

技术与方法

甾体受体测定中的误差估计及数据处理方法

褚 红 景 沛

(中国科学院,上海生物化学研究所)

受体参数的测定对于某些疾病的诊断、治疗及预后的考察具有重要意义。但若各实验室采用不同的受体测定及数据处理方法,则得到的结果也将不同^[1]。因此,如何准确估计各实验方法的误差和定量测定受体参数(包括解离常数 K_d 及受体浓度 C_R) 已为人们所关注。本文就各受体测定方法所可能产生的误差及各数据处理方法之局限性做一简单介绍。

方法及误差估计

一、测定过程中放射性甾体(配基)丢失的影响

放射性甾体在受体测定过程中很易被玻璃及塑料表面吸附。在移液、平衡及以后的分析过程中都可能产生吸附现象。有文献报道孕酮和 R5020 在聚丙烯管中平衡时,溶液中孕酮和 R5020 的百分数分别为: $97 \pm 5 (n=55)$ 和 $84 \pm 7 (n=48)$ ^[2]。平衡时的转换也会引起甾体丢失。低温下短时期内甾体的代谢可忽略,但若延长平衡时间或提高温度则应考虑甾体的代谢稳定性。计算受体参数时,游离甾体量是由总加入甾体量与总结合甾体量之差得到的。故若甾体丢失就会使 K_d 及 C_R 值产生误差。结合甾体的过高测定使 K_d 值偏低(即表观亲和力增大)及 C_R 偏高;游离甾体的过高测定则使 K_d 值偏高(即表观亲和力下降),但对 C_R 的影响较小。若丢失甾体量与游离甾体量不成比例,则 Scatchard 图就会变形。

二、DCC 法去除游离甾体对结果的影响

在 DCC 法分离结合和游离甾体中,活性碳浓度不同,结果就不同。活性碳浓度过低,吸附不完全,测得的结合过高, K_d 值偏低;反之,则 K_d 值偏高。上述误差在一般情况下较小,但随配基浓度增大而增高。活性碳因其颗粒大小不均而造成沉降速度不同,也会产生误差,使测得的结合过高而导致 K_d 值偏低。此外,在用 DCC 法时非特异结合组分会解离,且这一解离与 DCC 接触时间及温度有关。有人比较了 DCC 和 PEG 法测定孕激素受体得到的结果后指出:在 30% 甘油存在下,4℃ 接触 30 分钟,孕酮的非特异结合比 PEG 法得到的结果低 20%。目前,已有人对上述误差原因进行了理论分析,并提出了校正公式。

三、内源甾体的稀释和占位对结果的影响

大多数靶制剂中都存在一定量内源甾体,并影响受体参数的准确测定。在受体测定时,同非特异组分结合的内源甾体很易与放射性甾体交换,并对放射性甾体进行稀释,从而降低了放射性甾体的比度,使测得的 K_d 值偏高。这一误差随内源甾体浓度的增大而增高。此外,内源甾体本身还可能占据一定数量的胞浆和核受体结合位点,而加入的放射性甾体在短时间内又不能完全与之交换,使测得的 C_R 值偏低。升高温度或延长平衡时间可加强这一交换,但又可能引起受体失活,产生新的误差。

四、放射性计数统计误差对结果的影响

许多人在受体测定时没有规定放射性样品的计数统计误差,这就可能使最终结果产生较

大误差。有人报道当样品计数统计误差为 0.5% 或更小时, PEG 法得到的结合部分相对误差为 2—4% (C.V)。事实上, 一般的液闪计数器很难达到上述要求, 故实际变异远大于理论值。为此, Aromitage 提出一种计算理论统计误差的方法。但此方法对 B/F 值的误差计算是近似的, 因为它假设 B 和 F 是两个互相独立的变量。而实际上这两个量并非真正独立。故由此得到的 B/F 表观误差小于其真正的误差。

五、非特异结合校正对结果的影响

各类组织中除含特定的甾体激素受体外, 还有一些能结合配基但与该受体无关的物质, 这一类结合称为“非特异”结合。非特异结合严重干扰了受体参数的测定, 因此在一般情况下都需进行校正。

非特异结合测定方法有多种^[2]。最常用的是: 在一系列实验管中含有不同浓度的放射性甾体, 平行管中均加入 100 倍过量的非放射性甾体以降低其比度。这样在高比度下测得的是总结合(特异+非特异); 减去在低比度下测得非特异结合, 所得两者之差即为特异结合。无论各方法复杂程度如何, 它们都是建立在这一假定上: 放射性甾体与非放射性甾体对受体及其它结合组分的亲和力和动力学过程完全一致。因此, 只有当实验中所用的放射性甾体化学结构与非放射性甾体一致且系统完全达到平衡时, 才有可能对非特异结合进行有效校正。若两者不一致(如雌激素受体测定中 DES 取代雌二醇), 就有可能产生误差。已有文献报道当有不同化学结构的竞争剂存在时, 系统达到平衡所需时间远较无竞争剂存在时为长。

六、单点检测法对结果的影响

人们常在高配基浓度, 受体接近饱和的条件下用单点法测定 C_R 。此时加入的放射性配基量应视受体及非特异结合组分浓度而定, 一般必须达到使 90% 以上受体饱和才行。故当受体浓度较高时, 加入的放射性配基量也需较高, 这样才能保证结果可靠。然而, 有文献指出: 即使配基量很高, 受体测定仍将产生误差, 有时这一误差会很大。Hammond 等人报道了单点法

和 Scatchard 作图法得到的人子宫胞浆孕激素受体浓度结果之比较后指出: 当使用较低甾体浓度时, 单点法的结果远低于 Scatchard 作图法; 即使在较高甾体浓度时, 前者的结果与后者相比仍有较大差异。

受体参数测定中的数据处理方法

受体参数的准确测定不仅依赖于所选用的实验方法, 还取决于数据处理方法^[2,3]。因此, 为得到一满意结果, 除尽量减少实验误差外, 还需选用一合理的数据处理方法。因不同处理方法都各有其适用范围^[4]。随着计算机技术不断发展, 微机在受体参数计算中也得到了广泛应用, 使受体参数测定结果更加准确。下面就介绍一些常用数据处理方法及其适用范围, 仅供大家参考。

一、Scatchard 作图法

这是用得最多的一种线性作图方法。其优点在于作图简便, 结果直观, 可直接从图上得到受体参数而不需任何复杂计算, 若伴以合理的回归计算方法则可使结果更可靠。但该法是以 B/F 对 B 作图, 而 B 和 F 又是两个相互关联、带有误差的变量, 故结果误差往往较大。尤其是在低配基浓度区, 系统中受体远没有达到饱和, 此时非特异结合量很低(因为非特异结合的解离常数远大于特异结合), 但当用前述方法校正非特异结合时, B 及 F 的误差很大, 往往使非特异结合测定过高, B/F 值下降, 导致 Scatchard 图在此区域内发生弯曲甚至回折。这一现象给回归计算也带来困难, 使结果准确性大大降低。

二、Woolf 作图法

该方法是 Michaelis-Menten 方程的另一种线性变换。它以 F/B 对 F 作图。由于在受体测定中 F 的误差要小于 B , F/B 的误差小于 B/F ^[3], 所以, 采用 Woolf 作图所产生的误差要小于 Scatchard 作图, 这在低配基浓度区尤为明显。故该方法更适合于各种回归计算。但该方法的直观性较 Scatchard 作图法为差, 不能直接从图上求得 K_d 和 C_R , 而需经计算才能得到, 这

很可能是其使用不及前者广泛的原因之一。

三、非特异结合的作图校正法

Chamness 等人^[5]认为通过竞争方法测定非特异结合并不可靠。因为若非放射性配基量太少,则竞争不完全,使非特异结合值增高;非放射性配基量太多,又可能竞争一些低亲和力结合组分,使非特异结合值降低,而引起误差。为此,他们提出一种通过直接作图校正非特异结合并计算受体参数的方法。他们认为:当受体组分完全饱和后,Scatchard 图在高配基浓度区 B/F 值趋近于一极值,以该极值乘以每个实验点的游离配基浓度,即得该点非特异结合值。虽然,该方法以直接作图方式进行非特异结合校正并计算受体参数,避免了竞争结合带来的误差,简化了实验程序,但由于在实验中不可能做到使受体完全饱和,故该极值只能通过外推得到;此外,该作图过程还带有很大的随意性,产生的误差也就可能较大。

四、不同回归计算方法比较及微机在受体参数计算中的应用

目前,最常用的回归计算方法是最小二乘法。该方法对正常数据可得较准确结果。但在许多实验中由于各种原因经常会使实验点发生偏离,在此情况下该方法得到的结果往往会产生偏差,有时该偏差很大。这是因为该方法本身有一些假设在实验中不能得到满足,如自变量应没有误差或误差很小(对 Scatchard 作图是 B , Woolf 作图是 F); 应变量误差是均匀的(对 Scatchard 作图是 B/F , Woolf 作图是 F/B); 应变量误差与自变量误差不相关等,故当实验中出现偏离点时,该方法计算结果就会产生偏差,且偏离点越多,偏离程度越大,产生的偏差也越大。为此有人提出了一些其它回归方法,如加权回归法等^[6]。该方法是对不同的实验数据进行统计学处理,然后按各实验点偏离程度分别加上不同的权重(即使它们在曲线中所占的比重不同,偏差大的比重小,反之则大),再进行一系列数据处理,得到一比较接近于真实值的结果。由于该方法计算比较麻烦,故长期以来鲜为人知,很少被采用。针对此情况我们

用 BASIC 语言在 TRS-80 型微机上编制了一套程序进行计算,结果表明:该方法确优于前者。

结 语

总之,受体参数测定中由于种种原因而产生误差,但这些误差并非无法避免或不能估计。只要所选用的试剂、方法及计算合理,完全有可能将误差控制在最小范围内。现根据上述内容加以概括提出下列注意事项,供参考。

1. 馏体在平衡或分析中的丢失将产生各种误差,故当实验条件改变时(如反应管、平衡时间及温度等),需要重新选择适用的实验条件。

2. DCC 法分离结合和游离馏体时,必须严格控制 DCC 浓度及接触时间和温度(文献报道一般为 DCC 浓度 0.5—1%, 0°—4°C 接触 10—15 分钟),以避免产生误差。所用的活性碳在使用前需经过离心预筛选,将那些离不下来的小颗粒活性碳丢弃。

3. 内源馏体不仅占据结合位点,而且会对分析中使用的放射性馏体进行稀释而降低其比度。通过校正比度可测定内源馏体浓度,但必须在放射性馏体与内源馏体达到平衡的条件下进行。一些人采用在平衡前先以 DCC 短间接触的方法去除内源馏体,这样虽能去除一部分,但同时又可能因此使受体失活,而产生新的误差。

4. 计数统计误差对结果的影响是很明显的,它不仅存在于实验中,而且在实验采用的放射性馏体中也存在。因为放射性馏体的比度是通过测量放射性强度而得到的,按英国放化中心(Amersham)报道,该比度的测量误差为 10—20%,而受体参数的最后计算是从放射性强度计算到化学浓度的,故这一计数统计误差对结果的影响是很大的。

5. 非特异结合校正至今还没有一完全可靠的方法。因此,实验中必须注意到由此引起的各种误差。

6. 单点法得到的 C_R 总低于作图法。因此,它仅适合于临床上正常与病人之间的相对测

凝胶中 ^3H , ^{14}C 和 ^{35}S 同位素测定的快速荧光自显影方法

王苏生 舒群芳 周 芬

(中国科学院遗传研究所, 北京)

近年来,对聚丙烯酰胺凝胶中的 ^3H , ^{14}C 和 ^{35}S 等放射性测定的荧光自显影(fluorography)方法已经得到广泛应用^[1,2]。上述这些同位素均发射软 β -射线。而 ^3H 所发射的 β -粒子能量最低 ($E_{\max} = 18.6\text{KcV}$), 它的射程很短。由于凝胶与 X-光底片之间的间隙以及凝胶对射线的吸收作用等原因,一般不能达到感光底片产生放射自显影作用。

荧光自显影技术的发展,使得凝胶中 ^3H 同位素的测定成为可能,同时也大大提高了 ^{35}S , ^{14}C 放射自显影的灵敏度。荧光自显影方法的基本原理是在凝胶中渗入某种荧光体,当放射性同位素 ^3H , ^{14}C 等发射的 β -粒子作用于荧光体时,便产生多个光子,光子作用于 X-光底片上的感光乳胶,使其感光。

通常选用的荧光体是 2, 5-二苯基噁唑(PPO)^[3,4]。将 PPO 溶于二甲基亚砜(DMSO)中,用此溶液浸泡凝胶,然后再用水洗除 DMSO,干胶后对 X-光底片曝光。由于 PPO 毒性较大,价格昂贵,操作也不方便。后来有人发现以水溶性的水杨酸钠作为荧光体代替 PPO,仍能取得较好效果^[5]。此外还发现对 X-

光底片作预曝光处理,能提高自显影的灵敏度^[6]。而在 -70°C 低温条件下对底片曝光也是必要条件^[7]。

本文综合以上方法,全部采用国产试剂和 X-光底片,试验了水杨酸钠的浓度以及底片预曝光的不同强度对 ^3H 标记蛋白质荧光自显影的影响。确定了一个经济而快速的荧光自显影

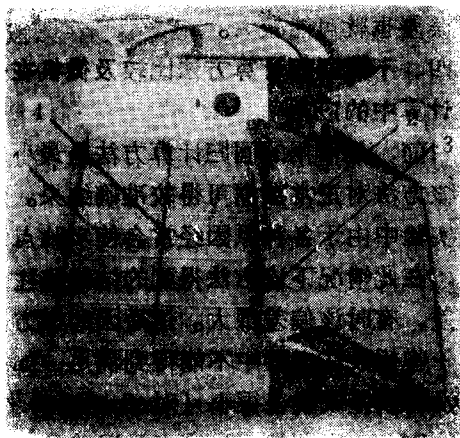


图 1 平板凝胶干燥器

1. 恒温加热板, 2. 多孔滤板, 3. 密封硅橡胶片, 4. 抽气管道。需要干燥的凝胶, 放置在滤纸上, 然后移到多孔滤板上复以密封硅橡胶片, 接通真空管道, 抽真空约 1 小时。胶便干燥成固体薄片。

参 考 文 献

量。

7. 各种作图法和回归计算方法均有其各自的适用范围, 故必须视实验情况而选用合适的方法。若数据中有偏离点时, 最好采用加权回归法计算, 绝不能随意丢弃实验数据(除非从统计学角度认为是可以丢弃的)。若将微机用于受体参数计算, 则结果将更可靠。

- [1] Braunsberg, H. et al.: *J. Steroid Biochem.*, 11, 1561, 1979.
- [2] Braunsberg, H. et al.: *ibid.*, 13, 1147, 1980.
- [3] Keightley, D. D. et al.: *ibid.*, 13, 1317, 1980.
- [4] Braunsberg, H.: *Recent Results in Cancer Res.*, 91, 18, 1984.
- [5] Chamness, G. C. et al.: *Steroids*, 26, 1975.

[本文于 1986 年 5 月 12 日收到]