技 术 与 方 法

显微分光光度计性能的生物学指标测定方法

胡匡祜　吴　骋　李子孝

（中国科学院生物物理研究所，北京）

显微分光光度计在生物学、医学和农学中已得到越来越广泛的应用。它可为许多学科的研究提供可靠的数据。一般使用该仪器时，往往只注重仪器的物理学和光学指标，忽视生物学指标。但是在生物学研究工作中，由于样品大多数具有自己的特殊性质，如细胞的结构和形状是十分复杂和不均匀的，从而引起测量光束的漫反射、折射和衍射等光学现象，致使测量结果产生较大的误差，而显微分光光度计的独特光学设计，为克服这些误差提供了可能。为了说明仪器的可靠性和适用性，本文提出几个主要的生物学指标作为显微分光光度计性能的检测方法，并简要介绍了显微光度测试原理。

一、基本测量方法

主要是对单个细胞中化学物质相对含量和绝对含量的测量：可应用下述两种光度法：

1. 一波长两区域方法[1]　从图 1 看，先测量光束通过一核塞（或被测物体）面积为 S_1 的透射率 T_1，再测量包括全部细胞核的自由面积 S_2 和该面积的透射率 T_2。由下式求得细胞核某成份的相对含量。

$$M = \left(\lg \frac{1}{T}\right) \frac{(1 - T_2) S_2}{(1 - T_1)} = E_1 S_1$$

式中 M 是相对含量，E_1 是核塞面积为 S_1 的光密度值。测量时，波长选择在被测物质吸收峰值处。

该方法最大优点是能测量不规则形状的细胞，应用时较简便，计算也不复杂，只是在被测物质分布十分不均匀时，才会产生误差。测试使用的是 XFG-01 型显微分光光度计[2]。

2. 扫描方法[3]　这是一种建立在严格的数学基础上的方法。由于测量光点取得比细胞小得多，因此在这样小的范围内，可以认为物质分布是均匀的。从图 2 可知，被测光点中物质总

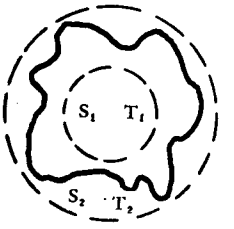

图 1　一波长两区域方法原理示意图

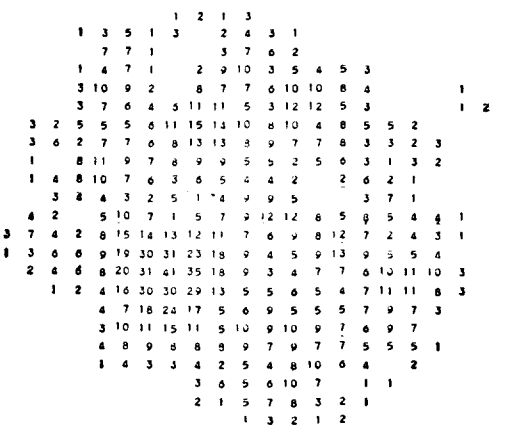

图 2　单个细胞的扫描光密度值分布图

量，是由逐点的光密度值和面积乘积的总和给出。

$$M = m_1 + m_2 + \cdots + m_n = E_1 S_1 + E_2 S_2 + \cdots + E_n S_n$$

其中 M 是被测物质总的相对含量，m 是单个测量点的物质相对含量，n 是总的测量点数。

扫描方法实际上是沿着分析面的连续积分，其平均光密度值 E 可由下式表示：

$$E = \frac{\rho}{S} \sum_{j=1}^{n} \int_{0}^{L_j} A_i dL$$

其中 A_i 为光密度变化值，L 为扫描线长，S 为样品面积，ρ 为扫描邻近线的距离。

本法不仅能给出被测样品吸收光的信息，而且能给出物质分布、大小形状和微细结构。测试使用的是西德 Opton SMP-05 型显微分光光度计。

二、生物学测量结果与分析

我们运用生物学的某些基本结论，通过生物学样品的显微光度测量，对显微分光光度计作一个基本的评价。

1. 以精母细胞与精子细胞核内 DNA 相对含量的比值考核仪器的精确度： 精母细胞与精子细胞的 DNA 含量的理论比值为 4:1，以小白鼠的生殖细胞为实验材料，对仪器测量精度进行考核。

样品制备　剖开小白鼠睾丸被膜，取精细管在甲醇:冰醋酸 (3:1) 的溶液内固定 3 小时；再用 60% 醋酸溶解精管，作成细胞悬液；并制成空气干燥滴片，进行 Feulgen 染色；染色标本的吸收峰为 564mμ.

在测试中我们选择在细线期的初级精母细胞。因此时 DNA 分布要比其它期间均匀，可以减小由于细胞核内 DNA 分布不均匀所产生的误差。

从表 1 可知，一波长两区域方法的精母细胞与精子细胞 DNA 含量比值为 4.06，扫描方法为 4.056，两者相当一致。并与理论比值 4:1 甚为接近。

表 1　精子细胞与精母细胞核内 DNA 相对含量

测量方法	细胞类型	DNA 相对含量	
		每核平均	核数目
一波长两区域方法	精子	30.5	49
	精母	123.9	40
扫描方法	精子	30.0	24
	精母	121.7	22

2. 以牛精子细胞核中 DNA 微区的含量确定仪器的灵敏度： 生物化学方法测出牛精子细胞核内 DNA 绝对含量 M 值为 3.20×10^{-12} 克。用显微光度法测定单个牛精子细胞内局部区域的 DNA 的含量，可得到仪器对微量物质最低探测量。

牛精子细胞样品的制备方法与小白鼠精细胞相同。实验共测量 18 个牛精子细胞核的面积，求得单个核面积的平均值 S_1 为 12.59 μm^2。选择最小测量光点，(直径为 0.5 微米) 照射牛精子细胞核。最小光点的直径是由仪器的光学系统性能和光能探测器的灵敏度决定的。测得最小微区面积 S_0 为 0.2 μm^2，在此微区内，仪器可进行正常的测量。由数值 M、S_0、S_1 可计算出仪器对生物样品测量灵敏度：

$$m = M \frac{S_0}{S_1} = 5.08 \times 10^{-14} \text{ 克 DNA}$$

以上结果证明显微分光光度计可以对微量物质进行测量。

3. 以肝细胞的多倍化现象说明仪器的线性度： Pogo 曾论证成年小白鼠的肝细胞存在多倍化的现象[4]。在小白鼠的肝细胞中可观察到，DNA 含量的增加是和小白鼠年龄有关。在幼年小白鼠中大多数是二倍体，而在成年小白鼠中四倍体与八倍体占优势。基于此结果，我们对成年小白鼠肝细胞中 DNA 进行测量，并就其倍体进行分析。

样品制备是将 0.25M 蔗糖溶液的小白鼠肝组织匀浆加至 0.34 M 蔗糖溶液内，离心，获得分离的肝细胞。在细胞悬液内加入中性福尔马林，使之成为浓度为 10% 的固定液。然后制成细胞涂片，进行 Feulgen 染色。

用扫描方法和一波长两区域方法，分别测得 84 个和 83 个细胞核的 DNA 相对含量。并分别作出成年小白鼠肝细胞内 DNA 相对含量的柱形分布图，见图 3。两种测量方法的柱形分布图，同时反映出肝细胞中存在着 2 倍、4 倍、8 倍和 16 倍体。4 倍和 8 倍体处呈较高峰值。测得结果与生物学规律完全一致，且倍体

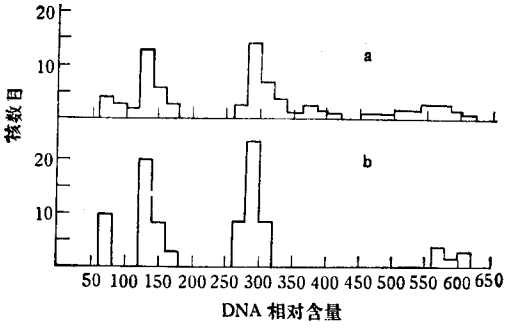

图 3　小白鼠肝细胞核 DNA 相对含量的柱形分布图

a）一波长两区域法，　b）扫描方法

的倍率和相应的 DNA 相对含量之间呈线性关系。这一特点说明仪器电子学系统当讯号在较大范围内变化时，具有较好的动态跨度。

4. 以单倍体细胞核中 DNA 含量检查仪器的重复性　同种的染色体组的 DNA 含量，是恒定的。某一生物单倍体或多倍体的 DNA 含量变化是不大的，有些小的变异可以认为是每个核的生理活动的差异所引起的。这在成年小白鼠的精子细胞核中表现尤为突出。虽然精子细胞在成熟过程中一直在变小，然而核内 DNA 含量却保持恒定。表 2 是用显微光度法测得的10 个精子细胞核的 DNA 相对含量。重复的相同含量的测试，也证实相对含量 M 等于核面积 A 和核的平均光密度 E 的乘积为一常量。10 个精子细胞面积由 45.0μm^2 变小到25.7 μm^2，几乎缩小一倍，而平均光密度值约增加一倍。10 个核的 DNA 相对含量的平均值为 30.36 ± 0.34。此结果表征测量的重复性较好。

表 2　精子细胞核 DNA 相对含量

序号	核面积 A ($m\mu^2$)	平均光密度 E	相对含量 M
1	45.0	0.064	28.80
2	40.4	0.077	31.11
3	39.3	0.076	29.87
4	36.9	0.080	29.52
5	35.7	0.086	30.70
6	*34.6*	*0.089*	*30.97*
7	29.9	0.104	31.10
8	28.9	0.106	30.63
9	26.1	0.115	30.01
10	25.1	0.117	31.08

5. 用生物学标本测定闪光误差：　标本和透镜等其它光学器件上的异物，诸如油迹，灰尘均能引起闪光误差[5]。标本照明面积大，此值也大。DNA 相对含量减低。

闪光误差测试方法是将小白鼠的精细胞用铁-苏木精染色，选择一个直径约为 10 μm，呈圆形的游离核，然后以该细胞的 80% 直径的测量光点，透过细胞中心，测得透射率 T 值。此值越小，则闪光误差亦小。一般小于 1% 为好。被测量仪器的闪光误差均小于 0.8%。

三、小　结

以上结果，充分说明仪器准确地反映了生物学的客观规律。其精确度、灵敏度、线性度等各项性能指标良好。引起测量结果的偏差，主要有下列几方面原因：

1. 系统误差，即仪器本身存在的误差，该类型仪器一般为 0.5%。

2. 在测量过程中，虽然消除了引起系统误差的一切因素后，仍然会存在偶然误差。被测量细胞核 DNA 分布不均匀和细胞的个体差异，可用消除物质分布不均匀所产生误差的测量方法来克服。对于取决于几率的误差，如误差大小和方向，可用增加测量的次数的方法，使偶然误差的算术平均值尽量减小。一般取 20 个细胞以上的统计结果较好。

3. 当制样技术不符合要求时，会造成显著误差。例如，细胞的重叠或过于密集，样品纯度不好，混有其它非测量细胞和细胞碎片。制出样品要求细胞背景均匀，使用的载玻片、盖玻片、试剂染液，封固剂以及操作方法要力求较好的重复性和稳定性。

参 考 文 献

[1] Altert, M. G.: *J. Histochem. Cytochem.* **13**, 161, 1965.

[2] 生物物理所科技处：《生物化学与生物物理进展》，1982 年，第 2 期，第 80 页。

[3] Horst Piller: *Microscope Photometry*, **134**, 1977
[4] Pogo, A. O. et al.: *Exper. Cell Res.*, **17**, 205, 1959.
[5] Naora, H.: *Science*, **115**, 248, 1952.
[本文于 1982 年 7 月 2 日收到]

超氧化物歧化酶活力测定的新方法——化学发光法

李益新　　方允中
（军事医学科学院放射医学研究所，北京）

超氧化物歧化酶（简称 SOD）能够催化以下歧化反应：

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

所以 SOD 具有清除 O_2^- 自由基的能力。由于 SOD 的底物 O_2^- 是一种寿命很短的自由基，所以迄今为止，除了应用脉冲射解技术，进行毫微秒级快速动力学跟踪；或应用快速冰冻结合 ESR 波谱观察，可以直接获得 SOD 与 O_2^- 反应动力学的信息外，一般都采用间接的活力测定方法，如细胞色素 c 还原法[1]，肾上腺素自发氧化法，四氮唑蓝（NBT）法[2]等等，这些方法在测定准确性、灵敏度以及操作手续等方面各有优缺点，但都属于比色分析的方法。

黄嘌呤氧化酶，在有氧条件下，催化底物黄嘌呤或次黄嘌呤发生氧化反应生成尿酸，与此同时产生 O_2^-[3]，O_2^- 进一步与化学发光剂 luminol（3-氨基邻苯二甲酰肼）反应，使之激发，当它返回基态时，就向外发光，这种现象称为化学发光。SOD 能清除 O_2^-，所以抑制了 luminol 的发光，它提供了一种高灵敏度测定 SOD 活力原理的依据。我们用此发光体系，设计了一种测定从牛红细胞中提取的含铜、锌 SOD 活力的方法，称为化学发光法。通过几种发光体系的比较，进一步提高灵敏度，将此法用于 SOD 的辐射失活与自由基作用关系的研究取得较满意的结果[4]。

实　验　方　法

一、化学发光体系及发光测量

黄嘌呤氧化酶（简称 XO），根据 Massey[5] 法从牛奶中提取，贮存在 60% 饱和度的硫酸铵中，浓度为 1mg/ml。用前摇匀，吸取悬液，以每分钟 4,000 转离心 10 分钟，弃去上清，浅棕色沉淀物用 0.05*M* pH7.8 磷酸钾缓冲液溶解至一定浓度。

次黄嘌呤（简称 HX）为英国 Light 公司产品，luminol（简称 L）为英国 Aldrich 公司产品，每次实验前新鲜配制成 0.1 m*M* 的混合液。

化学发光测量应用 LKB Wallac 1250 型发光仪。实验中所用样品管为高 55mm，内径 10mm 的无色透明硬质玻璃管。测量步骤：先注入一定浓度一定量的 SOD 溶液（作空白对照时加 0.05*M* pH7.8 的磷酸钾缓冲液），然后注入 XO，最后加入 HX 和 L 的混合液起动反应，最终反应体积 1ml。从起动反应开始，分别以一分钟末的发光强度值（pH10.2 碳酸钠缓冲体系）和峰值读数（pH 7.8磷酸钾体系）为准进行计算。

二、SOD 活力测定及比活力计算

Cu、Zn-SOD 根据 McCord 和 Fridovich[1] 的方法从牛血中提取、纯化，制得冰冻干燥固体粉末。实验中用 0.05*M* pH7.8 的磷酸钾缓冲液（含 0.1m*M*EDTA）溶解成不同浓度。当上述发光体系中有 SOD 存在时，发光强度下降。以空白对照的发光强度值为 100%，可以计算出加入 SOD 后抑制发光的程度，以此对 SOD 浓度作图，可以得到图 1 的曲线。从图中可以求出抑制 50% 发光程度时 SOD 的浓度，用符号 C_{50} 表示，C_{50} 的单位为 ng/ml。SOD 的比活力测定，可以采用两种测定系统。