



化学样品很易满足这一条件。但生物样品，特别是细胞样品由于其所含物质的不均匀分布及其形状不规则，满足不了此种条件，测量结果必然产生误差。为消除这一误差，人们引入了双区法、双波法和扫描法。本文只就前两种方法的实测结果作一比较，并用计算机模拟结果与实测结果相对照。

## 二、双区法和双波法测量结果的比较

我们选择若干 Feulgen 染色的标准细胞涂

片，每涂片上随机取 50 个标准细胞，同时用两种方法测量其核内 DNA 含量，然后分别统计处理结果列于表 1。

在直接测量中，测量结果的准确度取决于仪器的准确度。非直接测量结果的准确度不单取决于仪器的准确度，还依赖于由测量值求出结果的原理和方法。因此，用同一仪器两种方法测量同一样品，比较结果的准确度可以反映两种方法对测量准确度的影响。

我们使用两种方法测量同一组标准细胞，

表 1 双区法、双波法测量标准细胞核 DNA 含量的结果

标本名称(片号)	倍体数	双区法			双波法			C.V.波/C.V.区
		KM	S.D.	C.V.	KM	S.D.	C.V.	
小鼠精子(1)	1	10.27	0.74	7.2	11.05	2.23	20.2	2.8
精母(1)	4	41.46	2.56	6.2	43.61	3.95	9.1	1.5
精子(10)	1	10.14	0.89	8.8	10.47	3.68	35.1	4.0
精母(10)	4	42.31	2.40	5.7	43.67	5.96	13.6	2.4
肝细胞(9)	2	21.83	1.44	6.6	20.60	3.66	17.8	2.7
肝细胞(9)	4	44.07	2.78	6.3	42.54	3.07	7.2	1.1
肝细胞(7)	2	21.10	1.35	6.1	24.27	4.87	20.1	3.3
肝细胞(7)	4	45.50	2.63	5.8	50.07	5.39	10.8	1.9
胸腺(3)	2	20.31	0.71	3.5	20.82	1.97	9.5	2.7
大鼠精子(13)	1	11.93	0.97	7.8	10.53	3.66	34.8	4.5
精母(13)	4	49.41	2.41	4.9	49.18	5.54	11.3	2.3
肝细胞(18)	2	24.47	1.20	4.9	25.34	4.75	18.7	3.8
肝细胞(18)	4	51.31	2.22	4.3	51.72	6.30	12.2	2.8
肝细胞(18)	8	104.7	5.15	4.9	106.05	13.64	12.9	2.6
肝细胞(11)	2	25.54	0.90	3.5	24.39	2.64	10.8	3.1
肝细胞(11)	4	52.6	2.06	3.9	49.76	5.25	10.6	2.7
肝细胞(11)	8	106.06	3.64	3.4	105.71	9.75	8.8	2.6
人外周血涂片(178)	2	27.78	1.26	4.6	27.64	2.57	9.3	2.0
周血涂片(8)	2	27.66	1.50	5.4	27.06	3.50	12.9	2.4

以消除样品差异可能对测量结果的影响。为消除两种方法中仪器准确度的差别，测量时一次测出同一细胞上的光阑面积(B)和光源波长 $\lambda_2$ 时的入射光强 $I_{0\lambda_2}$ 、透射光强 $I_{n\lambda_2}$ ；光源波长 $\lambda_1$ 时的入射光强 $I_{0\lambda_1}$ 、透射光强 $I_{n\lambda_1}$ ；小区上波长 $\lambda_2$ 时的入射光强 $I_{0\lambda_2}^*$ ，透射光强 $I_{n\lambda_2}^*$ 。从这七个量中取前五个代入双波法求得相对质量 $KM_{双波}$ ；取其中 $B$ 、 $I_{0\lambda_1}$ 、 $I_{n\lambda_2}$ 、 $I_{0\lambda_2}^*$ 、 $I_{n\lambda_2}^*$ 代入双区法求得相对质量 $KM_{双区}$ 。这样，两种测量方法结果的标准差(S.D.)和相对标准差(C.V.)的不同就反映了由于两种方法不同所产生的测

量准确度的差异。

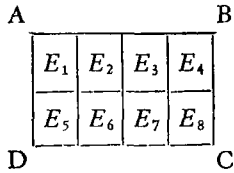
由表 1 可见，双区法的结果都优于双波法，十九组数据无一例外。还可以看出，双区法的测量结果其 C.V. 一般在 3.5%—7% (只有精子细胞由于样品染色浓度极低，测量准确度稍差)，而双波法结果的 C.V. 在很大范围内变化(8.8%—35%)。

## 三、计算机模拟的结果及其与两种方法测量结果的对照

为模拟被测面积上含有被测物质的部份分

布不均匀的情况,考查标本各部份的一致性 & 仪器的读数误差等对两种方法结果的影响,我们设计了一个程序。

假设一个标本如矩形 ABCD,可分成八等份,每份中的被测物浓度有一个吸收值  $E$ ,这些



$E$  值由计算机键盘输入后,根据下面的公式(1)、(2)、(3)可以计算出此种浓度的样品应有透光度  $T_{\lambda_2}$ 、 $T_{\lambda_1}$ 、 $T_{\lambda_2}^*$ 。

$$T_{\lambda_2} = \frac{1}{8} (10^{-E_1} + 10^{-E_2} + \dots + 10^{-E_8}) \quad (1)$$

$$T_{\lambda_1} = \frac{1}{8} (10^{-E_1/k} + 10^{-E_2/k} + \dots + 10^{-E_8/k}) \quad (2)$$

$$T_{\lambda_2}^* = \frac{1}{n} (10^{-E_1} + 10^{-E_2} + \dots + 10^{-E_8}) \quad (3)$$

其中:

$T_{\lambda_2}$ ——标本 (ABCD) 在波长  $\lambda_2$  下的透光率(相当于光度计读数  $I_{n\lambda_2}/I_{0\lambda_2}$ )

$T_{\lambda_1}$ ——标本在波长  $\lambda_1$  下的透光率(相当于光度计读数  $I_{n\lambda_1}/I_{0\lambda_1}$ )。

$T_{\lambda_2}^*$ ——标本上所有  $E \neq 0$  部分在波长  $\lambda_2$  下的平均透光率(相当于双区法测量时小区上的透光率  $I_{n\lambda_2}^*/I_{0\lambda_2}^*$ )。公式(3)中不包括所有  $E = 0$  的项。

$k$ ——标本吸收曲线在波长  $\lambda_2$  和  $\lambda_1$  处  $E$  值的比值,“即  $k = E_{\lambda_2}/E_{\lambda_1}$ ,在理想情况下应有  $k = 2$ 。

$n$ ——标本上  $E \neq 0$  的部份的份数。

由  $T_{\lambda_2}$ 、 $T_{\lambda_2}^*$  代入双区法公式,求出  $KM_{\text{双区}}$ 、 $T_{\lambda_2}$ 、 $T_{\lambda_1}$  代入双波法公式,求出  $KM_{\text{双波}}$ 。

对八个部份逐份计算  $KM$ ,再求和,得到标本 (ABCD) 准确的相对质量  $KM_{\text{真}}$ :

$$KM_{\text{真}} = \frac{1}{8} (E_1 + E_2 + \dots + E_8)$$

比较  $KM_{\text{双区}}$ 、 $KM_{\text{双波}}$  和  $KM_{\text{真}}$ ,可以看出分布

误差在两种方法中的影响。

为了模拟仪器读数和其它因素造成的误差,程序还可以不用从  $E$  值换算出  $T_{\lambda_2}$ 、 $T_{\lambda_1}$ 、 $T_{\lambda_2}^*$ ,而用计算机键盘输入能反映测量误差的  $T_{\lambda_2}$ 、 $T_{\lambda_1}$ 、 $T_{\lambda_2}^*$  值来计算  $KM_{\text{双区}}$ 、 $KM_{\text{双波}}$ 。这些计算出的  $KM$  值与前面求出的  $KM_{\text{真}}$  相比,就可以反映仪器读数误差或其它因素在两种方法中引起的不同误差。

从我们所做大量吸收曲线看,就 Feulgen 染色的细胞核而言,当  $\lambda_2$  为 560nm 时,  $\lambda_1$  每变化 1nm 大致相当于  $k$  值变化 0.05。据此,在程序中设定不同的  $k$  值就可以模拟出选择  $\lambda_2$  和  $\lambda_1$  的误差对双波法测量结果  $KM$  值的影响。

### 1 分布误差对两种方法的影响

表 2 为计算机模拟的样品内被测物质分布不均匀时两种测量方法的结果。它排除了仪器测量中各种因素如读数误差等的影响。

表中

$$DE = \frac{ME - \lg \frac{1}{MT}}{ME} \times 100\%$$

为分布误差。其中  $ME = \sum E_i/A$  为有物质部分的平均吸收值;  $MT = \sum T_i/A$  为有物质部分的平均透光率;  $A$  是有物质部份被划分为小测量区的分数;  $T_i$  为第  $i$  个小区上的透光度;  $E_i$  为第  $i$  个小区的吸收值。

可以看出,只存在分布误差的情况下,双波法的结果远优于双区法。这与理论推导是一致

表 2 非空白区分布误差对双区法、双波法的影响

DE%	0	3.8	2.55	9.44	1.91	7.42	27.44
$\frac{\Delta M_{\text{波}}}{M_{\text{真}}\%}$	0	-0.4	-0.3	-0.9	-0.04	-1.4	-1.5
$\frac{\Delta M_{\text{区}}}{M_{\text{真}}\%}$	0	-3.8	-2.55	-9.44	-1.91	-7.42	-27.44

表 3 实测中双波法的双波误差对结果的影响

$\lambda_2$	560	560	560	560	560
$\lambda_1$	488	485	482	491	494
$\Delta \lambda_1$	0	-3	-6	+3	+6
$\frac{\Delta M_{\text{波}}}{M_{\text{真}}\%}$	0	-13.97	-27.66	+17.68	+33.06

的。

表 4 计算机模拟双波法中双波误差对结果的影响

$E_{\lambda_2}/E_{\lambda_1}$	2.00	2.10	2.20	2.30	1.90	1.80	1.70
相应的 $\Delta\lambda$	0	-2	-4	-6	+2	+4	+6
$\Delta M/M$	0	-8.40	-15.46	-21.76	+9.66	+21.12	+37.78

## 2. 双波长的误差对双波法结果的影响

为分析此种影响,对同一 Feulgen 染色的细胞核,测定其吸收曲线,并据此选出吸收值  $E_{\lambda_2} = 2E_{\lambda_1}$  的二个波长值  $\lambda_2 = 560\text{nm}$ ,  $\lambda_1 = 488\text{nm}$ ,用这一对波长值将该细胞测量 50 次,用其结果的平均值表示该细胞核的 DNA 含量。然后,  $\lambda_2$  不变,而将  $\lambda_1$  改为 491nm, 494nm, 485nm, 482nm, 再各测 50 次,得出各相应波长下的平均值,结果列于表 3。可以看出,  $\lambda_2$  相同,  $\lambda_1$  稍有变化时,测得的相对质量值变化很大。

表 4 给出计算机模拟的  $E_{\lambda_2}/E_{\lambda_1}$  偏离 2:1 时相对质量值  $KM$  的变化。结果表明此比值稍有变化  $KM$  即有很大变化。如果按我们前述的经验值  $\lambda_1$  变化 1nm 相当于此比值变化 0.05 来比较表 3 和表 4,则可以看出计算机模拟和实测结果很一致。

## 3. 读数误差、空白区透光度变化及其它因素对两种方法测量结果的影响

一般情况下同一样品的两次测量结果之间往往有差异。这可能来自读数误差等因素。这些因素在不同测量方法中对最后结果的影响不同。

MPV2 型光度计有  $\Sigma 1$ 、 $\Sigma 10$ 、 $\Sigma 100$  三档。 $\Sigma 1$  是每测一次给出一个读数,  $\Sigma 100$  是每测 100 次给出一个读数。因此用  $\Sigma 100$  档测量较费时,但读数误差远小于  $\Sigma 1$  档。我们使用  $\Sigma 1$  和  $\Sigma 100$  档对同一细胞各测 50 次,结果列于表 5。由表 5 可见对同样仪器读数误差,双区法的结果优于双波法。

计算机模拟了  $T_{\lambda_2}$ 、 $T_{\lambda_1}$ 、 $T_{\lambda_1}^*$  的微小变化对两种方法测量结果的影响。数据列于表 6。

可以看出这三者同样微小的变化对双波法的影响较大,而对双区法的影响较小。这与表 5 中实测结果是一致的。

表 5 不同读数方法对两种方法的影响

方法	$\Sigma$	M	S.D.	C.V.
双区法	$\Sigma 1$	16.55	0.60	4
	$\Sigma 100$	16.69	0.25	1
双波法	$\Sigma 1$	16.62	3.75	23
	$\Sigma 100$	16.26	0.80	5

表 6 计算机模拟读数微小变化对两种方法结果的影响

$\Delta T_2$	+0.01	+0.01	+0.01	-0.01	-0.01	-0.01
$\Delta T_1$ 或 $\Delta T_1^*$	0	+0.01	-0.01	0	+0.01	-0.01
$\Delta M_{\text{双波}}/M_{\text{真}}(\%)$	+2.44	-4.00	+9.11	-2.29	-8.11	+3.87
$\Delta M_{\text{双区}}/M_{\text{真}}(\%)$	-1.72	-3.27	-0.22	+1.72	+0.24	+3.40

## 四、讨 论

双区法和双波法都假定整个被测面积是由被测物质均匀分布的区域和空白区域所组成。基于这一假设,有  $T = F + (1 - F) \cdot T^*$  ( $T$ : 全部被测面积上测得的平均透光度,  $T = I_n/I_0$ ;  $F$ : 空白面积在被测面积中占的百分数;  $T^*$ : 含有被测物部份的透光度。)

经推导,双区法测量的公式为:

$$K_{\lambda_2}M = B \frac{1 - T_{\lambda_2}}{1 - T_{\lambda_2}^*} \lg \frac{1}{T_{\lambda_2}^*}$$

双波法公式为:

$$\begin{aligned} K_{\lambda_2}M &= B(1 - F)E_{\lambda_1}^* \\ &= B \frac{(1 - T_{\lambda_1})^2}{2(1 - T_{\lambda_1}) - (1 - T_{\lambda_2})} \\ &\quad \times \lg \frac{2(1 - T_{\lambda_1}) - (1 - T_{\lambda_2})}{(1 - T_{\lambda_1})^2} \\ &\quad \frac{2(1 - T_{\lambda_1}) - (1 - T_{\lambda_2})}{2(1 - T_{\lambda_1}) - (1 - T_{\lambda_2}) - (1 - T_{\lambda_1})} \end{aligned}$$

( $K_{\lambda_2}M$  是在光波长  $\lambda_2$  时的相对质量;  $K$  与入射光波长有关的吸收系数;  $K_{\lambda_2}$ : 入射光波长为  $\lambda_2$  时的  $K$  值;  $T_{\lambda_1}$ 、 $T_{\lambda_2}$  分别为入射光波长

为  $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$  时的平均透光度;  $E_{\lambda_1}^*$  是人射光波长为  $\lambda_2$  时有物质部份的吸收值;  $T_{\lambda_1}^*$  是这一部份的透光度)。

从公式推导及计算机分析, 双波法可以很好地消除分布误差, 应能获得较好的测量结果, 故国外文献多推荐双波法, 国内也多采用此法。我们也是先采用双波法, 在应用中发现一些问题才转向双区法的。

首先, 理论上同一批染色的片子上各部份被染色物质的吸收曲线应完全相同。这样, 相对于最大吸收的波长  $\lambda_2$  就会有一个确定的波长  $\lambda_1$ , 其吸收值  $E_{\lambda_1}$  恰为最大吸收  $E_{\lambda_2}$  的二分之一。双波法就是要选择这样两个波长的入射光进行测量。可是实际上不论如何注意染色方法, 同一批片子, 甚至同一片子不同区域测得的吸收曲线都不相同, 由此而求出的双波长也不一样。有时在  $\lambda_2$  相同时  $\lambda_1$  可相差 1—2nm, 有时则可达到 3—5nm, 甚至更大。不同片子之间的差别有时很小, 有时超过 7—8nm。在此种情况下就无法保证  $E_{\lambda_2} = 2E_{\lambda_1}$ 。为尽量减少  $\lambda_2$ 、 $\lambda_1$  偏离引起的误差, 就要对每一个片子都选择几个区域测定吸收曲线, 求出各自的双波长, 从中选出最适中的一组作为本片适用的双波长, 而当各吸收曲线彼此相差太远时就不宜用双波

法了。这就给测量工作增加了很多麻烦。

其次, 一个片子空白区域中稍有些杂质或其它原因引起测量读数有微小变化时, 均会对双波法的相对质量值有较大影响。(微小的读数变化对双区法测量结果影响小得多。)这就使得样品情况(如背景的干净程度, 被测物浓度等)和测量过程的误差对双波法测量结果的准确度有较大影响。一部份样品, 特别是颜色较浅、背景不特别干净的样品, 双波法测量结果的准确度就很差。(如表 1 中的小鼠、大鼠精子等样品)

双区法尽管在理论上不能消除有物质区域的不均匀造成的分布误差, 但由于生物标本中此误差不是很大, 而仪器读数误差等对双区法结果的影响又小, 因而在实际测量中双区法的相对标准差一般都小于 7%。而双波法由于前述种种原因其相对标准差常大于 10%, 甚至高达 20% 以上。

总之, 双区法不但比双波法操作简便, 而且准确度高, 又不一定要用双波法必须的单色器, 特别在样品各处吸收曲线差异较大或片子条件不太理想造成双波法误差太大时, 就更显出双区法的优越。

[本文于 1984 年 4 月 11 日收到]

## 仪器设备

### 简单、快速、灵敏的微型凝胶电泳装置

静天玉 张增艳\* 戴燕\*

(河北大学分子生物学研究室, 保定)

为了满足核酸、蛋白质极微量样品分析的需要, 本室根据 Ogrita 等<sup>[1]</sup>介绍的方法自制了比原设计更简单的微型双垂直板凝胶电泳装置。该装置由三块有机玻璃、四块窗玻璃和一个培养皿构成。胶室容量 6.5 毫升, 点样量 1 微克(或更少)至 10 微克, 每块胶板可点 12 个样品, 电泳时间约 2 小时, 两个垂直板的电泳条

件完全相同。

#### 一、制作及组装

取三块有机玻璃, 长 × 宽 × 厚分别为:  $A_1 = 110 \times 25 \times 5$  毫米,  $A_2 = 90 \times 25 \times 5$

\* 生物学系 1984 年应届毕业生