

一种测量细胞面积的显微光度方法

池旭生 庞大本

(中医研究院中心实验室)

细胞生物学研究中广泛应用显微分光光度计测定单个细胞中特定物质的含量。通常在测含量的同时还要求获得单个细胞内此种物质分布的面积。对形状规则的被测物质,一般常用目镜测微尺测出长度,再算出面积。但这种方法不仅费时,费力,而且不适于测量形状不规则的单个细胞。我们在采用双区法,在测量物质含量的同时,可以很方便地测出不规则形状细胞内被测物质所占的面积。

显微分光光度计测量物质含量的方法中常用的有两种——双区法和双波法。在公式推导中有一项被测物面积: $B(1 - F)$, 其中 $(1 - F)$ 是测量光阑面积中含有被测物部份所占的百分数, B 是测量光阑面积。

在双区法中 $(1 - F) = \frac{1 - T}{1 - T^*}$ (其中 T^* 是测量

光阑范围内有物质部份的平均透光度, T 是测量光阑范围内整个面积上的平均透光度)。从理论推导及计算机模拟都可以证明, 只要小区的 T^* 是代表全部被测物质上的平均透光度, 那么就能精确地计算出被测物质部份的真正面积。但是, 在实际测量中, T^* 往往偏离真正的平均透光度, 再加上仪器的测量误差, 因此最后得到的面积值会有一定误差。我们的实验表明, 双区法求得的面积与目镜测微尺测量的结果很一致, 而重复性要比测微尺测量的好。

为了评定双区法测量面积的精度, 我们测量十个接近圆形的细胞核, 求得其直径和面积; 同时, 由有经验的人用目镜测微尺仔细目测直径, 计算面积。两种方法测量的数据列于表 1。可以看出, 对于接近圆形的被测物体, 两种方法的结果是一致的。

表 1 双区法测量规则形状的细胞直径和面积

样品序号	目测直径 (mm)	双区法测量十次的结果					
		平均直径 $\bar{D}(\text{mm})$	标准差 (SD)	变异系数 (C.V.)%	平均面积 $\bar{S}(\text{mm}^2)$	标准差 (SD)	变异系数 (CV)%
1	7.00	6.83	0.17	3	36.69	1.85	5
2	7.00	6.85	0.13	2	36.89	1.39	4
3	10.00	9.67	0.15	2	73.48	2.34	3
4	8.00	7.93	0.16	2	49.35	2.06	4
5	10.50	10.49	0.21	2	86.48	3.36	4
6	12.00	11.48	0.12	1	103.50	2.23	2
7	12.50	12.11	0.17	1	115.13	3.34	3
8	10.00	10.57	0.24	2	87.72	4.01	5
9	10.00	9.79	0.08	1	75.27	1.24	2
10	10.00	9.89	0.17	2	76.87	2.71	4

我们还选择了两个很圆的细胞, 由十个人分别用目镜测微尺测出直径, 求得面积。与双区法测量的结果比较 (表 2), 可以看出读目镜测微尺测量的标准差 (SD) 和变异系数 (CV) 都远大于双区法。也就是说, 双区法测量的重复性比目镜测微尺测量的结果好得多。

对于形状不规则的样品, 如分叶细胞核, 很难用目镜测微尺测量。我们用双区法测量十个细胞, 每个细胞测量十次, 求出平均值、标准差、变异系数 (表 3)。

可以看出, 由于细胞核受形状所限, 只能选取被测物中极小一部份测量 T^* , 因此很易偏离真正的平均透光度, 测量误差较大, 变异系数均大于测量圆形细胞的情况, 但仍比用目镜测微尺直接读数测圆形细胞时小。考虑到形状不规则的样品面积很难用别的方法测定, 而双区法简便易行, 又可在测量相对质量的同时顺便获得面积值, 因此是一个有实用价值的方法。

表2 双区法和目测法测同一细胞核的比较

测次	目测法		双区法	
量数	D	S	D	S
1	12.5	122.72	13.97	153.33
2	13.0	132.73	13.74	148.27
3	12.7	126.68	14.06	155.30
4	12.2	116.90	14.02	154.35
5	14.0	153.94	13.97	153.25
6	15.0	176.72	14.25	159.37
7	15.0	176.72	14.29	160.49
8	14.5	165.13	14.01	154.09
9	15.0	176.72	13.96	153.00
10	13.5	106.03	14.17	157.78
平均值	13.14	145.43	14.04	154.92
SD	1.05	26.06	0.16	3.37
CV%	8	18	1	2

表3 双区法测量不规则形状细胞面积

样品序号	平均面积 $\bar{S}(\text{mm}^2)$	标准差(SD)	变异系数 (CV)%
1	31.81	1.89	6
2	27.80	2.98	11
3	38.86	2.67	7
4	38.32	6.12	16
5	82.09	5.97	7
6	57.93	7.95	14
7	59.11	5.96	10
8	46.90	3.70	8
9	52.84	1.18	2
10	145.29	10.57	7

[本文于1985年1月26日收到]

（上接第74页）

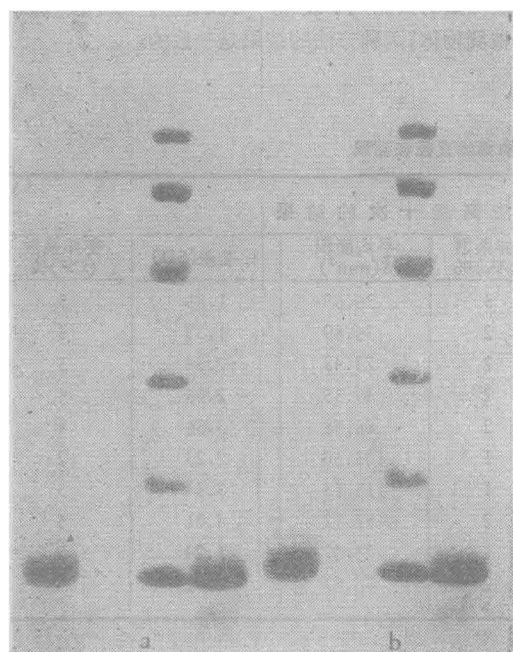


图3 人血红蛋白A链的PEAG图谱

- (a) 为均匀浓度胶, 浓度20%, 交联度2.6%, 厚度0.5 mm
(b) 为梯度胶, 浓度10—20%, 交联度2.6%, 厚度0.5 mm。

们自行设计了一种简易实用的聚丙烯酰胺凝胶干燥装置, 制作方便, 花费低廉。干燥后的胶片样品色带清晰如故, 对较浓、较厚、或梯度浓度胶的效果均十分满

意。只要小心操作, 基本上无干裂及破损现象。干燥后的胶片可供照相复制或长期保存, 适宜于一般实验室应用。

一、装置的构造 如图1所示

二、使用方法 1. 电泳条件参照 Laemli^[1]。电泳完毕后取出胶片, 用考马斯亮蓝染色, 并以脱色剂彻底脱色。2. 脱色后的胶片浸在含55% 甲醇及10% 甘油溶液中1—1.5小时, 使其略微收缩, 胶质密实。3. 取出胶片放在预先用脱色液湿润的滤纸(5)上, 将玻璃纸(4)在脱色液中浸一下后覆盖在胶片上, 用手轻压除去胶片与滤纸及玻璃纸之间的气泡, 再盖上滤纸(3)。4. 按图1所示, 将铜丝网(2.6), 橡皮板(7), 铝板(1)分置于上下压紧, 四周用铁夹夹好固定。注意在橡皮板(7)内层边缘需预先涂上一层薄薄的真空硅油, 以免抽真空时漏气。5. 连接真空泵与抽气口(8), 泵启动后, 橡胶板(7)与铝板(1)即刻被压紧贴实, 同时在铝板(1)上方约30—40cm处用一个红外灯加热1.5小时左右, 温度50°—70℃, 即可得到完全干燥的胶片。如要长期保存, 不致因吸水而破裂, 最好存放在干燥器中。

三、结果 从图2和图3可见, 经本装置干燥后的胶片, 其电泳谱带仍十分清晰。

参 考 文 献

- [1] Laemli, V. K.: *Nature*, 227, 680, 1970.

[本文于1983年7月18日收到]