

- target for tumor growth inhibition. *Cancer Res*, 1996, **56** (15): 3540~ 3545
- 5 Menred A, Thierauch K-H, Martiny-Baron G, *et al.* Novel antibodies directed against the extra-cellular domain of the human VEGF-receptor type II. *Hybridoma*, 1997, **16** (5): 465~ 471
  - 6 Song S M, Shou C C. Cloning of vascular endothelial growth factor receptor (KDR) and its prokaryotic expression. *Chin J Biochem & Mol Biol*, 1998, **14** (1): 57~ 61
  - 7 Song S M, Wu J, Shou C C. Preparation and identification of monoclonal antibody against human vascular endothelial cell growth factor receptor. *J Beijing Med Univ*, 1998, **30** (6): 509~ 511
  - 8 Song S M, Wu J, Shou C C. Expression of VEGF receptor KDR in different originated carcinomas. *Chinese Journal of Cancer Research*, 1998, **10** (3): 104~ 108

**Cloning and Expression of Truncated KDR Binding to Vascular Endothelial Growth Factor.** SONG Shu-Mei, SHOU Cheng-Chao (*Beijing Institute for Cancer Research, Beijing Medical University, Beijing 100034, China*).

**Abstract** VEGF receptor, KDR, is one of the main

VEGF receptors, and it plays important role in VEGF stimulating endothelial cell (EC) proliferation and vascular permeation. To obtain active recombinant KDR which can bind VEGF *in vitro*, RT-PCR was used to clone KDR (I ~ IV) DNA fragment from human umbilical vein EC. The cloned KDR (I ~ IV) fragment was identified with enzyme digestion and sequencing and then cloned into fusion protein expression vector pGEX2T. The GST-KDR fusion proteins were expressed in *E. coli* XL1-blue after inducing by IPTG. The fusion proteins were extracted from bacterial inclusion body with basic denature method and purified with preparing SDS-PAGE gel followed by electric elution.

**Key words** KDR, binding domain, cloning, expression

## 双波长/双光束分光光度计数据处理系统的改进\*

周宏伟 林波海 吴 维 张幼苓 王丽华

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

闵小山

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要** 通过加入计算机和设计新软件, 双波长/双光束分光光度计数据处理能力得到大大增强. 仪器原来依靠绘图仪输出, 手量手算, 数据处理能力弱, 限制了它的使用, 尤其是在动力学测定上. 现在由计算机控制数据采集, 显示多条曲线, 显示数值, 在曲线上自动寻峰, 光滑曲线, 任意缩放图形, 并用激光打印机输出. 介绍了升级后的系统结构, 及其在关于磷脂酰乙醇 (PE) 对  $Ca^{2+}$ -ATPase 的  $Ca^{2+}$  转运能力影响的研究中的应用.

**关键词** 双光束, 双波长, 分光光度计, 数据处理, 磷脂酰乙醇

**学科分类号** TH744.12, R318.6, TH773, Q73

双波长/双光束分光光度计既能以双光束方式又能以双波长方式测量; 既能扫描样品的吸收或透射光谱, 又能记录样品反应的动力学过程. 双波长方式对于测量浑浊样品 (如完整细胞的悬浮液) 和光吸收峰相互重叠的多组分样品特别有利, 比通常的单波长分光光度测定更灵敏更有选择性<sup>[1]</sup>. 由于双波长/双光束分光光度计具有这些优良的功能, 它在生物学, 医学和化学的广泛领域中得到应用<sup>[2]</sup>.

但是双波长/双光束分光光度计大多是 80 年代

初期进口的产品, 在操作和数据处理上存在很多不足: 存储容量很有限, 只能通过绘图仪画出曲线, 曲线上各点的数值必须手量手算, 曲线画出后几乎就不能再对数据作任何处理. 仪器的这些不足之处严重影响了其在科研中的应用. 我们为双波长/双光束分光光度计设计了数据采集电路和通信控制电路, 配置了计算机和激光打印机, 编制了数据采集和处理程序, 使系统的性能得到了很大的提高. 本

\* 国家自然科学基金资助项目 (39870220) 和中国科学院大型仪器升级改造项目 (S96054).

收稿日期: 1998-07-03, 修回日期: 1998-11-13

工作以较少的经费实现了与现在进口的新仪器相似的性能, 不仅节省了大量的资金, 对于其他类似仪器的改进工作也有推广和借鉴意义。

## 1 系统结构

图 1 是升级后的分光光度计结构原理图。数据采集电路在分光光度计主机内, 它每次采集到数据后就通过通信控制电路向计算机申请读入。计算机每检测到申请信号就读入数据, 并通过通信控制电路向数据采集电路发送一个应答信号, 复位数据采集电路的锁存状态, 使其开始下一次数据采集。计算机实时地在显示器上画出曲线。数据采集完成后, 可以分析处理数据, 或通过激光打印机打出图形。计算机具有 8 Mb 内存和 500 Mb 硬盘, 可以存放大量数据。与原来分光光度计主机的 2 kb 内存相比, 存储能力得到了大幅度的提高。

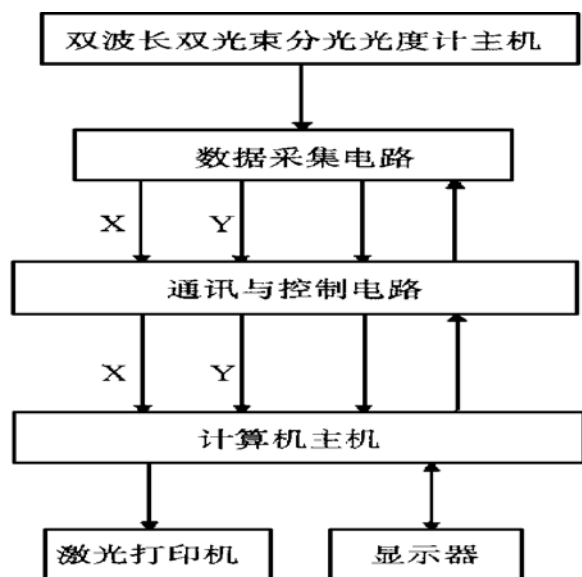


图 1 新双波长双光束分光光度计系统结构框图

数据采集电路由分光光度计主机供电, 通信控制电路由计算机供电, 所以分光光度计主机与计算机间需要良好共地, 并且各电路上敏感芯片旁边要加上足够的滤波器件, 消除毛刺干扰。数据采集电路不仅能从分光光度计主机内采集数据, 还能与计算机进行通信; 通信控制电路负责接收数据采集电路传送来的数据, 并在数据采集电路与计算机间传递控制信息。它们间用 40 芯长扁线连接。由于每次采集的数据包括 X 轴和 Y 轴两种数据, 每个数据长 12 bits, 所以需要占据 40 芯线中的 24 根。一般情况下, 数据采样速率是 600 个/min, 测量高速反应时采样速率为  $2.4 \times 10^4$  个/min, 生物学中反

应过程都比较慢, 这样的速度完全可以详细地记录下一个反应过程。

软件是工作中一个关键部分。程序是用 Borland C++ 4.5 软件包开发的。软件安装需要约 500 kb 磁盘空间, 加上每次实验要存储大量的实验数据, 所以最好要保证硬盘能提供 1.5 Mb 以上空间。软件采用菜单控制结构, 具有良好的可操作性, 工作稳定可靠。通过接口电路读入的是硬件坐标系中的数据, 程序必须将其转换到用户坐标系和屏幕坐标系, 才能得到需要的实验数据和图形。这三种坐标系间相互转换关系为:

$$\begin{cases} X_u = X_{0u} + \alpha_{hu}(X_h - X_{0h}) \\ Y_u = Y_{0u} + \beta_{hu}(Y_h - Y_{0h}) \\ X_s = X_{0s} + \alpha_{hs}(X_h - X_{0h}) \\ Y_s = Y_{0s} + \beta_{hs}(Y_h - Y_{0h}) \\ X_h = X_{0h} + \alpha_{uh}(X_u - X_{0u}) \\ Y_h = Y_{0h} + \beta_{uh}(Y_u - Y_{0u}) \end{cases}$$

其中,  $(X_u, Y_u)$  表示用户坐标系中的值,  $(X_h, Y_h)$  表示硬件坐标系中的值,  $(X_s, Y_s)$  表示屏幕坐标系中的值;  $(X_{0u}, Y_{0u})$  是用户坐标系中的原点,  $(X_{0h}, Y_{0h})$  和  $(X_{0s}, Y_{0s})$  有类似的含义;  $\alpha_{hu}$  表示从硬件坐标系到用户坐标系在 X 方向上的转换系数,  $\beta_{hu}$  表示从硬件坐标系到用户坐标系在 Y 方向上的转换系数,  $\alpha_{hs}$ ,  $\beta_{hs}$ ,  $\alpha_{uh}$  和  $\beta_{uh}$  有类似的含义。

软件在数据处理上为分光光度计增加了下述新功能:

a. 单通道/多通道数据显示与处理方式: 单通道方式下, 每次只显示和处理一条曲线, 适用于测量条件不变的情况; 多通道方式下, 可以同时显示和处理多条曲线; 用不同颜色标识时可以显示多达 15 条曲线, 用不同线型标识可以显示 4 条曲线。多通道方式适用于测量条件不变的情况。

b. 自动寻找曲线上的峰值。

c. 显示数值: 可以一次显示曲线上所有点值, 也可以在曲线上移动光标读取部分点的值。计算机给出的值不仅比以前手量出的准确, 而且精度可以很高, 如给出四位小数, 还可以给出两个测量点间的插值点。

d. 可以在 X 方向和 Y 方向任意缩放图形, 这对于观察变化剧烈的图形的局部细节很有好处。自动寻峰, 光标读数等操作都可以在作伸缩变换后的图形上进行。

e. 可以光滑曲线. 在仪器噪声较大的情况下测得的曲线上会有毛刺, 这时光滑一下曲线能方便数据的分析和处理.

f. 可以设置数据采样速度. 采样速度越低, 所需要存储的数据量就越小, 可以记录的反应过程就越长.

g. 数据处理不再局限于在一台机器上进行, 可以在任何安装了本软件的计算机上调出数据文件, 处理分析数据.

图 2 显示了用本软件处理得到的一些曲线, 是由本软件控制激光打印机打印的.

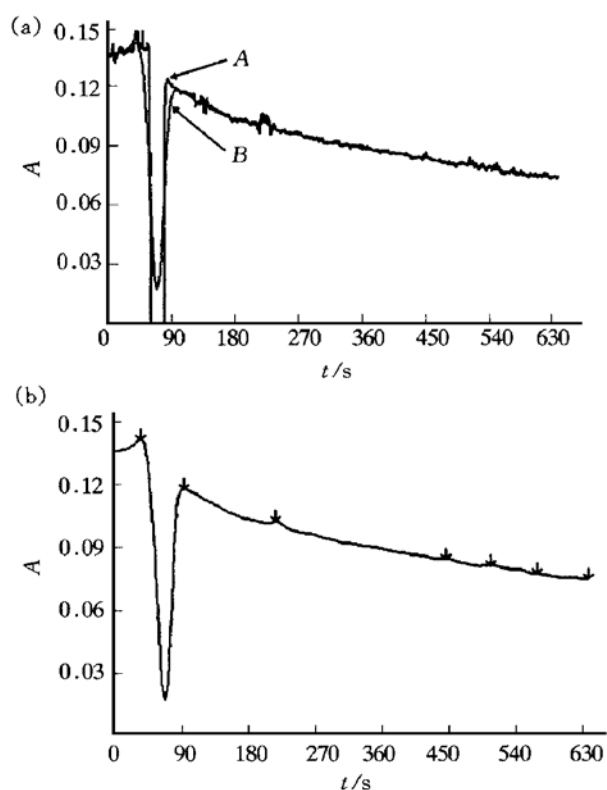


图 2 经过数据处理后的一些测量曲线

(a) 曲线光滑处理, A: 处理前, B: 处理后; (b) 在曲线上自动寻找峰值.

## 2 生物学实验

### 2.1 原理

肌质网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 是一种重要的膜蛋白, 通过水解 ATP 转运  $\text{Ca}^{2+}$ , 对于细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的调节起着重要作用. 一些实验指出<sup>[3]</sup>, 膜脂中磷脂酰胆碱 (PC) 和磷脂酰乙醇 (PE) 两种磷脂含量的不同对  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的活性和对  $\text{Ca}^{2+}$  的转运能力有影响. 利用 PC/PE 重组脂酶体对 PC/PE 的作用进行了系统的研究. 偶氮砷 III (arsenozol III, A III) 可以作为  $\text{Ca}^{2+}$  指示剂<sup>[4]</sup>. 在 10~70  $\mu\text{mol/L}$

$\text{Ca}^{2+}$  时, 差吸光度 A (675-685) 与  $\text{Ca}^{2+}$  浓度呈正的线性关系, 因此它可以作为一种探针测定  $\text{Ca}^{2+}$  的跨膜转运. 我们利用升级后的分光光度计研究了 PC 和 PE 含量不同的 PC/PE 重组脂酶体对  $\text{Ca}^{2+}$  的转运.

### 2.2 方法

按 Maclennan<sup>[5]</sup> 和 Banerjee<sup>[6]</sup> 方法制备肌质网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, 按 Gould 等<sup>[4]</sup> 的方法制备 PE 含量为 25% (A 组) 和 50% (B 组) 的 PC/PE 重组脂酶体.

置分光光度计为双波长 (675 nm 和 685 nm) 和时间扫描状态. 1 ml 反应体系 (40 mmol/L Hepes-KOH, 100 mmol/L KCl, 5 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 70  $\mu\text{mol/L}$  A III, pH 7.2), 30 $^\circ\text{C}$  保温 5 min, 调零, 加入适量样品和 50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 记录吸光度值, 加入 ATP (25 mmol/L, pH 7.2) 20  $\mu\text{l}$  启动反应, 测定 A<sub>675-685</sub> 的变化.

### 2.3 结果

用不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对 A<sub>675-685</sub> 吸光度值作图, 得到  $\text{Ca}^{2+}$ -A III 标准曲线 (图 3). 由图 3 可见, 在 10~60  $\mu\text{mol/L}$  浓度下, 吸光度与  $\text{Ca}^{2+}$  浓度成良好的线性关系. 因此, 采用 A III 作为指示剂可以灵敏地监测反应体系中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化. 制备不同 PC/PE 比例的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 脂酶体, 测定其  $\text{Ca}^{2+}$  转运活力. 图 4 是由新分光光度计系统打印的曲线, 记录了动力学反应过程中吸光度的变化. 从图 4 可以看出, 加入 ATP 启动反应后, 吸光度下降, 这是因为  $\text{Ca}^{2+}$  正被转运进脂酶体胞内, 从而使胞外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下降, A III- $\text{Ca}^{2+}$  吸光度降低. 还可看出, 转运速度随时间逐渐减弱, 约 10 min 后, 转运几乎停止. B 组吸光度变化速度比 A 组快. 利用图 3 的标准曲线, 可以由图 4 转换得到  $\text{Ca}^{2+}$  转运的动力学过程 (图 5). 图 5 直接反映了被摄入脂酶体内的  $\text{Ca}^{2+}$  总量的变化. 转换方法如下: 在图 4 上以 Q (Q') 点为计算起点, 计算曲线上 Q (Q') 点以后各点相对于 Q (Q') 点的吸光度变化量, 由标准曲线可以换算出相应的脂酶体外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化量. 浓度变化量与反应体系的体积的乘积就是脂酶体外  $\text{Ca}^{2+}$  总量的变化量, 也就是摄入脂酶体内的  $\text{Ca}^{2+}$  总量. 由于体系中其他成分可能对  $\text{Ca}^{2+}$  有吸附或结合等作用, 所以直接由吸光度曲线计算出的脂酶体外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度可能是不准确的, 而计算  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化量的方法则可以消除吸附或结合的影响. 实验结果表明随 PE 含量的增加,

$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 对  $\text{Ca}^{2+}$  的转运能力增强,  $\text{Ca}^{2+}$  转运活力对 PE 存在依赖性. 这一结果与 Navarro 和 Cheng 等<sup>[7,8]</sup>的结果是相符的.

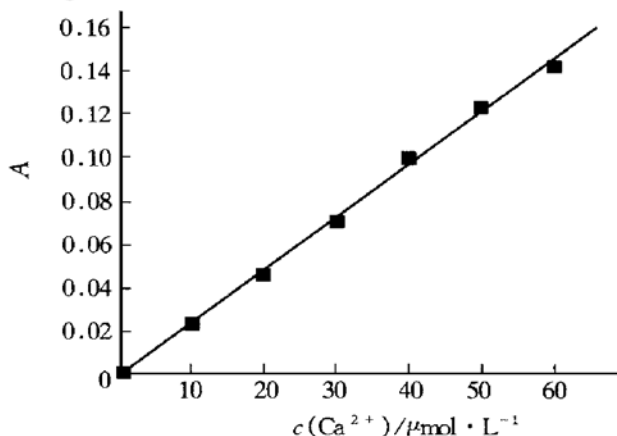


图3 A III溶液的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度-吸光度标准曲线

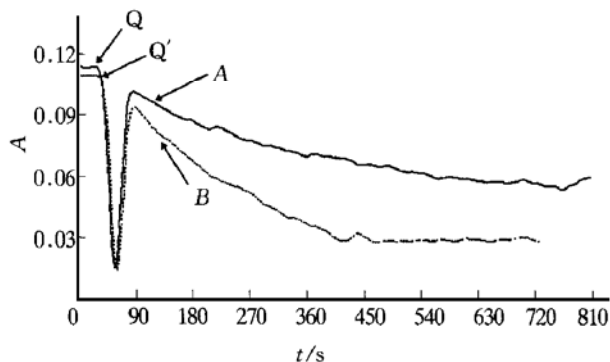


图4 含不同 PC/PE 比例的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 重组脂酶体的 675-685 差光谱与时间的变化关系曲线

用 A III 作  $\text{Ca}^{2+}$  指示剂, 分别在 Q 和 Q' 点加入 ATP 启动反应. PE 含量: A: 25%, B: 50%.

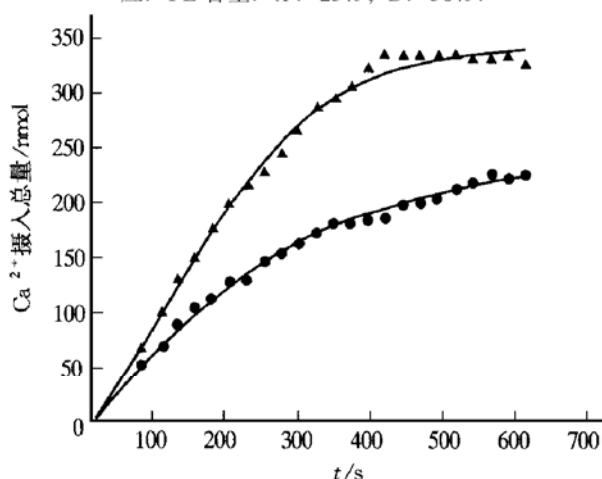


图5 PC/PE 比例不同的肌质网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 重组脂酶体的  $\text{Ca}^{2+}$  转运曲线

●—●: PE 含量 25%; ▲—▲: PE 含量 50%.

### 3 讨论

经过改进, 双波长双光束分光光度计的性能得

到了很大的提高, 包括数据采集和数据处理两方面. 现在由计算机采集和存储数据, 数据容量得到了大幅度提高.

数据处理可以脱机进行, 包括了多道曲线显示与处理, 数值显示, 自动寻峰, 坐标缩放, 曲线光滑等新功能. 这符合了现代科研仪器计算机化, 自动化的潮流. 实验和使用结果也表明, 新分光光度计系统操作方便, 稳定可靠, 支持了很多重要的科研工作. 基于新分光光度计系统, 还可以开展进一步的开发工作, 特别是软件方面, 如改进用户界面, 增加数据处理功能等. 由于软件都是我们自己编制的, 进一步的软件开发工作会很顺利.

国内现在还有很多这样 70 和 80 年代进口的仪器, 由于操作性能和数据处理能力的落后, 使仪器处于低效工作甚至闲置的状态, 而昂贵的价格又妨碍了新型仪器的买进. 这不仅是对现有资源的极大浪费, 也妨碍了研究工作的展开. 所以, 只需较少经费就能实现仪器现代化的升级工作就显得很重要和必要.

致谢 工作中得到中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室的王玉苓和李佳的帮助, 在此表示感谢.

### 参 考 文 献

- 唐海伦 (Tang H L). 双波长分光光度测定. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1980, (1): 43~ 47
- Shibata S, Furukawa M, Nakashima R. Determination of phenol in industrial waste and the determination of 2, 4-dichlorophenol and 2, 4, 6-trichlorophenol in mixtures by first derivative spectra. Analytica Chimica Acta, 1976, **81** (1): 206~ 210
- Starling A P, Dalton K A, East J M, *et al.* Effects of phosphatidylethanolamines on the activity of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. Biochem J, 1996, **320** (1): 309~ 314
- Gould G W, McWhirter J M, East J M, *et al.* Uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  mediated by the  $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase in reconstituted vesicles. Biochim Biophys Acta, 1987, **904** (1): 36~ 44
- MacLennan D H. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem, 1970, **245** (17): 4508~ 4518
- Banerjee R, Epstein M, Kandrach M, *et al.* A new method of preparing  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from sarcoplasmic reticulum: extraction with octylglucoside. Membrane Biochemistry, 1979, **2** (3~ 4): 283~ 296
- Navarro J, Toivio-Kinnucan M, Racker E. Effect of lipid composition on the calcium/adenosine 5'-triphosphate coupling ratio of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. Biochemistry, 1984, **23** (1): 130~ 135
- Cheng K-H, Lepock J R, Hui S W, *et al.* The role of cholesterol in the activity of reconstituted  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase vesicle containing unsaturated phosphatidylethanolamine. J Biol Chem, 1986, **261** (11): 5051~ 5087

### The Development of Data-Processing System of Double Wavelength/Double Beam Spectrometer.

ZHOU Hong-Wei, LIN Bo-Hai, WU Wei, ZHANG You-Ling, WANG Li-Hua (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*); MIN Xiao-Shan (*National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

**Abstract** The data-processing ability of double wavelength/double beam spectrophotometer has been greatly enhanced by connecting it to a computer and designing new software. Formerly, the instrument relied on an old recorder to plot curve on a special-designed recording paper and had poor data-processing ability: user had to determine manually the abscissa

and ordinate for any data point in the curve with a ruler, which limited its use in biological studies, especially in kinetic analysis. Currently a computer and a software packet designed are applied to it, which leads to the following several distinct advantages over the old type: sampling and storing data by computer, showing more than one curve simultaneously on the screen, showing the value of data points, determining the positions of peaks automatically, smoothing curves, zooming in or zooming out graph, printing graph with a HP Laser Jet. The structure of the new system is introduced here, based on which the effect of phosphatidylethanolamine content on the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase is studied.

**Key words** double wavelength, double beam, data procession, spectrophotometer, phosphatidylethanolamine

## 邻苯三酚-碳酸盐缓冲液化学发光体系的研究\*

许申鸿 杭 瑚

(青岛大学化学系, 青岛 266071)

**摘要** 用化学发光法研究了邻苯三酚碱性自氧化产生  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的发光行为. 通过对测定条件的研究, 得出最佳测定方案. 改进后的方法不需使用发光剂 Luminol, 所用试剂价廉易得, 且方法稳定, 重现性好. 此法灵敏度远高于邻苯三酚自氧化的其他文献报道法.

**关键词** 化学发光, 邻苯三酚自氧化, 超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), 超氧化物歧化酶 (SOD)

学科分类号 O657

人们早就知道邻苯三酚在碱性条件下可迅速自氧化产生  $\text{O}_2^{\cdot-}$ <sup>[1]</sup>. 因此, 该体系广泛用于 SOD 活性的测定及一些物质抗氧化性质的研究. 邻苯三酚自氧化研究方法有多种, 如化学发光法、比色法、电化学法等<sup>[2~4]</sup>. 其中化学发光法专一性强, 灵敏度高, 已被广泛应用<sup>[5~9]</sup>. 目前, 国内报道的邻苯三酚自氧化化学发光分析法采用的均为邻苯三酚-Luminol (3-氨基邻苯二甲酰肼) 发光体系模式<sup>[2, 5~9]</sup>. 本文在对该法的研究中发现, 当将原法中的发光剂 Luminol 去掉时, 同一条件下其发光强度及灵敏度均比加入 Luminol 时要高. 因此, 本文放弃使用价格较贵的发光剂 Luminol, 仅用邻苯三酚与  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液组成发光体系, 并对改进后体系的测定条件进行反复实验, 得出最佳测

定方案. 本研究中发现, 在该体系的重要影响因素中, 除了有已报道的邻苯三酚浓度及溶液 pH 值的影响外, 还有一个十分重要的影响因素——碱溶液浓度的影响, 在该体系中对此影响因素的研究, 至今未见报道.

### 1 原 理

Luminol 是常用的发光剂之一. 早在 1928 年 Albrecht 便证明了它在碱性介质中具有发光作用. 然而, 邻苯三酚也是一种很好的发光剂. 因此, 在本研究体系中不另外添加 Luminol, 仅依据邻苯三酚自身在自氧化过程中所产生的化学发光便可进行

\* 山东省自然科学基金资助课题 (Y98D02050).

收稿日期: 1998-08-24, 修回日期: 1999-01-05