかし、Bray 溶液⁴⁾や diitol 溶液⁷⁾以外は大部分 4°C 以上の温度で測定しなければならず、フリーザーの温度を変える不便さがある。Bray 溶液は -8°C で 10 ml の溶液に 3 ml までの水溶液が使用できてきわめて良いシンチレーターであるが、核酸のごとき高分子の物質は沈殿を生じてしまうのが欠点である。

ハイアミン (OH 型) のメタノール溶液は、アミノ酸⁸⁾、タンパク質^{9)~10)}、プリン塩基¹¹⁾などを溶解するために最初使用された。これを水溶液の測定に用いたのは Chen¹²⁾ で、トルエン-エタノール系に加えたが、効

Table 3 Quenching for ^3H -uracil solution

Sample	Counting System (Scintillator=10ml)			
	100% Toluene scintillator 1 ml of Hyamine ethanol 0.1 ml of sample	70% Toluene scintillator 0.1 ml of sample	Bray solution	
			0.1 ml of sample	1.0 ml of sample
1 N HCl	2.5%*	9 %*	65%*	70%*
0.25 N KOH	0	3	8	
0.5 N KOH	6	3.5	16.5	25
0.5 M KCl	5	7.5	4	50

$$\text{* Quenching per cent} = \frac{[\text{cpm of aqueous solution}] - [\text{cpm of acidic(or alkaline or salty) solution}]}{\text{cpm of aqueous solution}} \times 100$$

率はあまり良くない。Shapira, Derkins¹³⁾ は Thixcin R とハイアミンを入れて、水-トルエン乳濁液として測定し、 ^{14}C -グルコースに対して 50%、 ^3H -チミンで 10% の結果を得ているが、乳濁液の場合は時間とともにカウントの変化する欠点がある。そのうち Hash¹⁴⁾ が dioxane-anisole-dimethoxyethane 系に¹⁵⁾、Herberg はトルエン系に¹⁶⁾、Takahashi¹⁷⁾ らは Werbin らのジオ

キサン溶液¹⁸⁾にそれぞれハイアミン (OH) メタノール溶液を加えている。いずれも -8°C より高い温度での測定である。

ここで報告した方法は、たんに 1M ハイアミン (Cl) エタノール溶液を、もっとも広く使用されている 100% トルエン溶液²⁾に加えるだけで、 -8°C で水溶液を好効率で測定できる利点がある。とくに核酸のごとき高

分子の物質の測定には沈殿もクエンチングも起こらず測定できるのが特徴である。

文 献

- 1) E. C. Farmer, I. A. Berstein: *Science*, **115**, 460 (1952)
- 2) F. N. Hayes, D. G. Ott, V. N. Kerr: *Nucleonics*, **14**, 43 (1956)
- 3) W. J. Langham, W. J. Eversole, F. N. Hayes, T. T. Trujillo: *J. Lab. Clin. Med.*, **47**, 819 (1956)
- 4) G. A. Bray: *Anal. Biochem.*, **1**, 279 (1960)
- 5) F. Eisenberg: "Liquid Scintillation Counting" p. 123, Pergamon Press, New York, (1958)
- 6) "Hydroxide of Hyamine 10-X" Packard Technical Bulletin, (1961)
- 7) F. E. Kinard: *Rev. Sci. Instr.*, **28**, 293 (1957)
- 8) M. Vaughan, D. Steinberg, J. Logan: *Science*, **126**, 446 (1957)
- 9) R. J. Herberg: *Science*, **128**, 199 (1958)
- 10) D. Steinberg, M. Vaughan, C. B. Anfinsen: "Liquid Scintillation Counting" p. 230, Pergamon Press, New York, (1958)
- 11) J. D. Davidson: "Liquid Scintillation Counting" p. 88, Pergamon Press, New York, (1958)
- 12) P. S. Chen: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **98**, 546 (1956)
- 13) J. Shapira, W. H. Porkins: *Science*, **131**, 414 (1960)
- 14) J. H. Hash: *Anal. Biochem.*, **4**, 257 (1962)
- 15) J. D. Davidson, P. Feigelson: *Intern. J. Appl. Radiation and Isotopes*, **2**, 1 (1957)
- 16) R. J. Herberg: *Anal. Chem.*, **32**, 42 (1960)
- 17) H. Takahashi, T. Hattori, B. Maruo: *Anal. Chem.*, **35**, 1982 (1963)
- 18) H. Werbin, I. L. Chaikoff, M. R. Imada: *Proc. Sci. Exp. Biol. Med.*, **102**, 8 (1955)

Abstract

An Improved Method for Liquid Scintillation Counting of Biological Compounds in Aqueous Solution

Keiichi KUSAMA

Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Science, Shizuoka University

For the purpose of measuring aqueous solutions of biological compounds, especially nucleic acids and nucleotides, a very convenient Hyamine-water-toluene system was developed.

The composition of this counting mixture is:

10 ml of toluene scintillator (4 grams of PPO, and 0.1 grams of POPOP in 1 liter of toluene)

0.5 ml of 1M Hyamine 10-X chloride in ethanol

up to 0.3 ml of aqueous sample solution

when 1.0 ml of Hyamine is added, the system can contain up to 0.4 ml of aqueous solution.

Maximum efficiency for ^3H is 18.3% and ^{14}C is 53%. Efficiencies of aqueous solution of ^3H - and ^{14}C -UMP, uridine and uracil are compared with four different solvent systems, that is Hyamine-water-toluene, 70% toluene-30% ethanol-PPO-POPOP, dioxane-naphthalene-PPO-POPOP, and so-called "Bray solution", at -8°C and 10°C . The best results are obtained for this Hyamine-water-toluene system described above.

1M Hyamine Cl in ethanol only has an effect as a solubilizing agent of aqueous solution with toluene scintillator. Commercial 1M Hyamine hydroxide in methanol, 1M Hyamine Cl in methanol, 1/2M in ethanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, or 2/3M in n-propanol has no effect at -8°C . Higher alcohol than propanol can not dissolve Hyamine as 1M solution.

Quenching per cent for 0.1 ml of 1N HCl, 0.5 N KOH, and 0.5M KCl are 2.5, 6, and 5%, respectively, in the case of 1 ml of 1M Hyamine Cl ethanolic solution is added. Even when 10 mg/0.2 ml of nucleic acid, UMP, uridine solution or 6 mg/0.1 ml of threonine solution is added, no precipitate or no quenching is observed.