

技术与方法

蛋白质紫外测定数据的微机分析

陈定南 刘布鸣 樊亦军

(广西中医药研究所, 南宁)

提 要

本文叙述了以波长 280nm 为中心的蛋白质紫外测定数据微机的分析程序, 应用本文程序测算了几种生物样品中的蛋白含量及核酸总量。程序使用 BASIC 语言编制, 在 KC-805 微机上通过。

蛋白质定量分析是生物医学领域中的一项重要技术。由于紫外法具有许多优点及仪器成本近年来逐渐下降而日益为人们所重视。尤其是计算机技术的长足进步, 已为紫外测定数据的自动分析提供了有力手段。本文就波长 280nm 为中心的蛋白测定法, 样品中混有核酸时的蛋白测定及标准蛋白数据库等问题进行了探讨, 并用紫外法对小鼠肝、脾组织和人泪液的蛋白含量进行了直接测定, 避免了复杂的分离过程, 得到较为满意的结果。本程序采用 BASIC 语言编写, 在东芝 KC-805 微机上运行通过。

一、原理及方法

1. 定量分析原理

对于含有色氨酸和酪氨酸的蛋白质, 在波长 280nm 处有最大吸收峰。根据比尔-朗伯定律, 按照 (1) 式即可计算样品中的蛋白质含量, 由于实际上蛋白质往往与核酸共存, 而核酸中的嘌呤、嘧啶成分, 在波长 260nm 处有极强的吸收峰, 对蛋白质的吸收峰将产生迭加干扰, 故仅用 (1) 式计算这种混合样品会造成一定的误差。我们参照文献方法^[1], 对这种混合样品采用 (2) 式进行计算:

$$C(g\%) = (A/E_{1cm}^{1\%}) \cdot D \quad (1)$$

$$C(mg/ml) = F \cdot \frac{1}{L} \cdot A_{280} \cdot D \quad (2)$$

式中: C 为蛋白含量; A 为紫外吸收值; $E_{1cm}^{1\%}$ 为百分吸收系数; D 为稀释倍数; F 为校正因子; L 为光程。

测定样品时首先求出 A_{280}/A_{260} 比值, 当比值 >1.75 时, 此样品可视为纯蛋白溶液, 只需查出相应参考蛋白的 $E_{1cm}^{1\%}$ 值, 即可按 (1) 式计算蛋白含量。当比值 ≤ 1.75 时, 此样品则可能混有核酸, 根据比值, 并辅以一元拉格朗日三点插值法, 即可查到“校正因子 F 值”, 同时也查出核酸含量, 然后用 (2) 式计算样品中的蛋白含量。若比值 <0.595 则认为是纯核酸。

目前各种蛋白标准样品的 $E_{1cm}^{1\%}$ 值已汇编成册^[2,3], 利用这些标准值能方便地完成蛋白质样品的计算而毋需另做标准曲线。

2. 仪器

Perkin-Elmer 554 型紫外/可见分光光度计。

3. 程序框图与说明

本程序采用人机对话形式输入各变量信息, 自动判断应采用的计算公式, 借助程序中的常见蛋白标准数据库查找相应参数, 最终结果

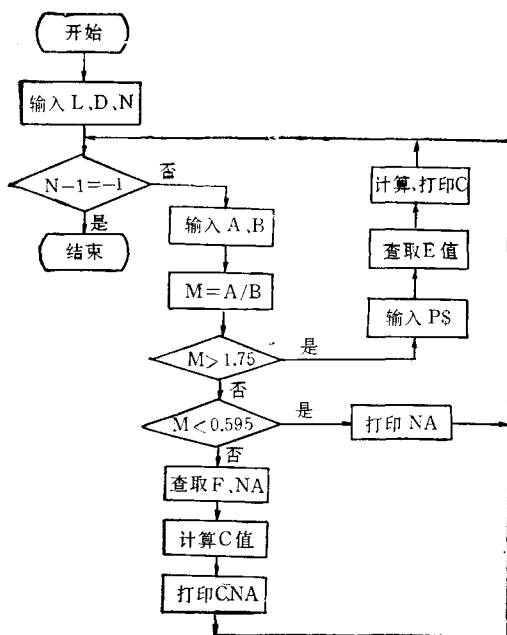


图1 程序框图

L——光程 (cm); D——溶液稀释倍数; N——样品数目; E——标准数据; M—— A_{280}/A_{260} 比值; PS——蛋白质标准品英文缩写名; C——蛋白含量; NA——核酸含量; A、B——紫外吸收值; F——校正因子。

经自动小数位取舍处理后打印输出。

二、程序应用与结果

1. 小鼠肝、脾组织中蛋白含量的测定

取本所饲养的 DBA/2 纯种小鼠, ♂ 性, 随机分为 3 组, 每组 10 只。第一组为生理盐水对照组, 第二、三组分别为羟基喜树碱组 (简称 HCPT) 和喜树碱组 (简称 CPT)。HCPT 组和 CPT 组给药剂量为“等毒剂量”, 分别为 1.6 mg/kg 和 0.2mg/kg。此剂量是取自 HCPT 和 CPT 各自的 1/10 最小中毒量 (量-效曲线上因出现毒性而无效的最小剂量)。连续腹腔给药 7 天, 第 8 天处死小鼠, 取肝、脾作常规匀浆, 离心、低渗处理 (去离子水为低渗剂) 24 小时后, 取上清液待测, 肝、脾匀浆液浓度分别为 10% 和 5% (g 组织/100ml)。经 20 倍稀释后即可直接测定紫外吸收值, 结果见表 1, 2。

在“等毒剂量”下肝、脾组织中蛋白含量均有所下降 ($P < 0.01$), 尽管在脾匀浆 CPT 组中 P 值 > 0.05 , 但其蛋白含量也低于对照组。与此相反, 肝、脾组织中核酸总含量未见下降, 反而有所增加。

表1 小鼠肝、脾匀浆液蛋白含量

组 别	肝匀浆液蛋白含量 (mg/ml)		脾匀浆液蛋白含量 (mg/ml)	
	$\bar{x} \pm S. D.$	P 值	$\bar{x} \pm S. D.$	P 值
对照组	0.867 ± 0.091		0.369 ± 0.135	
HCPT 组	0.505 ± 0.054	< 0.01	0.261 ± 0.017	< 0.01
CPT 组	0.445 ± 0.132	< 0.01	0.289 ± 0.112	> 0.05

表2 小鼠肝、脾匀浆液中核酸总含量

组 别	肝匀浆液中核酸含量 (%)		脾匀浆液中核酸含量 (%)	
	$\bar{x} \pm S. D.$	P 值	$\bar{x} \pm S. D.$	P 值
对照组	4.914 ± 0.657		10.104 ± 2.116	
HCPT 组	5.468 ± 0.847	> 0.05	9.585 ± 2.182	> 0.05
CPT 组	6.682 ± 1.074	< 0.01	9.568 ± 1.667	> 0.05

2. 人泪液中蛋白含量的测定

流行性出血性结膜炎 (EHC), 民间俗称

“红眼病”, 是一种病毒性眼科传染病, 近年来各地夏季时有流行。笔者采集了 13 例 EHC 患

者的泪液(采集量为 0.1ml),经 20 倍稀释后直接进行紫外测定,同时采集了 20 位正常人泪液作为对照并测定其紫外吸收值,结果如下:

表 3 人泪液蛋白和核酸含量的变化

组别	蛋白质含量 $\bar{x} \pm S.D.$ (mg/ml)	核酸含量 $\bar{x} \pm S.D.$ (%)
对照组	14.160 $\pm$ 4.120	0.671 $\pm$ 0.111
EHC 组	22.683 $\pm$ 8.760	0.633 $\pm$ 0.213
P 值	<0.05	>0.05

从表 3 可以看到,与对照组相比较,EHC 组蛋白含量单一升高(P 值 <0.05),而核酸总量基本不变,提示有大量蛋白质在膜通透性改变时释放逸出。这可能是一种机体的局部应答反应,以抵御外来病毒侵犯。我们在进一步研究中发现免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 均大量增加,同时还发现泪液中乳酸脱氢酶同工酶谱发生改变。本结果如经进一步研究,可能了解 EHC 病因、临床诊断及预后分析是有益的指标。有关资料待发表。

三、讨 论

天然蛋白质中色氨酸、酪氨酸含量决定了紫外 280nm 吸收峰的大小。虽然对粗制剂的蛋白质定量测定,目前人们大都仍用 Folin 酚法(如 Lowry 法),但对同一来源生物样品蛋白质含量进行比较时,紫外法测定蛋白质含量具有快速简便,不破坏样品,用量少及可直接对水溶液样品测定等优点,再辅以微计算机数据

处理将使此法比其它传统定量手段更受人们欢迎。此法特别适于大量、重复的样品测算,在分析处理组与对照组蛋白相对含量差异时,不失为一个有效的简便方法。

HCPT 和 CPT 均为有效的抗肿瘤药物^[4,5],我们的研究表明,在本实验所用的等毒剂量下,两药均可引起蛋白质含量降低,而核酸含量尚未受到影响。看来,药物在低剂量下主要抑制蛋白的合成。

EHC 是一种由病毒引起的眼科疾病,我国各地每隔若干年即流行一次。有关其流行病学和临床报道已积累了一些资料^[6,7],但 EHC 患者泪液中生化物质变化的测定尚不多见。本文用紫外法测定 EHC 患者泪液蛋白含量明显增加,为进一步的生化分析检验提供了一些依据,如经进一步研究,本法有可能成为一种方便的临床检验手段。

参 考 文 献

- [1] 北京大学生物系生化教研室编:《生物化学实验指导》,人民教育出版社,北京,1982。
- [2] Kirschenbaum, D. M.: *Int. J. Prot. Res.*, 1971, **3**, 109.
- [3] Kirschenbaum, D. M.: *Anal. Biochem.*, 1975, **68**, 465.
- [4] 中国科学院上海药物研究所:《中华医学杂志》,1975, **55**(4), 274。
- [5] 中国科学院上海药物研究所:《中华医学杂志》,1978, **58**(10), 598。
- [6] 胡诞宁等:《中华医学杂志》,1976, **56**(8), 525。
- [7] 陈庆奎等:《眼科临床专题讲座》,陕西人民出版社,陕西,1980, 111—133。

[本文于 1987 年 6 月 26 日收到]

(上接第 290 页)

几个毗连的环组成,使得它与 CaM 作用时具有较大的空间位阻,很可能这是它对 CaM 拮抗作用不太强的原因。

参 考 文 献

- [1] 张遂坡、徐友涵:《生物化学与生物物理学报》,1988, **20**(1), 13。
- [2] Gariepy, J. et al.: *Biochemistry*, 1983 **22**, 1586。

[本文于 1988 年 4 月 11 日收到]