

技术与方法

放射配体结合系统参数估计的改良作图法及 计算机迭代法

徐 端 正

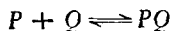
(上海医科大学药理学教研室)

提 要

本文介绍放射配体结合系统具有两个结合位点时的改良作图法及计算机迭代法,前者可应用代数法解得参数,其优点可避免传统作图法的主观误差;后者可应用曲线拟合法解得参数,能求出估计参数的 95% 可信限,并可绘出 Scatchard 曲线及饱和曲线。该两法与 Barlow 的计算结果很接近,而较 Barlow 法简便且正确。

放射配体结合系统的数学模型

配体 P 与结合分子 Q 有可逆反应



在放射免疫测定、酶学、小分子-蛋白相互作用、酸碱平衡以及很多其他生物化学系统皆服从此规律。配体可以是蛋白、金属离子、抗原或其他大分子,结合分子可以是某化学物质或抗体。这些反应一般可假设为符合二阶化学动力学模型,即由结合-解离反应而达平衡,其亲和力常数为

$$K = [PQ]/[P][Q]$$

Scatchard 曾给出一个简单的离子-蛋白反应方程:

$$R = K(N - B) \quad (1)$$

这里 N 为结合分子 Q 的总浓度,或称最大结合浓度; B 为结合配体的浓度, R 为配体的结合比。方程(1)表示用结合比 R 对结合浓度 B 作图呈直线,其斜率为 $-K$,在横轴上的截距为 N ,这就是著名的 Scatchard 直线作图法。

如果系统为 n 个配体及 m 个结合位点,相当于方程(1)的一般式应为

$$R_i = \sum_{j=1}^m K_{ij} N_j / \left(1 + \sum_{\alpha=1}^n K_{\alpha i} [P_{\alpha}] \right) \quad (2)$$

以上 K_{ij} 代表第 i ($i = 1, 2, \dots, n$) 个配体对于第 j ($j = 1, 2, \dots, m$) 个结合位点的亲和力常数; N_j 为第 j 个结合位点的最大结合浓度。为简单起见,本文仅考虑系统为单配体及两个结合位点,即 $m = 2, n = 1$ 的情况,这时方程(2)可简化为

$$R = \frac{K_1 N_1}{1 + K_1 [P]} + \frac{K_2 N_2}{1 + K_2 [P]} \quad (3)$$

以 $[P] = B/R$ 代入,式(3)可化为

$$K_1 K_2 B' + (K_1 + K_2) R B + R^2 - K_1 K_2 (N_1 + N_2) B - (K_1 N_1 + K_2 N_2) R = 0 \quad (4)$$

如果用结合比 R 对结合浓度 B 作图,以 R 为纵轴, B 为横轴,由二次多项式的判别式

$$B^2 - 4AC = (K_1 - K_2)^2 > 0,$$

可知式(4)为双曲线方程。试验者常以 R 对 B 作图所拟合的曲线形式来判别系统的结合究竟系 1 个或 2 个结合位点。

用改良作图法估计参数

根据式(4)的双曲线方程,可由实验结果 R

与 B 绘双曲线,以 $B = 0, R = 0$ 分别代入式(4)可得出曲线在 Y 轴及 X 轴上的截距分别为 $K_1N_1 + K_2N_2$ 及 $N_1 + N_2$ 。双曲线的两渐近线方程为 $y = -K_1(x - N_1)$ 与 $y = -K_2(x - N_2)$, 因此两渐近线的斜率分别为 $-K_1$ 与 $-K_2$ 。

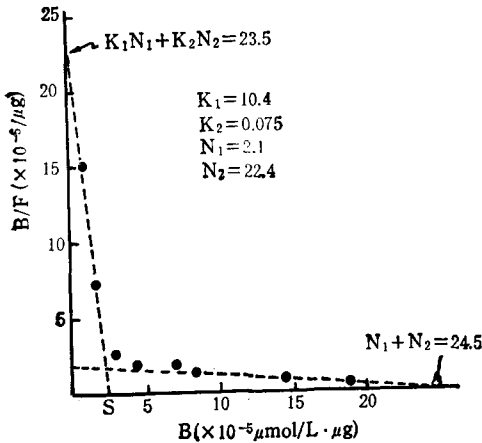


图1 放射配体结合系统具2个结合位点的改良作图解法

用作图法不易直接绘出渐近线,但很容易估计渐近线的斜率。方法是在曲线近 Y 轴及 X 轴的两端作切线(见图1的两虚线),这两个切线的斜率可近似作为两渐近线的斜率。切线在 X 轴及 Y 轴上的截距可分别近似为曲线的截距,于是这两个截距在理论上应分别为 $N_1 + N_2$ 与 $K_1N_1 + K_2N_2$, 由于 K_1 与 K_2 已知,因此可解出 N_1 与 N_2 。至此,4个参数值只需根据两直线的截距及斜率及代数法解得,这个方法要比传统

的作图法简便得多。

用迭代法估计参数

利用计算机程序求方程(3)的参数 K_1, K_2, N_1, N_2 要比用作图法更为精确,且可求出估计参数的误差。

将式(3)用 Taylor 级数展开:

$$R \approx R_1 + (K_1 - K_1^{(1)}) \left(\frac{\partial R}{\partial K_1} \right)_1 + (K_2 - K_2^{(1)}) \left(\frac{\partial R}{\partial K_2} \right)_1 + (N_1 - N_1^{(1)}) \left(\frac{\partial R}{\partial N_1} \right)_1 + (N_2 - N_2^{(1)}) \left(\frac{\partial R}{\partial N_2} \right)_1$$

这里 $K_1^{(1)}, K_2^{(1)}, N_1^{(1)}, N_2^{(1)}$ 为初始估计值,右上角(1)代表第1次估计, R_1 及 $()_1$ 代表第1次估计值代入后的函数值。上式也可写成

$$R - R_1 \approx B_1x_1 + B_2x_2 + B_3x_3 + B_4x_4,$$

这是多元线性方程,斜率为 $B_1 - B_4$, 用最小二乘法解出斜率 $B_1 = K_1 - K_1^{(1)}$; $B_2 = K_2 - K_2^{(1)}$; $B_3 = N_1 - N_1^{(1)}$; $B_4 = N_2 - N_2^{(1)}$, 于是可得出第2次参数估计值 $K_1^{(2)} = B_1 + K_1^{(1)}$; $K_2^{(2)} = B_2 + K_2^{(1)}$; $N_1^{(2)} = B_3 + N_1^{(1)}$; $N_2^{(2)} = B_4 + N_2^{(1)}$, 重复上次计算,又可得出第3次参数估计值,如此继续下去,直至前后两次参数估计值稳定为止,该法又称迭代法。

用迭代法的优点是对估计参数可达到试验者所需要的任意精度,本文要求前后两次迭代的差别不超过 0.001,而且可对估计参数求出标

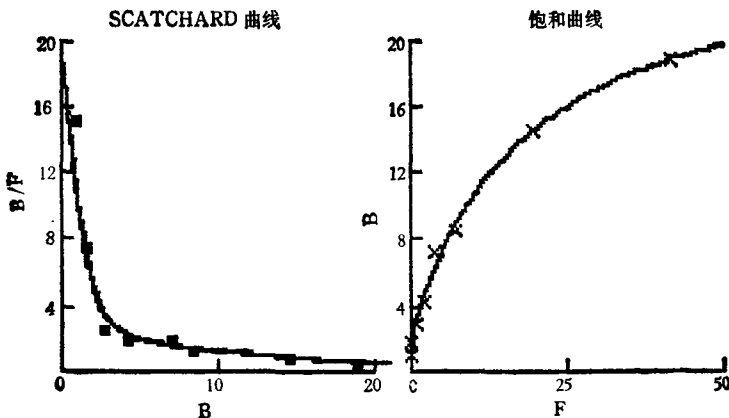


图2 Scatchard 曲线及饱和曲线(计算机打印)

准误,并由此可求出估计参数的95%可信限,这是任何作图法所无法做到的。

将求得的参数值代入式(4)后,可应用计算机作图绘出双曲线,还可将式(3)改写为饱和曲线方程:

$$B = \frac{K_1 N_1 [P]}{1 + K_1 [P]} + \frac{K_2 N_2 [P]}{1 + K_2 [P]}$$

计算机同样可绘出饱和曲线(见图2)。

实 例

用标记的乙酰胆碱与磷酸结合,后者具有乙酰胆碱受体,应用不同乙酰胆碱浓度与之平衡,然后分离进行放射性计数,并换算为每 μg 磷酸结合的乙酰胆碱量($\mu\text{mol/L}$)。表1为实验结果。

表1 标记的乙酰胆碱与磷酸的结合试验

Ach 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	磷酸的放射活性 (dpm/ μg)	结合的 Ach ($\mu\text{mol/L} \cdot \mu\text{g}$)	结合比
0.056	176	0.85×10^{-3}	15.2×10^{-4}
0.22	334	1.62	7.36
1.1	570	2.72	2.51
2.4	880	4.27	1.78
3.8	1465	7.10	1.87
7.3	1750	8.48	1.16
19.6	3000	14.54	0.765
42.0	3890	18.86	0.449

将表1中的结合比(R)对结合的 Ach 量(B)绘实验点,各点联线的形状似双曲线(图1),因此提示 Ach 与磷酸结合具有两个结合位点,可应用改良作图法或计算机的迭代法求式(3)的4个参数。

1. 改良作图法 在双曲线的X与Y轴的两端各取两个实验点联成直线,该两直线在两轴上的截距可近似作为双曲线在两轴上的截距,其斜率的负数可分别作为两结合位点的亲和力常数。在 Ach 低浓度处的直线斜率绝对值大,该值为高亲和力常数 K_1 , 对应最大结合量 N_1 ; 在 Ach 高浓度处的直线斜率绝对值小,该值为低亲和力常数 K_2 , 对应最大结合量 N_2 。由图1测量,两直线在X轴与Y轴上的截距分别为24.5与23.5,两亲和力常数分别为 $K_1 = 10.4$ 与 $K_2 = 0.075$ 。由于 $N_1 + N_2 = 24.5$ 与 $K_1 N_1 +$

$K_2 N_2 = 23.5$, 于是可解出 $N_1 = 2.1$; $N_2 = 22.4$ (见图1)。

Barlow^[1] 对以上实例用传统的作图法得 $K_1 = 10.5$, $K_2 = 0.08$, 但 Barlow 的作图法不能很简便地得出 N_1 与 N_2 值。

2. 用计算机迭代法 利用作者设计的计算机程序,先由计算机用改良作图法求出 K_1 , K_2 , N_1 与 N_2 作为初始估计值,用迭代法对4个参数进行反复估计。直至前后两次估计值的差别小于0.001为止。最终由计算机打印出4个参数值及其95%可信限(表2),并打印出双曲线(Scatchard 曲线)及饱和曲线(图2)。由图形中的曲线与实验点的拟合程度可以看出参数估计值的可信性。

表2 用迭代法估计参数值(计算机打印)

参数估计(2 BINDING SITES):

高亲和力常数(H.K.)=10.45466505
95%可信限=5.13970716--15.77042439
低亲和力常数(L.K.)=.0597464127
95%可信限(L.K.)=.0577864127--.0617064127
最大结合量(Correspond to H.K.)=1.65509851
95%可信限=1.35345451--1.95674251
最大结合量(Correspond to L.K.)=24.1043569
95%可信限=23.30977229--24.8989409

讨 论

Barlow^[1], Rosenthal^[2] 以及 Feldman^[3] 等都曾提出放射配体结合系统的作图法,但不易正确求得 N_1 与 N_2 , 本文的改良作图法仅对两端的实验点作两切线,再结合代数方法求出 N_1 与 N_2 , 要比原来的传统法方便得多。但作图法的缺陷是误差较大,且不能求出参数估计值的标准误,于是就无法对估计值的可靠性作出估量。应用计算机的迭代法要比作图法正确得多,

表3 Barlow, 改良作图及计算机迭代法估计参数值比较

Barlow 方法	K_1	K_2	N_1	N_2
Barlow 方法	10.5	0.08	—	—
改良作图法	10.4	0.075	2.1	22.4
迭代法	10.45	0.06	1.7	24.1
(95% 可信限)	(5.14~15.77)	(0.058~0.061)	(1.35~1.96)	(23.3~24.9)

金电极不除氧阳极溶出伏安法测定发硒含量

刘训健 屠一锋 陈荣妹* 王红艳* 周志芹*
施绍军* 吴忠祥* 程薇* 朱琳** 赵阳**
(苏州大学化学系)

提 要

用金电极阳极溶出伏安法测定人头发中的硒,可不除氧进行。发样在 105℃ 烘 2—3 小时,大大缩短了测量周期。健康青年人头发硒含量水平:算术平均值为 0.960ppm,几何平均值为 0.860ppm。人发中硒含量水平不仅反映了人体硒含量水平,而且也反映了环境中硒含量水平。

目前国内外较多采用荧光分光光度法测定微量的硒^[1,2],但该法仪器昂贵,普遍使用尚有困难。国内外也有用金电极阳极溶出伏安法测定水、土壤、粮食和人发中的硒^[3-6],但均采用通氩气或通氮气除氧的方法。本文采用金电极不除氧阳极溶出伏安法测定人发中痕量硒,结果令人满意。洗涤后之发样,在 105℃ 烘 2—3 小时,与文献[6]报道在 60—70℃ 烘 24 小时相比,大大缩短了时间,硒并无挥发损失。此两点改进,不仅缩短了测定周期,又节约了氮气。本文数据都是采用不除氧方法测得。

一、仪器与试剂

SDP-1 型半微分极谱仪, X-Y 函数记录仪, TJP-1 型通用极谱工作台。工作电极为金电极,参比电极为 Ag/AgCl 电极(内充 1mol/L KCl),辅助电极为铂电极。高压釜。

Se(IV) 标准溶液用光谱纯硒粉配制,贮备液为 500ppm,操作液为 10ppm。混合酸消化液为无硒硫酸:高氯酸=3:4。5% 钼酸铵溶

* 为化学系 86 届、87 届毕业生。

** 为化学系 84 级学生。

本文所提的迭代法在求出 4 个参数值的同时,并可求出其 95% 可信限,以便对所估计参数的波动范围作出统计学推断。以下为由 Barlow 方法、改良作图法与计算机的迭代法所估计参数值的比较(表 3)。

用迭代法求得的 K_1 介于 Barlow 与改良作图之间,其 95% 可信限较大,说明 K_1 的波动大,这显然是由于估计 K_1 值的实验点过少所引起的,反之,估计 K_2 , N_1 , N_2 的 95% 可信限很小,因此这 3 个参数估计的可信程度要比 K_1 大得多。

用 Barlow 与改良作图法对参数估计仅决

定于双曲线两端的实验点,而与中间实验点几乎无关。迭代法乃利用曲线拟合,它与所有的实验点有关,因此利用的信息量要大于作图法。本文的计算机程序有较强的作图功能,它可使试验者更直观理解放射配体结合系统的性质。

参 考 文 献

- [1] Barlow, R. B.: *Quantitative Aspects of Chemical Pharmacology*, Croom Helm, London, 1980, 127—129.
- [2] Rosenthal, H. E.: *Anal. Bioch.*, 1967, 25, 525.
- [3] Feldman, H. A.: *Anal. Bioch.*, 1972, 48, 317.

[本文于 1986 年 12 月 27 日收到]