

血清中酪氨酸含量测定——荧光光密度法

高思政 汤建平 张 玮 程治平

(哈尔滨医科大学内分泌研究室)

酪氨酸在体内是多种蛋白类激素合成的原料,经过代谢,可转变成甲状腺激素、肾上腺素、去甲肾上腺素等生理活性物质。

赵白鸽等^[1]研究证明酪氨酸有对抗 hCG 致离体卵泡颗粒细胞孕酮、雌激素及 cAMP 生成的作用,因此,测定血清中酪氨酸含量的变化,具有一定的意义。

与亚硝基萘酚试剂的反应是测定酪氨酸含量的一种特性反应,但灵敏度较低^[2]。近年来发现丹磺酰氯(1-二甲氨基萘-5-磺酰氯 DNS-Cl),与氨基酸反应后产生荧光很强的衍生物(DNS-氨基酸),在聚酰胺薄膜上进行层析、灵敏度可达 $1 \times 10^{-12} M$ ^[3]。

我们将脱蛋白后的家兔血清与 DNS-Cl 反应,然后经聚酰胺薄膜双向层析,再用双波长薄层扫描仪(CS-910,岛津)进行荧光光密度法原位测定,对在不同生理条件下,兔血清中的酪氨酸含量进行了观察。

一、材料与方法

1. 材料

(1) 标准氨基酸混合液: 分别配制丙、甘、谷、天门冬、亮、异亮、色、苯丙、缬、蛋、酪、脯、丝、胱、精氨酸等 15 种氨基酸的标准溶液,每种溶液的浓度是 5 毫克/10 毫升。各取 1 毫升混合。

(2) 仪器: 双波长薄层层析扫描仪(CS-910,岛津)。附: 积分仪(CHROMATOPAC, C-E1B)。

2. 方法

(1) 血清的处理: 吸取新鲜母兔血清 50—100 微升(如不立即使用,放置在一 20℃ 冰箱中保存),加入 7 倍体积的双蒸水,混匀,依次加入

与血清等体积的 2/3N 硫酸及 10% 钨酸钠溶液,充分混合,静置 10 分钟后,离心 10 分钟(3500 转/分)。

(2) 丹磺酰化反应: 吸取上述离心后的上清液 100 微升,加入碳酸钠缓冲液 ($Na_2CO_3/NaHCO_3$, 0.05M, pH10.4) 200 微升及丹磺酰氯无水丙酮溶液(2.5 毫克/1 毫升) 200 微升,充分混匀,于室温下避光放置 60 分钟,反应完毕后,置于 55℃ 水浴中,以缓慢的空气流小心吹干,然后加入 40 微升甲醇(A.R 重蒸馏),充分混合,使残渣全部溶解。

(3) 层析操作^[4,5]: 血清氨基酸经丹磺酰化后,所得 DNS-氨基酸甲醇溶液,用微量注射器吸取 2 微升,在聚酰胺薄膜上(浙江黄岩产 7×14 厘米)进行点样,原点点于左下角,直径约为 2 毫米。为了进行对比,将反应后的 DNS-标准酪氨酸甲醇溶液 2 微升点于此薄膜的右下角(对称位置),展层时,第 I 向方向相同,同时展开,第 II 向方向相反,分两步展开,先左侧,溶剂前沿至 7 厘米时,将薄膜取出晾干再进行右侧展开,如下图所示:

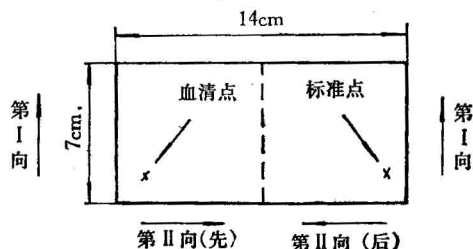


图 1

第 I 向展开剂为苯:冰乙酸(9:1V/V),

第 II 向展开剂为 85% 甲酸:水(1.5:20V/V)。

(4) 荧光扫描: 按以下条件进行: 氘灯光源、单波长, 反射方式、最大激发波长为 312 毫

微米,最大发射波长为 500 毫微米,狭缝 1×7 毫米(线形扫描)、扫速为 20 毫米/分,纸速为 20 毫米/分、记录器灵敏度×10。

(5) 计算:按 Spivak 公式^[6]

$$K_{aa(i)} = \frac{I_{DNS-aa(i)} / C_{aa(i)}^0}{I_{DNS-aa(s)} / C_{aa(s)}} \quad (1)$$

即:
$$C_{aa(i)}^0 = \frac{C_{aa(s)}}{K_{aa(i)}} \times \frac{I_{DNS-aa(i)}}{I_{DNS-aa(s)}} \quad (2)$$

式中: $K_{aa(i)}$ ——荧光强度与浓度的比例系数
 $I_{DNS-aa(i)}$ ——待测氨基酸色点的荧光强度。
 $I_{DNS-aa(s)}$ ——标准氨基酸色点的荧光强度。
 $C_{aa(i)}^0$ ——待测氨基酸溶液的浓度
 $C_{aa(s)}$ ——标准氨基酸溶液的浓度
 以不同浓度的标准酪氨酸溶液进行对比,测定结果 $K_{aa(i)}$ 为 $1.9 \pm 0.5(S.D)$ $n = 19$, C. V. 为 2.9%。标准酪氨酸溶液(1 毫克/10 毫升),稀释成 0.3 毫克/10 毫升,即浓度为 0.166mM,代入(2)式即得:

$$C_{aa(i)}^0 = 0.087 \times \frac{I_{DNS-aa(i)}}{I_{DNS-aa(s)}} mM$$

因此,扫描结果按下式计算:

血清游离酪氨酸 = $\frac{\text{血清点的测定值}}{\text{标准点的测定值}} \times 0.087 mM$

二、结果与讨论

1. DNS-酪氨酸在双向层析谱中的位置:

分别使标准酪氨酸溶液,标准氨基酸混合液,血清氨基酸同丹磺酰氯溶液反应,在聚酰胺薄膜上进行双向层析,得 DNS-酪氨酸斑点的 Rf 值为:

$$Rf(I\text{向}) 0.44 \pm 0.03(S.D.)$$

$$Rf(II\text{向}) 0.03 \pm 0.002(S.D.)$$

用荧光分光光度法(荧光分光光度计 RF 510, 岛津)测定了 DNS-酪氨酸的定性峰为 312/452 毫微米(F×52),结果与本法一致。

2. 血清中酪氨酸的含量: 根据上述丹磺酰化反应法,对母兔血清中酪氨酸的含量进行了测定,其含量为 $0.057 \pm 0.011mM$ ($n = 23$),最低检测水平为 5 毫微克酪氨酸。

3. 标准曲线: 将标准酪氨酸储备液(1 毫

克/10 毫升)以双蒸水稀释成 6 种不同浓度的稀溶液。按前述方法测定各种浓度的相对荧光强度,结果表明:酪氨酸含量与其相应的 DNS-衍生物的荧光强度成直线关系,回归方程: $y = -5.35 + 1.74x(r = 0.872)$,标准曲线如图 2 所示:

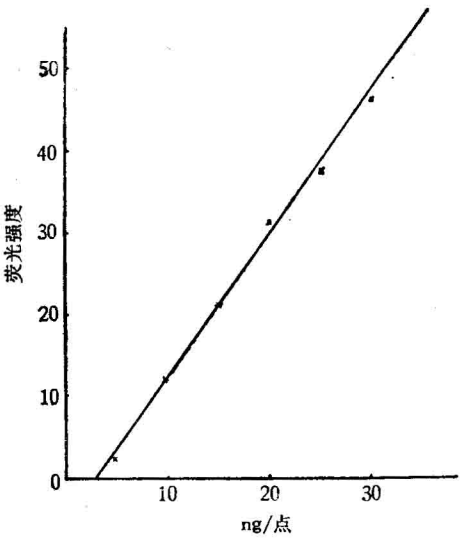


图 2

4. 再现性: 在同一聚酰胺薄膜上,对同一个 DNS-酪氨酸荧光斑点及不同的 DNS-酪氨酸荧光斑点(浓度相同)进行重复扫描,以及对在不同的聚酰胺薄膜上的荧光斑点重复扫描,从而对本测定法的再现性进行了比较,结果如表 1 所示,所得变异系数(均值)在 2.1% 与 5.0% 之间。

表 1 相同浓度 DNS-酪氨酸的扫描再现性

	同一聚酰胺薄膜				不同聚酰胺薄膜	
	同一荧光斑点		不同荧光斑点		不同荧光斑点	
	最低值	最高值	最低值	最高值	最低值	最高值
扫描均值($\bar{x}$)	100.9	128.5	102.1	102.6	104.2	106.6
标准差(σ)	0.47	4.8	3.3	6.3	2.46	8.0
变异系数	0.46	3.7	3.2	6.1	2.36	7.5
$C = \sigma / \bar{x} \times 100$	2.1%		4.7%		5.0%	

5. 回收试验: 在血清中加入一定量的标准酪氨酸, 按本法测定酪氨酸的回收率 (见表 2)。平均回收率为 $98.5 \pm 2.29\%$, 变异系数为 2.3%。

表 2 回收率的测定

No.	加入量 ($10^{-12}M$)	测定量 ($10^{-12}M$)	回收率 (%)
1	40	41.2	103.2
2	40	38.9	97.3
3	40	38.6	96.5
4	40	38.5	96.3
5	40	39.8	99.5
6	40	39.3	98.3
均值 ($\bar{x}$)			98.5%
标准差 (σ)			2.29
变异系数 ($C = \sigma/\bar{x} \times 100$)			2.3

6. 血清中酪氨酸含量的变化:

(1) 正常膳食的影响: 分别采取进食前、进食后 0.5、1.5、3.5、7.5 小时的母兔耳静脉血 1.0 毫升, 静置后进行离心分离, 所得血清按前述方法测定酪氨酸含量, 结果如图 3 所示: 由上可见, 在进食以后血清酪氨酸含量显著升高,

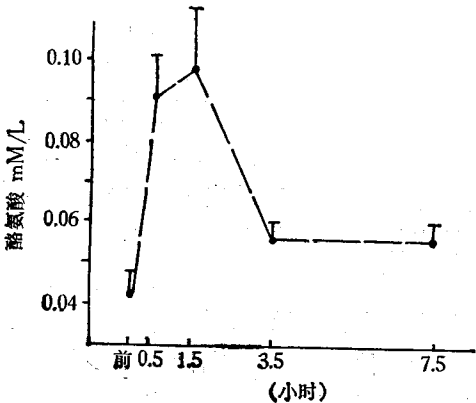


图 3

至 1.5 小时左右开始下降, 约至 3.5 小时含量逐渐恢复正常。

(2) 注射酪氨酸后, 血清酪氨酸的变化: 于空腹时, 静脉注射一定量酪氨酸 (10 毫克/公

斤体重), 然后测定血清中酪氨酸含量, 获得以下曲线 (见图 4):

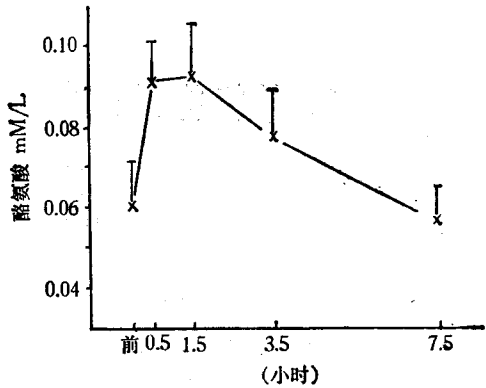


图 4

7. 讨论: 在丹磺酰化反应中, 反应条件是影响反应定量性的主要因素, 如: 溶液的 pH 值, 反应时间以及避光等。因此, 一定要严格予以控制, 否则, 重复性较差。还值得指出的是: 在双向层析中, 原点直径要保持一致, 以免在荧光斑点扫描时, 产生较大偏差。此外, 还应注意荧光污染问题, 试验所用试管、吸管以及微量注射器等器材, 必须充分浸泡、洗净, 以减少由于污染造成的误差。

我们在预备实验中曾观察到注射了酪氨酸后, 再由兔耳静脉注入 GnRH, 血清酪氨酸含量明显下降, 提示 GnRH 有加速酪氨酸消失的作用, 这一现象的意义有待进一步实验, 加以探讨。

本法与洗脱法相比, 操作简单, 误差小, 具有简便、快速、灵敏度高的特点 (毫微克水平)。

参 考 文 献

- [1] 赵白鸽等: 《生殖与避孕》 2(1), 23, 1982.
- [2] 蔡祝辉等: 《生物化学与生物物理进展》 5, 49, 1979.
- [3] 王自勉等: 《生理学报》 33(1), 103, 1981.
- [4] Airhart, J. et al.: *Anal. Biochem.*, 53, 132, 1973.
- [5] Macek, K. et al.: *J. Chromatog.*, 193, 421, 1980.
- [6] Spivak, V. A. et al.: *Anal. Biochem.*, 44, 12, 1971.

[本文于1982年8月23日收到]