

一种改良的用 Ag^+ 和双硫脲测定微量蛋白质的比色方法

蔡辉国 马 双

(中国医学科学院血液学研究所, 天津 300020)

提 要

本文介绍一种在 Boratynsk 法基础上改良的蛋白质测定方法。蛋白质在含有氯化物和 Triton X-100 的碱性溶液中用 Ag^+ 和双硫脲检测。与原法比较, 本法省去离心一步, 但需要加入聚乙二醇 (PEG)-6000 作为保护剂。用本法可测定蛋白质含量低至 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品。本法操作简单、快速、经济, 具有较好的可重复性。

关键词 蛋白质测定, 双硫脲, 银离子

随着亲和层析、高压液相层析和制备电泳等技术的应用, 极大地促进了微量蛋白质的分离与纯化。但随之而来的问题是方法的灵敏度已不适应如此微量蛋白质的测定。通常采用的 Folin-酚试剂法测定蛋白质的最低浓度为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[1]; 考马斯亮蓝法为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[2]。灵敏的荧光法虽可测定低至 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白质样品^[3], 但需要昂贵的荧光分光光度计, 难以推广。

为适应微量蛋白质的含量测定, 我们在 Boratynsk 法^[4]的基础上加以改良, 建立本法。本法较原法稳定性增加, 操作简化, 可重复性强。它保持了原法的灵敏度, 能测量浓度低至 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白质样品。

1 材料与方 法

1.1 试剂

BR-TP: 含 $0.6\text{mol}/\text{L}$ NaOH, $0.08\text{mol}/\text{L}$ NaOH, $0.04\text{mol}/\text{L}$ 柠檬酸三钠, 0.1% Triton X-100 及 4% PEG-6000 (色谱纯)。

0.1% AgNO_3 (AR), 避光保存。

0.018% 双硫脲(AR)丙酮溶液, 避光保存。

1.2 基本方法

取含 $0.2\text{--}5\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白质的样品 0.6ml , 于塑料试管内, 在涡旋混合条件下加入 0.6ml BR-

TP 溶液及 0.15ml 0.1% AgNO_3 溶液。静置 12min 后在同样条件下加入 0.2ml 0.018% 双硫脲丙酮溶液。室温、静置 40min 。以生理盐水代替样品作为空白对照, 于 550nm 比色。

每次测定时均绘制标准曲线。样品的蛋白质浓度可从标准曲线上查出。

2 实 验 结 果

2.1 标准曲线 以含 0.1% PEG-6000 的生理盐水配制的牛血清白蛋白(BSA)作为标准溶液, 在 $2\text{--}8\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内吸光度值与蛋白质浓度间呈良好的线性关系, 见图 1。

2.2 重复性 一个样品在同次实验中重复测定 10 管, 在蛋白质浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 其相对误差为 $\pm 8.0\%$; 在 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 时为 $\pm 4.0\%$ 。详见表 1。同一样品在不同时间测定 10 次, 其相对误差小于 $\pm 10\%$, 详见表 2。

2.3 回收率 把标准液和样品, 其蛋白质浓度均控制在 $2\text{--}4\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间, 按体积 $1:1$ 混合作为混合管。按基本方法测定样品管、混合管及标准液管的蛋白质含量。按下式计算标准蛋白在样品中的回收率。

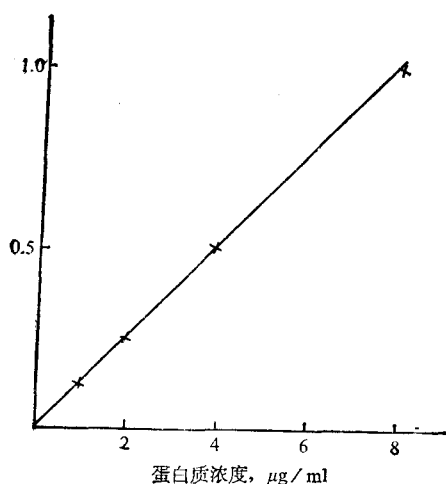


图 1 标准曲线

表 1 同一样品在同次测定中的重复性

样品编号	测定管数	$\bar{X} \pm \text{SD}$ $\mu\text{g/ml}$	相对误差 %
1	10	4.45 ± 0.18	± 4.1
2	10	2.23 ± 0.06	± 2.6
3	10	1.05 ± 0.08	± 7.9
4	10	0.66 ± 0.08	± 12.0
5	10	0.25 ± 0.02	± 9.3

表 2 同一样品在不同时间测定时的重复性

样品编号	测定次数	$\bar{X} \pm \text{SD}$ $\mu\text{g/ml}$	相对误差 %
6	10	4.26 ± 0.38	± 8.9
7	10	1.74 ± 0.17	± 9.7

$$\text{回收率} = \frac{\text{混合管测定值} \times 2}{\text{样品管测定值} + \text{标准管测定值}} \times 100\%$$

样品缓冲体系为 0.02 mol/L Tris-HCl (pH7.0) 缓冲的生理盐水。经 36 次测定其回收率为 $94.2 \pm 9.6\%$, 相对误差为 $\pm 10.1\%$ 。

2.4 稳定性 加入双硫脲丙酮溶液 40 min 后, 显色已基本稳定。在此后的 40 min 内, 其吸光度值变化不大于 $\pm 3.5\%$, 见图 2。

2.5 NaCl 浓度的影响 样品中 NaCl 浓度为 0.15—0.4 mol/L 时, 对蛋白质含量测定无明显影响, 0.6 mol/L 以上时影响逐渐显著, 见图 3。

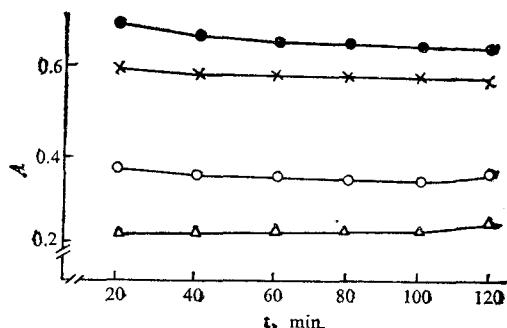


图 2 显色稳定性的观察

●—● 4 $\mu\text{g BSA/ml}$, ○—○ 2 $\mu\text{g BSA/ml}$,
△—△ 1 $\mu\text{g BSA/ml}$, ×—× 未知样品

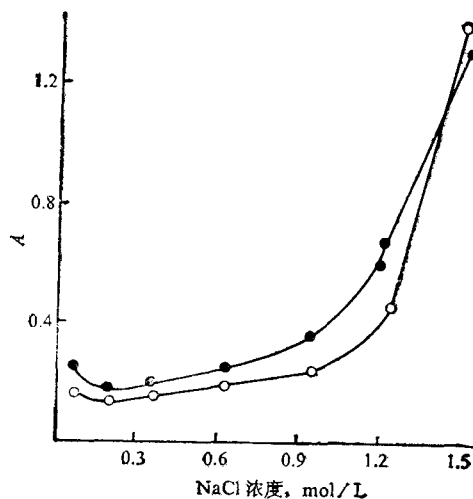


图 3 NaCl 浓度对显色的影响

●—● 42 $\mu\text{g BSA/ml}$, ○—○ 1 $\mu\text{g BSA/ml}$

2.6 PEG 的作用 使 BR-TP 溶液中的 PEG-6000 含量分别为 0, 2, 4 及 8%, 按基本方法绘制标准曲线, 见图 4。结果表明: PEG 浓度为 4% 者线性关系最好; 其余三者线性关系较差。

2.7 样品中其它共存物质的影响 样品中共存下列物质时对蛋白质含量 (2.67 $\mu\text{g/ml}$) 测定没有明显影响: 1% 甘油, 3.3% 蔗糖, 3.3% 乙醇, 3.3% 丙酮, 10 mmol/L Tris, 10 mmol/L 甘氨酸, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L 醋酸钠, 10 mmol/L 四硼酸钠, 10 mmol/L 柠檬酸三钠, 4 mmol/L Tris-甘氨酸缓冲液 (pH8.9), 2 mmol/L Tris-HCl (pH7.0) 缓冲的生理盐水及

表 3 样品中共存物质对蛋白质测定的影响

共存物质及其浓度	影响率(%)
0.1% SDS	160
0.02% SDS	135
0.02% Tween-20	163
0.1mol/L Tris	311
0.1mol/L 甘氨酸	310
10m mol/L CaCl_2	152
10m mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	224
10m mol/L EDTA	169
20m mol/L THS ¹⁾	114

1) THS: 20mmol/L Tris-HCl, pH7.0,
0.15mol/L NaCl

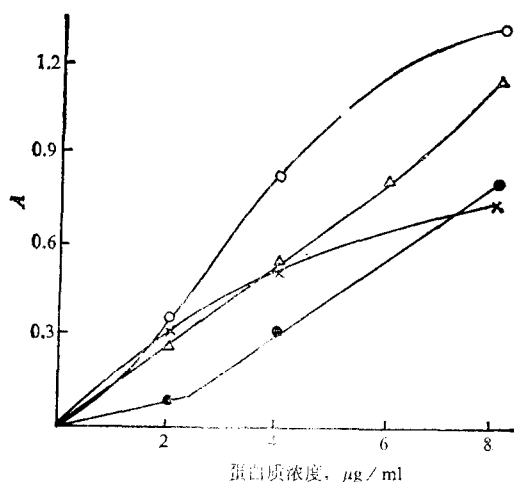


图 4 PEG 对标准曲线的稳定作用

图中 PEG 浓度分别为: ●——● 0%, ○——○ 2%,
△——△ 4% 和 ×——× 8%

10m mol/L 磷酸盐 (pH6.8) 缓冲的生理盐水 (PBS)。

表 3 中所列物质对蛋白质含量测定 (2.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时) 有一定影响。

2.8 其它 我们对 BR-TP 溶液中 Triton X-100、NaOH、柠檬酸三钠以及 AgNO_3 、双硫脲的最适浓度也进行了观察, 结果与原法无明显差别。

3 讨 论

Boratynsk 原法中在比色前有离心一步, 我们按原法操作时, 发现离心上清液颜色深浅不定, 有时几乎无色, 影响结果的重复性。本法省去离心一步, 但需要在碱性溶液中加入 PEG-6000 作为保护剂。由于比色液呈紫红色, 并略带混浊, 实际上是比色加比浊的方法。比浊法虽不常用, 但早在五十年代就被用于蛋白质的含量测定^[2]。在本法中, 空白、标准及样品管中 AgCl 浓度是相同的, 其浊度值可视为不变。加之, AgCl 在涡旋混合条件下被很好地分散, 并在 PEG 保护下形成较为稳定的类胶体溶液。其显色吸光度值和蛋白质浓度间呈现良好的线性关系, 并可在 2 小时内基本上维持不变。

我们使用 DU-70 分光光度计 (Beckman 公司出品) 对测定用波长进行了选择。用生理

盐水作背景扫描, 用 BSA 作标准液进行吸收光谱分析。结果表明其最大吸收峰在 530—570 nm, 几乎成高平台状。故选用中间值 550nm 作为测定用波长 (图略)。和原法测定波长 555nm 相比, 没有明显差别。

本法甚为灵敏, 但影响因素也多。表 3 中列出了在层析和电泳中常用试剂对蛋白质测定的影响。质言之, 凡是在碱性溶液中能产生沉淀的物质 (如 Mg^{2+} , Ca^{2+} 及重金属离子等), 能和 Ag^+ 形成某种络合物的物质 (如铵盐、胺及氨基酸等) 及核酸等都能明显地影响其蛋白质含量的测定。因此, 应用本法测定细胞粗提液、血及尿等含有复杂共存物质的样品的蛋白质含量时误差较大, 而应用于经液相层析和电泳分离后的样品时, 则甚为适宜。

如果样品中的共存物质对其蛋白质测定有明显影响, 可试用如下措施之一解决: (1) 用透析或 Sephadex G-25 层析法去掉样品中的低、小分子物质, 并把溶液体系换成生理盐水; (2) 如果样品蛋白质浓度高, 可用生理盐水稀释样品, 使其共存物被稀释到对测定的影响可以忽略不计的程度; (3) 在测定样品时, 可同时测定标准蛋白在此样品中的回收率。然后用回收率校正其测定值, 得到较为准确的结果。

如果样品缓冲液对测定有影响, 也可把溶解标准蛋白的生理盐水换成相应的缓冲液, 并用此缓冲液作空白对照来比色, 即可避免此种缓冲液对测定的影响。我们曾分别用 PBS 或

THS 来配制标准蛋白液,其标准曲线也能呈现较好的线性关系。

按原法说明,用其它去垢剂(如 NP-40, SDS 或脱氧胆酸盐等)替换 Triton X-100 也能获得类似的效果。但其最适浓度要通过实验来确定。这为含有其它去垢剂的样品的蛋白质测定,提供了可供选择的余地,也扩大了本法的应用范围。

本法同原法一样,均可测定蛋白质浓度低至 $0.2\mu\text{g/ml}$ 的样品。不需要特殊仪器,方法简

单,经济,重复性较好,适用于基层单位推广应用。

参 考 文 献

- 1 Lowry O H *et al.* *J Biol Chem*, 1951; **193**:265
- 2 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976; **72**:248
- 3 Paterson G L. In Colowick S P, Kaphan N O eds *Methods in Enzymology*, New York: Academic Press, 1983; Vol **91**(part 1): 95—119
- 4 Boratynsk J. *Anal Biochem*, 1985; **148**:213
- 5 管原洁,副岛正美著,张旭译. 蛋白质的定量法. 第 2 版, 北京: 农业出版社, 1981: 194—196

(上接第 67 页)

表 2 纯 Li 链和杂质链的密立根集居数分布

晶胞	-1		0-Cell		+1	
纯 Li 链	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000
杂质链	MO	3.0090 2.9852	1.0079 1.0079		2.9852 3.0090	
	HFG	2.9859 2.8164	1.1820 1.1769		2.8164 2.9841	

周期性链中引入杂质后,其原能谱中将出现杂质束缚态、共振态等,并使链上电荷重新分布。这种变化在给定链下与杂质的性质及分布相关。HFG 法由于引入了格林函数这一数学工具,使我们可以对局域杂质进行定量的研究。该方法与 MO 法相比物理模型更接近于实际情况,其结果也更具有参考价值 HFG 法是目

前研究局域杂质多聚物结构理论中最为完善的方法之一。我们的工作为进一步研究非对称性杂质多聚链,直至实际生物多聚物分子结构打下了基础。象蛋白质的半导体性与其非周期性成分的关系、多肽链中残基的作用、DNA 长链中的碱基的作用等都是有待进一步研究的问题。

参 考 文 献

- 1 Smith P V *et al.* *J Phys C*, 1985; **18**: 3157
- 2 Ladik J, Seel M. *Phys Rev B*, 1976; **13**: 5338
- 3 Seel M, Ladik J. *Phys Rev B*, 1985; **32**: 5124
- 4 Seel M. *Inter J Quantum Chem*, 1984; **26**: 753
- 5 Hebre W J, Steware R F, Popel J A. *J Chem Phys*, 1969; **51**: 2657
- 6 Ditchfield R, Hebre W J, Popel J A. *J Chem Phys*, 1971; **54**: 726
- 7 Chen R S *et al.* *Chem Phys*, 1988; **120**: 177