DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.039


### 3.5 X取值范围检查

作为对比方法,理论上要求应该没有误差,只有这样回归分析的结果才有效,但在临床实验室这是不可能达到的,因为每个测定都有其固定误差,Ep9-A文件指出,如果对比方法(X)的取值范围有足够宽,对比方法的这种误差在回归分析中可忽略不计。并可用相关系数($r$)来粗略估计X取值范围是否足够宽。Ep9-A文件要求 $r\geqslant 0.975$(或者是 $r^2\geqslant 0.95$)则认为X范围适合。

用相关系数 $r$ 的计算公式

$$r=\frac{\sum_{i}^{N}\sum_{j}^{2}(X_{ij}-\overline{X})(Y_{ij}-\overline{Y})}{\sqrt{\sum_{i}^{N}\sum_{j}^{2}(X_{ij}-\overline{X})^2}\sqrt{\sum_{i}^{N}\sum_{j}^{2}(Y_{ij}-\overline{Y})^2}}$$

$$\overline{X}=\frac{\sum\sum X_{ij}}{2N}\qquad Y=\frac{\sum\sum Y_{ij}}{2N}$$

我们计算得BUN的相关系数 $r=0.9970$,大于Ep9-A文件要求的0.975故可认为本实验项目所取的X范围适合,数据满足要求。

## 4 线性回归

Ep9-A文件对于成对数据系列($X_{ij}$-$Y_{ij}$)斜率b、截距a的计算方法如下:

$$a=\overline{Y}-b\overline{X}\qquad b=\frac{\sum_{i}^{N}\sum_{j}^{2}(X_{ij}-\overline{X})(Y_{ij}-\overline{Y})}{\sum_{i}^{N}\sum_{j}^{2}(X_{ij}-\overline{X})^2}$$

$$\overline{X}=\frac{\sum\sum X_{ij}}{2N}\qquad Y=\frac{\sum\sum Y_{ij}}{2N}$$

直线回归方程为 $Y=a+bX$

结果:

$$a=0.0505\qquad b=0.985$$

直线回归方程为:$Y=0.0505+0.985X$ 图形如A。

斜率b、截距a的假设检验用SPSS统计软件包,其结果如下:

a: $S_x=0.169$ $t=0.299$ $P=0.766$

b: $S_x=0.009$ $t=108.725$ $P=0.000$

## 5 计算预期偏差(Bc)和相对偏差

$$Bc=a+(b+1)Xc$$

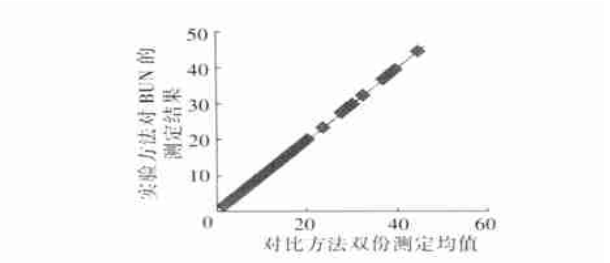



图5 $Y=0.0505+0.985X$ $r^2=0.9940$

我们选定BUN医学决定水平的两个端点(2.1, 10.0)[2]和所用仪器所示的线性范围达到的水平来计算预期偏差Bc,结果见表4。

表4 预期偏差与相对偏差

| 相对偏差(%) | 给定差(mmol/L) | 预期偏差(mmol/L) |
|---|---|---|
| 2.1 | 0.042 | 2.1 |
| 10.0 | −0.014 | −0.14 |
| 45 | −0.259 | −0.58 |

## 6 结论

根据NCCLS E有关指南文件Ep9-A对新购进的自动生化分析仪BT2000与对比方法用的自动生化分析仪日立7150进行方法对比及偏差评估,测定表明两者有良好的相关性。测定项目尿素氮(BUN)的相关系数 $r=0.9970$,回归方程 $Y=0.0505+0.985X$,最大相对偏差是2.1%,最小0.14%。在分析范围内的相对偏差较小可满足临床要求。

关键词:患者血清;方法对比;偏差评估

中图法分类号:R197.39 文献标识码:B

## 参考文献:

[1] 杨昌国. 精密度评价和方法比较中NCCLS评价方案的应用[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(1): 47-49.

[2] 林龙顺, 温 畅. 实用医学检验计算[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1990. 295

(编辑 张大春)

# 经验交流

文章编号:1000-5404(2003)04-0362-02

## 免疫细胞化学技术在转录因子激活研究中的应用

## Application of immunocytochemistry in the study of transcription factor activation

单佑安[1], 刘小华[2], 罗向东[1], 杨宗城[1] (第三军医大学附属西南医院:[1]全军烧伤研究所;[2]呼吸内科,重庆 400038)

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830400)

作者简介:单佑安(1970-),男,湖南省湘阴县人,博士研究生,助理研究员,主要从事全身性炎症反应发病机制及防治方面的研究,现在附属大坪医院野战外科研究所第四研究室。电话:(023)68757474

收稿日期:2001-03-09;修回日期:2001-08-20

免疫细胞化学(Immunocytochemistry, ICC),或称免疫组织化学,其主要原理是用标记的抗体(或抗原)对细胞或组织内的相应抗原(或抗体)进行定性、定位或定量检测,经过组织化学的呈色反应之后,用显微镜、荧光显微镜或电子显微镜观察。该技术在信号转导研究中具有一些其它技术所不可替代的优势,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

现主要介绍该技术在转录因子(Transcription factors, TFs)激活研究中的应用及其特点。

## 1　材料与方法

### 1.1　细胞株

人脐静脉血管内皮细胞株 ECV-304 购自 ATCC 公司。加入含 10%胎牛血清的 M199 培养基培养, 2~3 d 传代 1 次。

### 1.2　主要试剂

LPS(0111: B4)购自 Sigma 公司, 抗 p65 抗体、CREB(cAMP Response Element Binding Protein)抗体、磷酸化 CREB 抗体、碱性磷酸酶显色系统分别购自 Santa Cruz、New England Biolabs 公司。

### 1.3　免疫细胞化学技术

将细胞接种置于培养板中的盖玻片, 用 100 ng/ml LPS 刺激细胞至预定时相点(0、15、30、60、90、120、180 min)后进行 ICC 检测。操作步骤参照文献[1]描述, 样本封片后于显微镜下照像, 并于 200 倍视野下随机选取 5 个视野计数 p65 核转位细胞数。

## 2　结果

### 2.1　LPS 刺激 ECV-304 细胞诱导 p65 核转位, 以时间依赖方式激活细胞

正常培养条件下, p65 主要定位于细胞浆, LPS 刺激后 15 min 发生核转位, 以 30 min 左右最明显, 见图 1, 刺激 120 min 后核转位现象基本消失。0、15、30、60、120、180 min 的核转位比率(%), 分别为(0.71±1.6)、(32.1±3.2)**、(93.0±7.9)**、(78.3±7.2)**、(3.43±2.6)、(1.92±1.8)(**: 与对照组相比 $P<0.01$)。以 p65 核转位的有无来判定细胞是否激活, 显示 LPS 刺激下激活细胞的比率具有时间依赖性。

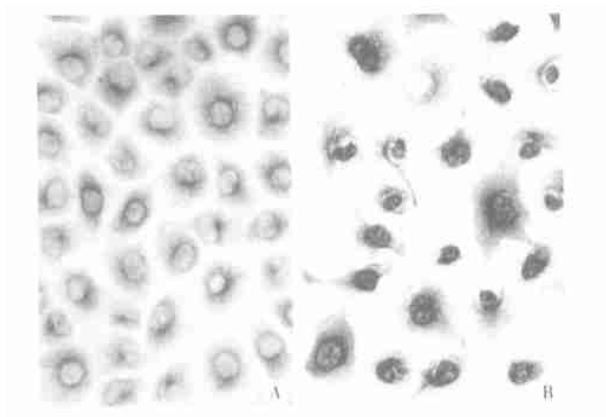


图 1　**p65** 主要分布于正常培养 **ECV-304** 细胞浆(**A**), **100 ng/ml LPS** 刺激 **30 min** 诱导 **p65** 核转位(**B**)　(AP×200)

100 ng/ml LPS 刺激 ECV-304 细胞, 激活细胞的比率具有时间依赖性。

### 2.2　LPS 刺激 ECV-304 细胞诱导 CREB 磷酸化

正常培养条件下, CREB 主要定位于细胞核, 见图 2A, 检测不到 CREB 的磷酸化信号, 见图 2B, LPS 刺激后 15 min 即可见明显的 CREB 的磷酸化, 以刺激后 30 min 最为典型, 见图 2C, 刺激 120 min 后磷酸化信号逐步减弱, 至 180 min 时信号完全消失。



图 2　正常培养条件下, **CREB** 主要分布于细胞核(**A**), 检测不到 **CREB** 磷酸化(**B**), **100 ng/ml LPS** 刺激细胞 **30 min** 诱导 **CREB** 磷酸化(**C**)　(AP×200)

## 3　讨论

TFs 激活包括 TFs 特异位点磷酸化、在细胞内的移位、与特定序列 DNA 产生结合等, 是信号转导研究的重要内容。与蛋白免疫印迹、电泳迁移率变化分析等常用于 TFs 激活判定的方法相比, ICC 技术具有以下优点: ①显示细胞形态结构的改变: 由于采用了固定剂, 因而较好地保持了细胞的形态结构, 能直观地显示刺激前后细胞结构的变化。②精确显示 TFs 在细胞内的定位及位置改变: 正常情况下, CREB 主要分布于细胞核, 而 p65 主要分布于细胞浆, 刺激后 p65 分子核转位现象的产生及消失动态显示了 p65 在细胞内的位置变化。③精确显示 TFs 激活状态: 磷酸化抗体能定性显示 TFs 的磷酸化状态, 反映其

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

是否激活。与电泳迁移率变化分析方法相比，一方面避免了核蛋白抽提过程中因应激效应(如冷刺激)所造成的假阳性结果，另一方面，对于 CREB 这类在非激活状态下仍可与 DNA 序列产生结合的 TFs 而言[2]，以磷酸化状态来判定它是否活化更为简捷。④精确反映活化细胞的比率：大多数情况下刺激因素对细胞的激活作用具有剂量—时间依赖性，这与单一细胞的激活程度及激活细胞的数量即占群体细胞的比率有关。

我们应用 ICC 技术对 LPS 刺激后 ECV-304 内多种信号分子的激活进行了筛选研究[3]，为今后相关工作的深入开展打下了坚实的基础。总之，ICC 技术是一种特异、敏感、经济而又操作简便的方法，可以广泛地应用于信号转导研究。

关键词：免疫细胞化学技术；转录因子
中图法分类号：R392.31 文献标识码：B

## 参考文献：

[1] 蔡文琴，王伯弥云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 78—80.
[2] Goldman P S, Tran V K, Goodman R H. The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation[J]. Recent Prog Horm Res, 1997, 52(1): 103—119.
[3] 单佑安，刘小华，罗向东，等. LPS 直接作用于血管内皮细胞激活信号分子的研究[J]. 西北国防医学杂志，2001，22(1)：2—5.

(编辑 谢义霞)

# 经验交流

文章编号：1000-5404(2003)04-0364-02

## 显微摄影的几点体会

## Experiences in microphotography

孙建森[1]，周利军[2]，糜建红[1]，姚 远[1] (第三军医大学：[1] 基础医学部解剖学教研室；[2] 预防医学系卫生毒理学教研室，重庆 400038)

在医学形态学研究领域中所得到的照片质量是决定实验结果可靠性的重要依据，尤其对一些细微结构的显示，显微摄影以其独特的直观性、可视性使结果更具说服力[1]。

目前许多单位都有自己的显微照相系统，怎样使这些仪器设备更好地为医学科研服务，充分发挥其作用，获取清晰、满意的图片，下面以 Olympus Bx—50 生物显微镜、PM—AD 照相系统为例介绍我们的一些体会。

### 1 照相显微镜结构简介，见图 1

#### 1.1 视度校正

通过调节摄影目镜来完成。视力存在个体差异，同一个人两眼视力也不尽相同，在拍摄前进行视度校正调节是必不可少的步骤。方法是用一只眼(左眼或右眼)通过调节摄像目镜上的屈光调节环，使目镜视野中心的“十”字由单线变成清晰的双线，见图 2。同时要注意在拍摄过程中要保持用同一侧眼进行观察，不可左、右眼互用，若要更换还需重新调节。

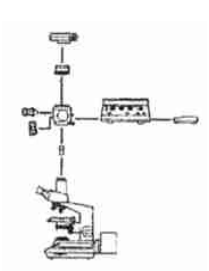


图 1 显微镜结构简介

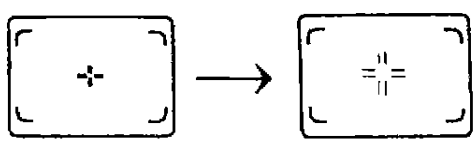


图 2 视度校正

#### 1.2 柯勒氏照明系统调节

柯勒照明系统的调节是保证获得完美、清晰照片必不可少的步骤，有些操作者往往忽略了该步调节，以至于所得到照片有偏光、偏色等不良结果。方法是通过调节轴中心螺丝钉来完成：①放置标本于载物台；②10× 物镜聚焦；③关小孔径光栅和视场光栅，此时视野出现多边形影像；④升降聚光镜，调清多边形边缘；⑤调节轴中心螺丝钉使多边形置于视野中心，见图 3；⑥打开光栅。光栅的大小以刚刚超出视野边缘为佳，见图 4，太大会产生散射光从而影响照片质量，太小视场周边会不清晰，造成照片周围曝光不足。



图 3 轴中心调节



图 4 光栅调节

#### 1.3 标本焦距的调节

1.3.1 瞳距调节 合适的瞳距便于进行视野选取、观察以及准确地聚焦，在长时间操作中可减轻眼睛的疲劳。

作者简介：孙建森(1966—)，男，河南省许昌县人，实验师，主要从事显微摄影及图像分析方面的研究。电话：(023)68752225

收稿日期：2001-10-20；修回日期：2002-05-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net