几种微量测定蛋白质新方法的比较

郭燕捷　姚志建
（军事医学科学院基础医学研究所，北京）

蛋白质的微量定量测定法至今最广为使用的是 Lowry 改进的 Folin 酚法[1]。但是 Lowry 法的操作较为麻烦，灵敏度有时也达不到要求，因此在最近的十年，许多研究者仍在继续寻找更为合用的新方法[2,3]。

我们在参考国外文献的基础上，有选择地建立了几种微量测定蛋白的新方法，并对它们的优缺点和适用范围加以比较。现将主要结果介绍如下。

材料和方法

一、Lowry 法

配制含有下列成分的混合溶液。（A）$Na_2Wo_4 \cdot 2H_2O$ 100 克、$NaMo_4 \cdot 2H_2O$ 25 克，加蒸馏水 700 毫升，85% 磷酸 50 毫升、浓盐酸 100 毫升，迴流 10 个小时，然后加入 $LiSO_4$ 100 克，蒸馏水 50 毫升，几滴溴水，持续沸腾 15 分钟，冷却，稀释至 1000 毫升，置棕色瓶中暗处存放。（B）NaOH 1 克、$NaCO_3$ 5 克、酒石酸钾钠 0.05 克、各自溶解，混合，再取 0.025 克 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 溶解后加入到混合液中，稀释至最终体积为 50 毫升。

测定操作：取被测液 1 毫升，加（B）液 1 毫升，置室温 10 分钟后加入 16 倍稀释的（A）液 4 毫升，56℃ 水浴中保温 5 分钟，冷却，在 650nm 下对试剂空白测光密度。

二、染料结合法（Bradford 法）[4]

试剂：（A）贮存液：1 克 Serva 蓝 G（西德 Serva 公司），加 200 毫升 85% 磷酸及 100 毫升 95% 乙醇溶液，室温下可长期保存。（B）应用液：30 毫升贮存液，加入 80 毫升 85% 磷酸及 40 毫升 95% 乙醇，加水至 600 毫升，室温下可保存数周。

测定操作：1 毫升样品液加 1.5 毫升（B）液，均匀混合，于 5 分钟到 1 小时之间在 595nm 处对试剂空白比色。

三、280/205nm 紫外吸收法[5]

配制一定浓度的蛋白质溶液，测定其在 280nm 处的光吸收，记下读数。然后将该溶液适当稀释（约 10—30 倍），再于 205nm 处测其光吸收。并分别与各自的标准曲线相比较，即可知样品的浓度。同时，根据下列公式，可计算出该样品中所含蛋白质的绝对量：

$$P = A_{205}/[27.0 + 120(A_{280}/A_{205})]$$

式中的 P 为样品蛋白的绝对量（毫克/毫升），A_{205} 与 A_{280} 分别为样品液在 205nm 与 280nm 处的光吸收（计算时要注意校正测定时所使用的不同稀释倍数）。

四、荧光法[6]

试剂：（A）0.05M 氢氧化钠、用磷酸调 pH 至 8.6—8.8。（B）30 毫克荧光胺（Fluorescamine，Serva 产），溶于 100 毫升丙酮内，在室温下可存放二周。（C）6N 盐酸（以恒沸点盐酸配制）。

测定操作之一：25 微升样品液加入 250 微升（A）液和 100 微升（B）液，用力振荡。于激发波长 398nm 照射下，测 480nm 处的荧光强度。

测定操作之二：样品置清洁的安瓿中，加 200 微升（C）液，充氮，并在真空下封管，110℃ 水解 20 小时。测定前，先于低温下令盐酸挥发至干，然后溶于适当量（A）液中，按测定操作

之一的比例加入（B）液，同样条件下测荧光。

以上方法中所用的试剂，除特殊标定的之外，都为北京化工厂生产的分析纯试剂。测定样品为牛血清白蛋白（美国 Sigma 公司）。所用的可见光分光光度计为上海第三分析仪器厂生产的 721 型，紫外分光光度计为日本岛津公司的 UV-120-02 型，荧光测定是用日本岛津的 RF-540 型荧光分光光度计。

结果与讨论

一、测定方法的灵敏范围

我们取牛血清白蛋白为样品，稀释成各种浓度，分别用上述几种方法进行测定，检查各种方法的灵敏度及基本呈线性反应的区域，其结果可总结为图 1。

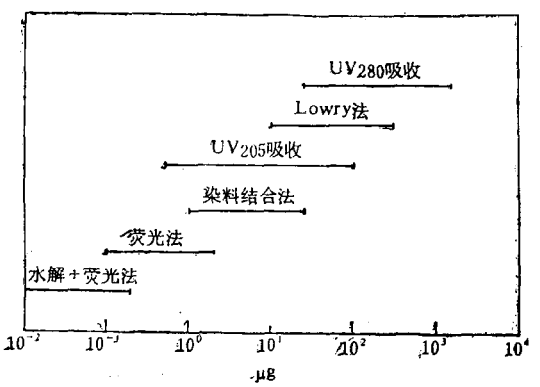

图 1　各种测定方法的应用范围

二、方法的稳定性

这里所谓方法的稳定性是指该方法的操作，不同测定批次中测定结果的一致程度。所有这些方法中，紫外吸收法最稳定，因为它所涉及的仅仅是溶液本身的性质。染料结合法与 Lowry 法的情况相似，都在试剂加完后的 5 分钟到 60 分钟之间基本稳定。荧光法则需准确地掌握激发光照射的时间长度，因为在激发光的连续照射下，荧光会逐渐减弱，所以我们采用的方法是，当样品液与荧光液混匀后，置入比色杯，然后打开激发光光门，此时荧光读数逐渐上升，取其上升至最高点后基本稳定的那一瞬间的读数。但是，如果样品液与荧光试剂混合后，未加激发光，则其在 5 到 60 分钟内呈基本稳定。

上述几种方法重复测定所取得的读数，重演性基本良好，它们的变异系数列于表 1。

三、操作的简便程度及其它特点

紫外吸收法操作简便，不破坏样品，如果对一种样品同时测定其在 280nm 与 205nm 的光吸收，还是一种推算其绝对量的简便方法。染料结合法也十分简便，只涉及一种试剂、一步操

表 1　测定方法的变异系数

	Lowry 法	染料结合法	UV		荧光法	
			205nm	280nm	不水解	水解
V (%)	4.59	3.75	0.479	0.154	3.83	4.02

1. 根据 5 次以上测定结果计算。
2. 变异系数（V）= 标准差/均数×100%。

表 2　各种蛋白微量测定方法的比较

	Lowry 法	染料结合法	紫外吸收法	荧光法	水解+荧光
灵敏度	较低	高	高（205nm） 较低（280nm）	高	最高
操作繁易	较繁	易	易	较易	繁
绝对量测量	否	否	可	否	可*
样品回收	否	否	可	否	否

* 需已知样品的氨基酸组成的分子量。

β_2 微球蛋白的固相放免测定

陈洋藻　李振甲
（解放军总医院中心实验室生化室，北京）

β_2 微球蛋白（β_2mG）放射免疫测定方法已成为临床肾功能测定，预测肾移植成活的一种较可靠的灵敏指标。此法对某些肿瘤、免疫系统疾病、肝脏病诊断也有一定实用价值，因此在临床和科研中的应用日益广泛。固相放免分析法在国外已经成为很有前途的分析手段，有相当一部分检测 RIA 药盒由液相改为固相。本文将 β_2mG 固相测定和初步结果作一介绍。

一、固相抗体包被

利用国产塑料小珠，经简单处理后，将它浸泡于 $1:10^3$ 稀释度的 β_2mG 抗体 IgG 中，室温放置一天，4℃ 再放置 2 天；用 PB 缓冲液洗去小珠上多余的抗体。接着用含 BSA 的 PB 再饱和小珠 1—2 天。临用前，洗出小珠，用吸水纸吸干。

二、操作步骤

取 0.1ml 标准 β_2mG 或待测样品于小玻璃管中，加 100μl ^{125}I-β_2mG（比度 30μci/μg），充分混匀后，再向每只小管加入小珠一枚，轻轻摇动（注意赶走气泡）于 37℃ 水浴中温育 2 小时；4℃温育 60 小时。用 PB（或蒸馏水）洗小珠三次。用 γ-计数器直接测小珠的 cpm 数，以 B/B_0 % 一标准浓度绘制标准曲线。

三、结　果

1. 非特异结合率很低：先后测定 6 次非特异管，它与 ^{125}I-β_2mG 结合率小于 2%（比用 PEG 作分离剂要低得多）。故固相 RIA 可以省去非特异管。

2. 八条标准曲线统计结果（表 1）表明曲线重复性较好。方法灵敏度小于 2.5ng/ml。

一个月内先后测定 6 次包被小珠的最高结合率，结果为 44—41.5%，表明最高结合率相当稳定。

3. 测定方法批内和批间变异系数

测定四个不同浓度（2.05—4.4ng/ml）的

作，灵敏度高，所需的设备只是最普通的比色计或可见光分光光度计。荧光法、特别是水解后的荧光测定，是上述方法中灵敏度最高的，可适用于极微量的样品测定，但操作比较复杂。上述几种方法，对不同的蛋白样品反应强度各不相同，因此最好用标定的样品蛋白制定标准曲线，或是先用 280/205nm 紫外吸收法推算出该样品的绝对量，并以此做为基准来制定标准曲线。如果所需要的仅是相对量，则可以定一种蛋白做为参比标准，结果也很稳定。

现将五种方法的主要优缺点归结成表 2。将表 2 与图 1 结合使用，就能选择出测定某一蛋白质所应采用的方法。

参考文献

[1] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
[2] Peterson, G. L.: *Methods Enzymol.*, **91**(Part 1); 95, 1984.
[3] Clark, S.: in *"Receptor Biochem. Methodol."* Vol. 2, 149—161, 1984.
[4] Read, S. M. et al.: *Anal. Biochem.*, **116**, 53, 1981.
[5] Scopes, R. K.: *Anal. Biochem.*, **59**, 277, 1974.
[6] Viets, J. W. et al.: *Anal. Biochem.*, **88**, 513, 1978.

[本文于 1985 年 11 月 22 日收到]