

子形成盐键,因此效力稍强于1[#]。

总之,当改变两个吡啶环的连接方式时,由于影响了 >C=O 形成氢键的能力和改变-R的结构,药效就会改变,说明 >C=O 和 >N-R 很可能是此类药物与 DNA 及酶的结合位点。

黄亮教授提供了十种双吡啶化合物,并对本文提出宝贵意见,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 吴冠芸等:《中国医学科学院学报》, 2, 83, 1980.
- [2] 吴冠芸等:《生物化学与生物物理学报》, 14 (6), 553, 1982.
- [3] Black, A., et al.: *Biopolymers*, 6, 1225, 1968.
- [4] 刘敬忠等:《中国医学科学院学报》, (付印中)
- [5] Wu Gy, et al.: *Abstracts of Papers Presented at the 12th International Congress of Biochemistry*, Perth, Western Australia, 15, August, 1982.

[本文于1983年12月29日收到]

技术与方法

谱 带 程 序 分 析

——显微光度术生物医学应用程序研究之一

李 素 文 薛 绍 白

(北京师范大学生物系)

显微光度术是光学显微镜技术和光度测量技术巧妙的结合,它能对显微镜分辨范围内的样品微区进行光吸收、荧光、反射光和光的干涉等测量,从而可以进行物质的定量分析,同时还可以结合对样品的形态学观察达到定位目的,因此它在生物医学中获得了广泛的应用。

它的应用还有两个重要的方面^[1]: 一个是波长扫描(wavelength scanning); 一个是面积扫描(area scanning)。不论做波长扫描还是做面积扫描,都必须有相应的部件以及一些记录和显示设备,此外还应配备一些应用程序。但是由于生物学和医学中所研究问题的复杂性、由于所配备部件和应用程序的不完善性,因此根据波长扫描和面积扫描的原理,再灵活地设计一些应用程序是有必要的。本文就是介绍和讨论这方面的一些应用程序。

一、光谱程序设计

吸收光谱和荧光发射光谱在生物学、医学

领域中应用十分广泛。吸收光谱的表达式为:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_o(\lambda)}{I_s(\lambda)}$$

式中 A 为光吸收; I_o 为透过背景的光强度; I_s 为透过样品的光强度; λ 为波长。

表观荧光发射光谱的表达式为:

$$E(\lambda) = E_s(\lambda) - E_o(\lambda)$$

式中 E 为表观荧光强度; E_s 为样品的荧光强度; E_o 为背景荧光强度; λ 为波长。由于光电倍增管对不同波长光的灵敏度不同; 由于各种光学部件(例如单色器, 双光束分离器等)对不同波长光的作用不同, 所以必须对上述有畸变的表观荧光发射光谱进行校正, 校正的荧光发射光谱表达式为:

$$E'(\lambda) = \frac{E_s(\lambda) - E_o(\lambda)}{E_k(\lambda)} \times P_k(\lambda)^{[1]}$$

式中 E' 为校正后的荧光强度; E_s 为样品的荧光强度; E_o 为背景的荧光强度; E_k 是色温为 k 的一只碘钨灯在测量条件下的辐射强度; P_k 是

一个减少噪音的方法是编设一段光滑子程序。最常用的一个五点三次平滑公式可参看文献[2]。平滑程序可以在任何一个谱或者带测量之后加以调用。⑥光谱的显示或记录：根据计算机外设的条件主要有几种方式：描图仪上描图、显示终端上显示或者在打印机上打印光谱数据。对于谱形，坐标的显示和记录同样也要依不同仪器要求设计子程序。在描图仪或者显示终端上描图比打印机直观，可以及时观察和发现问题，可以使几个谱叠加显示进行比较。

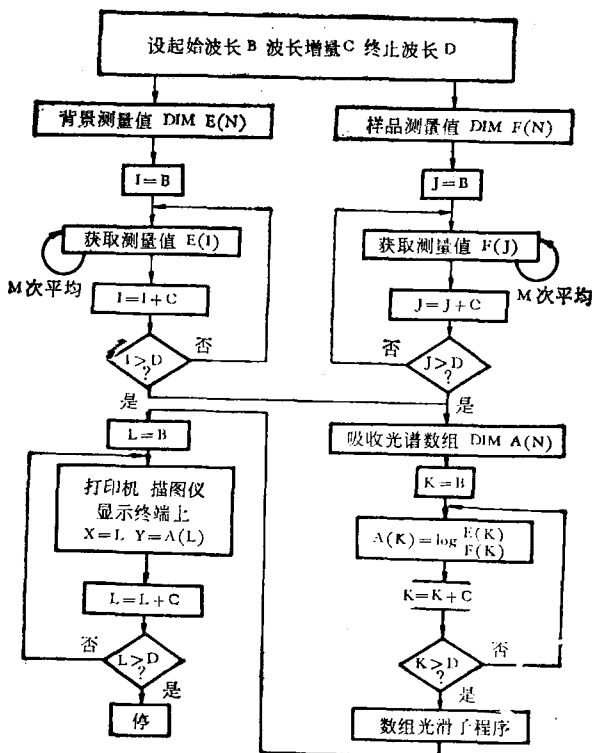


图1 吸收光谱程序流程示意图

色温为 k 的黑体的普朗克辐射分布； λ 为波长。

从图1可以看出，它主要包括：①设定初值，如起始波长、波长增量和终止波长。②设定数组：从图1和光谱表达式可以看出，做吸收光谱要设三个数组，做校正的荧光发射光谱要设四个数组。③波长扫描、获取测量值，这一步是光谱程序的核心。它包含两个子程序，一个是控制波长位置的，另一个是从光度计获取测量值的。这两个子程序依不同仪器的接口指令而设计。如果缺乏波长扫描的部件，可以利用手动单色器改变波长位置，其它程序部分仍可以利用。当作荧光发射光谱时，利用手动单色器会使测量时间延长而造成荧光消退，因此测量时必须使用自动快门。④数据换算：两种光谱各按其相应的表达式进行数据换算，换算之后的光谱数据存放于一个新的数组中。⑤光滑谱形、减少噪音，不论是波长扫描还是手动改变波长位置，测量时噪音都很大。噪音引起的误差是统计误差，可以通过增加测量次数降低之。另

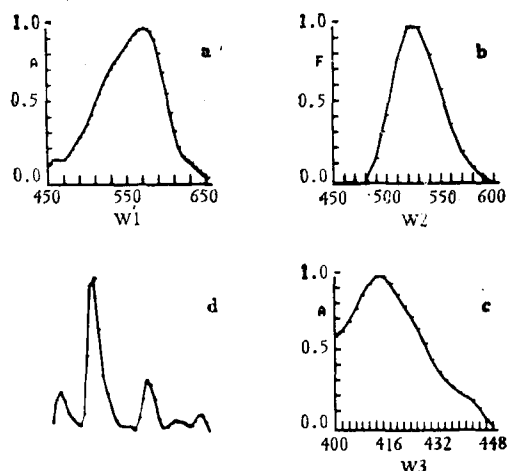


图2 光谱和光密度图

a. 小鼠肝细胞核 Feulgen 染色的吸收光谱 b. 铀玻璃的荧光发射光谱 c. 红血细胞吸收光谱 d. Hela 细胞组蛋白的酸——尿素聚丙烯酰胺电泳光密度图

光谱程序应用举例 图2为MPV II型显微分光光度计和HP-9825S台式计算机连机操作下，利用上述的光谱程序，在显示终端 Tektronix 4006-1上显示的谱形。图2a为Feulgen染色的小鼠肝细胞核的吸收光谱。其谱形和峰值位置与Mariano^[3]等的报道一致；图2b为用紫外光激发铀玻璃产生的校正荧光发射光谱。其谱形和峰值位置与Piller^[1]的报道一致。图2c为人红血细胞的吸收光谱，这与Orkin^[4]的报道相同。图2d为Hela细胞组蛋白的酸——尿素聚丙烯酰胺电泳光密度图，从图中可以分辨出H1、H4和H2A+H2B+H3三个峰。

二、剖面图程序设计

分析染色体带型、测量细胞直径、细胞核直径,核质比和探求沿被测物体某一方向上物质分布等情况时,剖面图程序非常有用。剖面图指:沿被测物体的一个方向进行扫描,同时顺序存贮各扫描点的光度值,然后在描图仪或者显示终端上画出图形。横坐标对应扫描点位置,纵坐标对应扫描点光度值。再依据剖面图,结合生物学研究课题,进一步作数据处理,并分析结果。此程序可以和多种光度测量手段相配合,例如可以作光透射带型分析,光吸收带型分析,荧光带型分析。测量光栏可选用圆形的或矩形的。扫描步距可根据设备和扫描对象选用 $0.1\ \mu\text{m}$ 、 $0.5\ \mu\text{m}$ 和 $10\ \mu\text{m}$ 等各挡。七十年代 Wheless 等人^[5] 发展了缝扫描细胞荧光光度术 (Slit-Scan Cytofluorometry)。这种技术实际上是荧光光度术、剖面图程序和一套专用数据处理程序的结合。缝扫描细胞荧光光度术成功地区别了一些肿瘤(例如宫颈癌、膀胱癌)的癌细胞和正常细胞,为临床诊断提供了很有价值的信息。又如利用原位电泳技术^[6]、荧光剖面图程序和专用数据处理程序,可以计算出细胞膜上分子的电泳率和扩散系数。

剖面图程序的流程示意图和光谱程序的流程示意图有很多相似之处,不同的是要将光谱程序中的波长扫描改为面积扫描。

利用这个程序,如果没有光密度计时,可以扩大显微光度计的应用范围,作样品的光密度图。

下面介绍几个剖面图应用程序。图 3 为缝扫描细胞荧光光度术示意图。细胞用荧光染料吖啶橙染色,在荧光显微镜下清楚地显示出它的细胞质与细胞核轮廓,然后在显微荧光分光光度计上用一个缝扫描细胞,可以获得一个荧光剖面图。从剖面图中可以获得细胞的核质直径比和核的荧光(核荧光反映 DNA 的相对含量)。

图 4 为用缝扫描荧光光度术测定的人宫颈癌样品。这种技术比常规的扫描法测量快,占

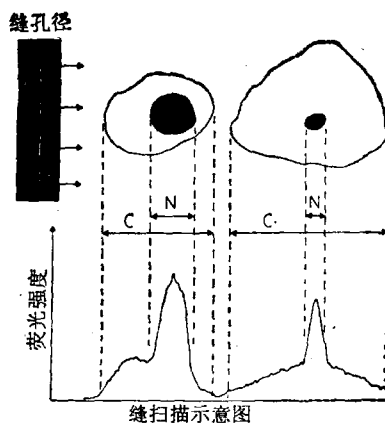


图 3 缝扫描细胞荧光光度术示意图^[5]

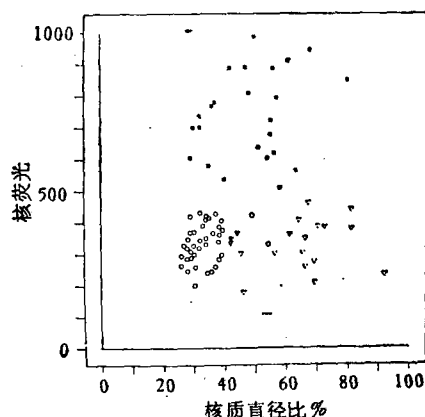


图 4 人宫颈癌样品的核质直径比和核荧光^[5]

○ 间层鳞状上皮细胞 ▽ 宫颈内层细胞
● 非角化的增生细胞

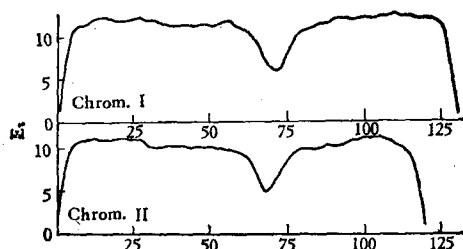


图 5 有肋螈 (*pleurodeles Waltlii*) 中期染色体 I 和 II 的清光剖面图^[7]

用的计算机内存少。国外已用这种技术在宫颈癌细胞和膀胱癌细胞的预筛工作中取得很大成就。

图 5 为有肋螈^[7]中期染色体经 Feulgen 染色,然后在显微分光光度计上扫描每一条染色体,作出的清光剖面图。横坐标为染色体的长度;纵坐标为每点的消光值。从剖面图中可以获得每一条染色体的长短臂之比。利用这种技

术,可以对各种畸形染色体进行定量识别研究。

综上所述可以看出,显微光度术不仅在定量测量方面,而且在光谱分析和剖面图分析的应用中也是一种很有价值的技术。

参 考 文 献

- [1] Piller, H.: *Microscope Photometry*, 1977. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
[2] 中国科学院数学研究所主编:《BASIC 语言常用算法程序汇编》,中国铁道出版社。

- [3] Mariano, A. et al.: *Introduction to Quantitative Cytochemistry I.* (Wied, G. L. et al. eds.), 1966, 215—239, Academic Press New York and London.
[4] Orkin, S. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 98—102, 1975.
[5] Wheelless, L. L. et al.: *Acta Cytol.*, 17, 333—339, 1973.
[6] Mu-ming Poo: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10, 245—276, 1981.
[7] Bailly, S. et al.: *Introduction to Quantitative Cytochemistry II.* (Wied, G. L. et al. eds.), 1970, 87—103, Academic Press, New York and London.

[本文于1983年10月17日收到]

人胎 γ -GT 的浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳与等电聚焦电泳分析

吴祥祺 周德义 梁熙南 魏琦

(广西医学院生化教研室, 南宁)

自 Hanes 描述 γ -谷氨酰转肽酶(γ -Glutamyl transpeptidase), 简称 γ -GT, E.C.(2, 3, 2, 2)以来, 许多作者对哺乳动物、特别是对人(包括病人)的血清和某些组织的 γ -GT 进行了大量研究^[1-3]。但除人胎肝外^[4], 肾、脾、胰、十二指肠和胆汁中 γ -GT, 迄今国内、外报道尚少。

本文比较了人胎肝、肾、脾、胰、十二指肠和胆汁匀浆中 γ -GT 比活力的强弱, 匀浆经 Triton X-100 处理、硫酸铵分级分离, 进行 4—30% 浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳比较各组织 γ -GT 的电泳行为和等电点。

一、材料与方 法

1. 样品收集 从妊娠 3—8 月经人工流产的 40 个胎儿中采取肝、肾、脾、胰、十二指肠和胆汁, 将各胎儿相同组织分别混合, 贮存于 -10°C , 三星期内应用。

2. 试剂与仪器 N-甲萘基盐酸二氨基乙烯(简称 NED $\cdot$ 2HCl), Sigma 出品。电泳用高分子量标准蛋白, Pharmacia 产品。 γ -谷氨酰对

硝基苯胺, 进口分装。Ampholine (pH4—10)、Triton X-100 等试剂均为国产。梯度发生器和管状梯度凝胶制备装置自制。

3. 方法

(1) 总酶活力测定 根据 Tate 和 Meister 改良法^[6]。取底物 2ml (0.05mole/l Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)、2.5mmole/l γ -谷氨酰对硝基苯胺、20mmole/l 双甘肽、75mmole/l NaCl)、酶样品 50 μ l, 37°C 水浴保温 30 分钟后立即加入 1.5N 醋酸 2ml 终止反应。在 410nm 下测光密度, 求酶活力单位 (37 $^{\circ}\text{C}$ 下 1 分钟使底物转变为 1 μ mole 产物的酶量称为 1 个单位)。

(2) γ -GT 分级分离 分别在人胎肝、肾、脾、胰、十二指肠及胆汁中加入四倍体积 0.01 mole/l Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0、含 1.5 mole/l NaCl), 组织捣碎机匀浆、过滤、滤液中加 1% Triton X-100, 4°C 搅拌 3 小时, 20—70% 饱和度硫酸铵分级沉淀, 40,000 $\times$ g 离心 1 小时, 沉淀对 0.01mole/l Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)透析。用透析后的液体进行各项试验。

(3) 分子量测定 参照 Kojima 等^[7]方法