

经验交流

用 4,4'-二羧酸-2,2'-二喹啉测定红细胞膜蛋白

汪 洪 亮

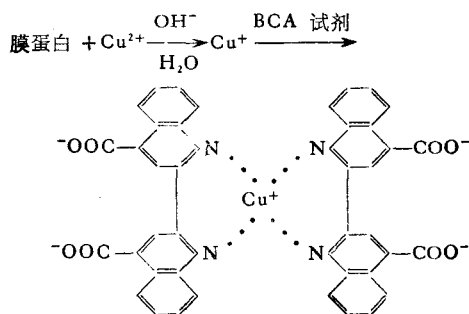
(江苏省赣榆县人民医院, 赣榆 222100)

关键词 膜蛋白, 红细胞, 蛋白质测定, 4,4'-二羧酸-2,2'-二喹啉

细胞膜蛋白质的测定在生物物理、生物化学及医学等领域的研究中起重要作用, 许多细胞膜上酶、离子、脂类、基团及功能的测定均与膜蛋白的水平有关, 需测定膜蛋白量。目前膜蛋白的测定大多采用酚试剂法^[1], 该法灵敏度高, 但酚试剂在碱性溶液中不稳定, 干扰因素多, 特异性差, 在有非离子型表面活性剂存在下易形成难溶性沉淀, 不能用于自动分析仪器^[2]。P K Smith 等^[3]报道利用蛋白质能使二价铜离子还原为亚铜离子, 后者在碱性溶液中与 4,4'-二羧酸-2,2'-二喹啉 (BCA) 形成紫红色络合物来测定蛋白质。本文对原法进行了改进, 降低了试剂成本, 提高了测定灵敏度, 用于测定红细胞膜蛋白, 结果与 Lowry 法有较好的相关性, 现将操作方法和实验结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 原理 红细胞在低渗溶液中溶血, 离心分离出的膜蛋白在碱性溶液中将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , 后者与测定试剂中 BCA 形成紫红色的络合物, 该络合物在 562nm 处的吸光度与膜蛋白含量成正比, 其指示反应为:



1.2 试剂

1.2.1 BCA 试剂贮存液: 称取 BCANa_2 ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4\text{N}_2\text{Na}_2$, 为奶油色粉末水溶性化合物, 需密封保存, 分子量 388.20) 4.0g、无水碳酸钠 20 g、碳酸氢钠 9.5g、酒石酸钾钠 1.5g、氢氧化钠 4.0g, 加蒸馏水

溶解并稀释至 1L, 用 12.5 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 11.25, 室温可长期保存。

1.2.2 BCA 试剂应用液: 取 BCA 试剂贮存液 100ml, 加 0.16 mol/L 硫酸铜溶液 2ml, 边加边混匀, 该试剂呈浅黄绿色, 需新鲜配制, 室温下约可稳定 10h 以上, 如变紫红色即不能使用。

1.2.3 2.0g/L 蛋白标准液。

1.3 操作步骤

取抗凝血, 3000r/min 离心 5min, 去血浆, 用生理盐水洗 2 次, 4000r/min 离心 10min, 取压积红细胞 40μl, 加 0.01 mol/L pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液 5ml, 混匀。10min 后, 10000r/min 离心 10min, 弃上清, 沉淀用 Tris-HCl 缓冲液离心洗涤 2 次, 弃上清, 沉淀为乳白色红细胞膜, 将其悬浮于 40μl 生理盐水中, 此为测定管 (U), 标准管 (S) 加 2.0 g/L 蛋白标准液 40μl、空白管加生理盐水 40μl, 各管加 BCA 试剂显色液 4.0ml, 混匀, 放 37℃ 保温 20min, 取出在室温放置 10min, 用 722 型分光光度计, 波长 562 nm, 空白管调零, 读取 U 管和 S 管的吸光度 (A)。每升压积红细胞中含膜蛋白量以 g/L 表示:

$$\text{膜蛋白量 (g/L)} = \frac{A_u}{A_s} \times 2$$

2 结果与讨论

2.1 吸收曲线与线性关系 在 722 型光栅分光光度计上, 分别对试剂空白和显色后的标准管进行吸光度测定, 波长从 350nm 至 600nm, 结果发现, 试剂空白的吸收峰在 400nm 处, 与 Cu^+ 络合后吸收峰在 562 nm 处。将蛋白标准液用生理盐水配成 1.0—8.0 g/L, 按本法进行测定, 标准曲线见图 1, 发现蛋白质浓度在 0.05—5.0g/L 内, 浓度与吸光度间线性关系良好。据分光光度计的检测极限吸光度为 0.001, 曲线性回归法求得本法测定蛋白质的最低浓度为 5.0 μg/

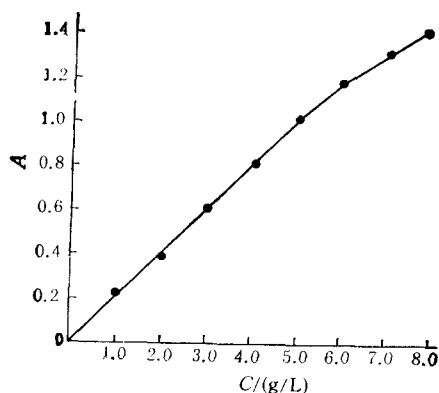


图1 标准曲线

ml, 故本法灵敏度很高, 与酚试剂法^[1]相近。

2.2 溶血剂的选择 破红细胞膜不当容易引起膜蛋白的丢失, 为了排除溶血剂对显色结果的影响, 我们选择 0.01mol/L pH7.4 Tris-HCl 缓冲液, 据文献报道其目的是对红细胞膜打洞, 不使膜破碎, 蛋白不易丢失, 使测定有较好的准确性和重复性。

2.3 酸度对反应的影响 用盐酸或氢氧化钠溶液分别调节反应液的 pH 为 10.50, 10.75, 11.00, 11.25, 11.50, 11.75, 12.00 进行测定, 结果发现 pH < 11.00、pH > 11.50 吸光度值均下降, 唯有在 pH = 11.25 时吸光度值最高(图 2)。

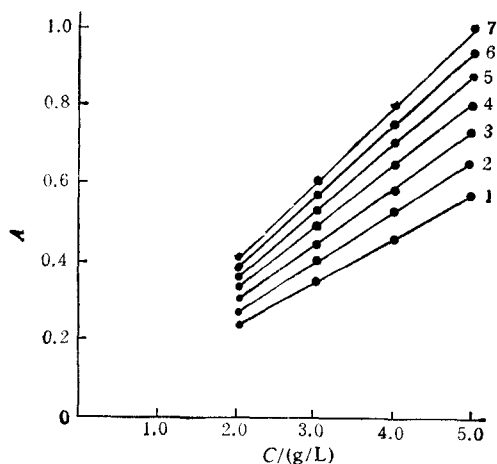


图2 不同 pH 对显色反应的影响

1.pH10.50 2.pH12.00 3.pH10.75 4.pH11.75
5.pH11.00 6.pH11.50 7.pH11.25

2.4 温度对反应的影响 分别在室温, 37℃ 和 60℃ 保温进行测定, 结果发现室温下反应很慢, 吸光度值很低, 灵敏度较低; 60℃ 虽反应快, 但能使空白管吸光度增加, 影响因素增多, 降低了反应的灵敏度和重复性; 37℃ 保温条件下, 反应速度较快, 空白吸光度低, 灵敏度高、重复性好。

2.5 不同种类蛋白质的影响 分别对不同浓度的白蛋白、球蛋白标准液进行测定, 所得结果无显著性差异 ($t = 0.2943$, $P > 0.5$), 用本法测定不同细胞膜蛋白及膜上不同种类蛋白时, 有良好的线性和准确的结果。

2.6 表面活性剂的影响 许多实验均需加入非离子型表面活性剂, 对蛋白质起增溶稳定作用。本法对 Triton X-100, Brij-35、乳化剂 OP、吐温-80 等加入均不干扰测定, 对这些表面活性剂的加入会使酚试剂法产生难溶性沉淀, 使邻苯三酚红钼络合显色法^[1]的结果升高。

2.7 试剂浓度的选择 应用动力学法^[3]对 Cu^{2+} 与 BCA 络合物的组成比进行了测定, 结果发现络合比为 1:2。选择 BCANa_2 的浓度为 10.3 mmol/L, Na_2CO_3 0.189 mol/L, 酒石酸钾钠为 5.67 mmol/L, NaOH 0.1 mol/L, NaHCO_3 0.113 mol/L, CuSO_4 0.16 mol/L。

2.8 显色时间及稳定性 置 37℃ 保温, 测定 5—60 min 时不同保温时间的吸光度, 发现在 15 min 内显色反应迅速, 到 20 min 时逐渐减慢, 保温 20 min 后, 随时间的增加吸光度值基本不变, 选择 37℃ 保温 20 min, 显色后在室温放置 30—120 min 时测其吸光度, 结果在 120 min 内吸光度值保持不变, 故显色稳定性良好。

2.9 重复性和回收试验 对 10 份样品每份同时测定 20 次, 结果 $\bar{X} = 3.90 \text{ g/L}$, $\text{SD} = 0.88$, 变异系数为 1.92—2.26%, 平均为 2.10%。对膜蛋白含量为 3.90 g/L 的样品, 加入相当于 0.2—1.0 g/L 蛋白标准液, 测定结果其回收率为 97—103%, 平均为 99.3%。

2.10 与酚试剂法相关性 取 50 份样品, 分别用本法和酚试剂法进行测定, 结果 $Y = 0.9854X + 0.0613$, 相关系数 $r = 0.9920$, 与 1 非常接近, 故两法相关性良好, 结果基本一致。

参 考 文 献

- 1 Lowry OH, Rosenbrough N J, Farr A L et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193:265
- 2 Schlabach T D. Postcolumn detection of serum proteins with the Biuret and Lowry reactions. *Anal Biochem*, 1984; 139:309
- 3 Smith P K, Krohn R I, Hermanson G T et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985; 150:76
- 4 汪洪亮, 吴从山等. 用邻苯三酚红钼络合显色法测定临床样品蛋白质含量. *生物化学与生物物理进展*, 1989; 16(1): 78
- 5 陈丹华等. 动力学方法测定络合比. *分析化学*, 1986; 14(4): 257