

微量蛋白质的快速测定

——Lowry 法的改进

薛政国 陈世铭

(军事医学科学院药理毒理研究所)

随着生化技术的发展,含量微少的蛋白质的提纯不断取得成功。但在所得的蛋白量极少时(如高度纯化的骨骼肌胆碱能受体),不易定量,这就要求测定技术微量化,以减少样品消耗,提高敏感性和能避免干扰。Lowry 的酚试剂法是用得最多的方法,精密度好,对多个样品同时测定较为方便^[1]。但试剂与操作步骤仍嫌复杂,而且费时,干扰物质较多,敏感性仍嫌不足,一般只能测定 10 μg 以上的蛋白质样品,对于不溶性蛋白或膜结合蛋白必先进行预处理,步骤繁杂。本方法吸收多种 Lowry 改良法的优点^[2],对试剂及操作作进一步改进,微量化,利用现代化仪器,使之操作简便、快速、减少干扰,提高敏感性,便于大批样品同时测定。

材料和方法

1. 牛血清白蛋白(BSA),电泳纯,北京生化

自身消化也可导致双向电泳重复性的改变(蛋白质点消失现象)。我们参照 Scheele 的方法,在凝胶混合液中加入胰蛋白酶抑制剂和尿素;在样品液中加尿素;在低温下进行电泳,以减少因胰酶激活而产生的自身消化现象^[4]。

4. 我们认为,简易法制备的浓度梯度胶具有操作简便,重复性容易控制,分辨率高和梯度线性好等优点,无论是在聚丙烯酰胺凝胶电泳中还是在双向电泳中都具有实用价值。

制品厂出品。十二烷基硫酸钠(SDS),化学纯,上海牙膏厂产品。硫酸铵,乙二胺四乙酸二钠(EDTA),化学纯,北京化工厂生产。蔗糖,化学纯,广州化学试剂厂出品。Folin-酚试剂根据文献^[3]配制。

2. 试剂甲

(1) 含 4% 碳酸钠及 0.2% 酒石酸钠($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)的 0.2N 氢氧化钠溶液,添加 1% SDS (在没有干扰物质或测定一般可溶性蛋白时可不加 SDS)。

(2) 4% 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)水溶液。将(1)和(2)按 100:1 的比例混合均匀,即为试剂甲,一天内使用。

试剂乙(Folin-酚试剂)浓度为 2N, 4℃ 冰箱保存,用前稀释 1 倍。

3. 仪器 微量多道扫描光密度计 Titertek

Multiskan 及 96 孔培养板原用于 ELISA。测定

参 考 文 献

- [1] Celis, J. E. et al.: *Two-dimensional gel electrophoresis of proteins methods and applications*, Academic press, Orlando Florida, pp 194—413, 1984.
- [2] Dagorn, J. C.: *J. physiol* (London), **280**, 435, 1978.
- [3] O'farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007, 1975.
- [4] Scheele, G. A. et al.: *Gastroenterol*, **80**, 461, 1981.
- [5] Scheele, G. A.: *Clin. Chem.*, **28**(4), 1056, 1982.
- [6] Scheele, G. A.: *Excerpta Medica*, (ICS) **642**, 89, 1984.
- [7] Tartakoff, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 7420, 1974.

[本文于 1986 年 1 月 22 日收到]

波长 492nm、690nm, 光程 0.6cm。

4. 操作步骤 取蛋白样品 100 μ l 于锥形塑料小离心管中, 加试剂甲 100 μ l, 混合后室温放置 10 分钟, 再加试剂乙 20 μ l, 立即混匀, 置 50 $^{\circ}$ C 水浴中孵温 10 分钟, 取 200 μ l 到 96 孔培养板比色, 每孔的光密度减去空白对照的平均值为该样品的光密度值。

Lowry 法, 按文献 [1] 介绍方法进行, 总体积为 1.3ml。为了便于比较, 有些试验我们特将各试剂体积按比例缩小, 使其反应总体积接近本改良法, 其中试剂甲 200 μ l、样品 20 μ l、试剂乙 20 μ l 采用室温或 50 $^{\circ}$ C 孵温, 反应结束后取 200 μ l 于 96 孔培养板中比色, 我们称之为“微量 Lowry 法”。

结 果

1. 敏感性。取 BSA 10—100 μ g 分别用 Lowry 法和本改良法做标准曲线, 结果证明, 本法的光密度有明显提高, 25 μ g BSA 原法和改良法分别为 0.1 及 0.4(OD₅₀₀), 100 μ g 分别为 0.3 及 1.2。如果用 M750 UVIS-1 型分光光度计, 10 μ g 及 50 μ g BSA, OD₇₅₀ 达 0.43 及 2.30。对含 10 μ g 以内蛋白样品, 结果也很满意。BSA 0.5—10.0 μ g, 测定结果作标准曲线 (图 1), 呈很好的线性关系 ($r = 0.998$)。不出现 Lowry 法因蛋白质浓度的提高, 标准曲线不直, 光密度相对减少现象, 能测 0.5 μ g 蛋白 (OD₆₉₀ = 0.037 $\pm$ 0.009)。提高了敏感性, 重复性良好。

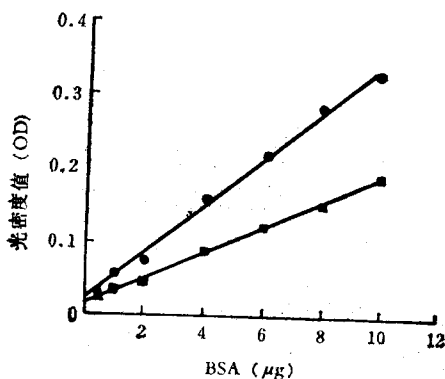


图 1 蛋白质标准曲线

●—● 690nm ■—■ 492nm

表 1 改良法与微量化劳里法测定 BSA 比较 (OD₆₉₀)

BSA	100 μ g	50 μ g
改良法	1.628 $\pm$ 0.153*	1.097 $\pm$ 0.063*
微量化劳里法(室温)	0.743 $\pm$ 0.033	0.550 $\pm$ 0.024
微量化劳里法(50 $^{\circ}$ C)	1.067 $\pm$ 0.196	0.821 $\pm$ 0.012

与微量化劳里法比较 * $p < 0.001$

取同一蛋白样品, 同时用本法和微量化 Lowry 法测, 即使后者也在 50 $^{\circ}$ C 孵温中反应, OD₆₉₀ 值仍明显低于前者 (表 1)。

2. 减少干扰物质的影响。Lowry 法测定蛋白质时干扰物质很多, 如还原物质、酚类、氨基酸类、糖类、某些金属离子等^[2]。在蛋白质分离提取过程中, 常见的干扰物质有 Triton X-100、硫酸铵 (>0.15%)^[1]、蔗糖 (浓度为 7% 时, 光密度约降低 12% 浓度为 8.5% 时降低 15% 甚至 40%^[2,4])、EDTA (0.5mM 就有影响^[2], 1.5 mM 时光密度相差达 45%^[2])。因此样品需预处理。本法在不增加操作步骤情况下, 可减少这些物质的影响, 0.15% 的硫酸铵和 5% 的蔗糖不产生明显干扰。10% 蔗糖、0.25% 的硫酸铵分别只有 14.5% 及 10% 的影响。4mM EDTA 对 10 μ g 蛋白有 7% 的光密度降低, 但对 75 μ g 的蛋白仍有 28% 的干扰 (表 2)。

表 2 一些干扰物质对改良法测定的影响 (OD₆₉₀)

BSA	10 μ g	%	75 μ g	%
—	0.394 $\pm$ 0.047	100	1.329 $\pm$ 0.089	100
蔗糖 10%	0.348 $\pm$ 0.063	88.3	1.100 $\pm$ 0.063	82.7
硫酸铵 0.25%	0.347 $\pm$ 0.066	88.0	1.213 $\pm$ 0.081	91.3
EDTA 4mM	0.365 $\pm$ 0.065	92.6	0.960 $\pm$ 0.051	72.2

表中数据为 $\bar{x} \pm SD$

表 3 Triton X-100 及 SDS 对显色的影响

BSA (μ g)	100	100	100	100	100	100
Triton (%)	—	0.5	0.5	1.0	1.0	2.0
SDS (%)	—	—	1.0	—	1.0	1.0
OD $\bar{x}$	1.219	0.907	1.175	1.007	1.239	1.050
S. D.	0.073	—	0.073	—	0.056	—

SDS 加在试剂甲中。

Triton X-100 存在时, Lowry 法测定产生黄色沉淀, 光密度降低。本法在 Triton X-100 含 0.5—1.0% 情况下, 无明显沉淀产生, 显色不

降低。Triton 浓度 2.0%，蛋白质 50 μ g 以上时，有黄色沉淀，光密度只下降 13.86% (表 3)。

3. 适合匀浆及膜结合蛋白的测定。匀浆及膜结合蛋白透明度差，夹杂物影响测定，样品也必须进行预先处理^[1]，加三氯醋酸离心得沉淀，再加 1N NaOH，甚至还需要 100℃ 加热溶解，然后盐酸中和。或者用 1.5% Triton X-100 使膜溶解后再用 Lowry 法测定。本法在甲液中增添 1% SDS 即可直接测定。用本法测定电鳗电器官匀浆，低速离心 (500 rpm) 上清及受体膜微囊样品蛋白质含量并与其他两种预处理方法比较，结果十分近似 (表 4)。

表 4 经不同方法处理后蛋白测定结果 (mg/ml)

预 处 理	1.5% Triton	10% TCA 1N NaOH 1N HCl	—
	本法	本法 (不加 SDS)	本 法
电器官匀浆	5.4	4.5	4.9
上清	2.0	2.0	2.0
膜微囊	4.2	3.7	3.9
牛脑突触后膜	1.0	—	0.98

同一样蛋白样品，本改良法测得膜蛋白含量明显高于微量法 Lowry 法。如电鳗电器官膜碎片样品，改良法对预处理前后样品同时测定，其值分别为 0.335 及 0.350mg/ml，两者无明显差别。而未处理样品用微量法 Lowry 法测值仅为 0.205mg/ml，明显低于前者。

讨 论

Triton X-100 对保护酶的活性，酶的稳定性及生物膜溶解等，都是十分重要的，因此被广泛应用。然而在 Lowry 法测定蛋白含量时却是干扰物质，产生黄色沉淀，使显色灵敏度降低。为减少 Triton 的干扰，不少人对 Lowry 法加以改进^[2,6]，但操作步骤增加，或灵敏度下降，或样品消耗量增加。如 Wang-Smith 法，在加酚试剂之前，加入 10% Triton X-100 防止沉淀产生，结果灵敏度降低一半。Dulley 等在 2% 碳酸钠—0.1N 氢氧化钠溶液中加入 0.5% SDS，但 Triton X-100 超过 1% 以上就产生沉淀，需

离心再测定^[7]。本方法在 Triton X-100 含 0.5—1.0% 情况下，无明显沉淀产生，显色不降低，Triton 浓度为 2% 时，蛋白质 50 μ g 以上才有黄色沉淀，但对光密度无显著影响 (表 3)。在 SDS 存在下，其他干扰物质如蔗糖、硫酸铵、EDTA 等产生的影响也减少。而且光密度增高，可以增加样品的稀释倍数，减少干扰物质的浓度，增加测定的准确性。

试剂及实验条件的选择。

(1) 硫酸铜的浓度。试用了 0.4% 和 4% CuSO₄，20 μ g BSA，OD₆₉₀ 分别为 0.416 $\pm$ 0.006 及 0.643 $\pm$ 0.081，100 μ g BSA 分别为 0.863 $\pm$ 0.037 及 1.628 $\pm$ 0.153。用 0.4% CuSO₄ 的 OD 值低 34—45%。可见 CuSO₄ 浓度太低，光密度值下降。将 Lowry 法中 0.5% CuSO₄ 提高到 4%，得到较满意的结果，最大吸收峰仍然是 750 nm。

(2) 酒石酸钠盐或钾盐对光密度的影响。由表 5 可以看出，酒石酸钠盐较好，而钾盐的几种浓度都使 OD 值下降。

表 5 不同浓度酒石酸盐对改良法测定 OD₆₉₂ 值的影响

BSA(μ g)	Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ (0.2%)	Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ (0.2%) K ₂ C ₄ H ₄ O ₆ (0.16%)	K ₂ C ₄ H ₄ O ₆		
			(0.08%)	(0.2%)	(0.4%)
1	0.012	0.015	0.006	0.013	0.005
10	0.085	0.085	0.037	0.034	0.043
75	0.549	0.559	0.189	0.250	0.234

表 6 温度对改良法测定 OD₆₉₂ 值的影响

BSA (μ g)	室温30分	50℃10分	50℃30分
10	0.118 $\pm$ 0.004	0.188 $\pm$ 0.016	0.178 $\pm$ 0.033
25	0.380 $\pm$ 0.002	0.420 $\pm$ 0.009	0.440 $\pm$ 0.004
50	0.629 $\pm$ 0.001	0.756 $\pm$ 0.064	0.722 $\pm$ 0.004
75	0.780 $\pm$ 0.003	1.043 $\pm$ 0.038	1.059 $\pm$ 0.049

(3) 温度的影响。本改良法在加试剂乙后室温中放置 30 分钟，可以比色，但光密度明显低于 50℃ 孵温，结果见表 6。50℃ 保温 10 分钟和 30 分钟 OD 值并无明显差别，所以采用 50℃ 孵温 10 分钟，可缩短操作时间。生成蓝色稳定，放置 48 小时，光密度值不变。此外，还观察到 50℃ 孵温可减少干扰物质的影响，提高光密度。

肺泡巨噬细胞内微量 ATP 的测定

王 家 双

(南京市鼓楼医院麻醉科)

肺泡巨噬细胞是肺脏正常防御功能的重要组成部分和第一道防线,是常居于呼吸道内主要的细胞群体。由于它们容易获得并且纯度高,所以多年来已被广泛用作研究正常机体内单核巨噬细胞系统功能的一个重要材料。

ATP 在正常机体的组织、细胞的各种生理活动过程中占有非常重要的地位。本文报道参考 Beutler 和 Stanley 的荧光素酶和 ATP 特异性结合而产生生物发光的方法^[1,2],以 Tris-硼酸缓冲液抽提加煮沸法进行肺泡巨噬细胞内微量 ATP 的测定。

材 料 和 方 法

一、试剂

1. 标准品 ATP 西德 Mannheim 公司产品,纯度 >95%;
2. 荧光素酶 上海植物生理研究所产品。

(4) pH 的影响。实验证明,同一样品, pH 8.75 时 OD_{492} 为 0.299 ± 0.004 , 而 pH10 时 OD 值增加到 0.45 ± 0.001 , 此时溶液光密度最大。pH 也使最大吸收峰改变,如 pH7.21 时,最大吸收峰在 786nm。

综上所述,本法的优点是:(1) 敏感性高。(2) 可直接用于测定匀浆及膜结合蛋白质,不需预处理。(3) 减少干扰。(4) 节约试剂。(5) 方便、简便、快速。一块比色板,可放 96 个样品,1—2 分钟测定完毕,并打出数据,整个过程只需 30—60 分钟。特别适用于大批样品的定量分析,可为蛋白定量的自动化提供有利条件。

本法尚不能消除干扰物质的干扰,特别是

二、缓冲液

1. 0.1M 硼酸缓冲液 (pH7.4, 含 40mM 硫酸镁);
2. 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.4, 含 4mM 硫酸镁);
3. 0.04M Tris-硼酸缓冲液 (pH9.2);
4. 0.17M Tris-氯化铵缓冲液 (pH7.2)。

三、ATP 标准液

取标准品 ATP ($ATP-Na_2$) 加去离子水配成 $10^{-3}M$ 浓度的 ATP 母液,置 $-5^{\circ}C$ 到 $-10^{\circ}C$ 保存备用。其他浓度的 ATP 标准液均在临测定前取母液稀释到所需浓度。

四、测定仪器 YSJ-1 型液体闪烁计数器 (上海标准计量局实验工厂产品)。

五、标本制备

取健康成年兔,经耳缘静脉注入 10—15 毫升空气处死,无菌操作下迅速打开胸腔,仔细游

EDTA 干扰还是很明显的。

参 考 文 献

- [1] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- [2] 管原洁、副岛正美(张旭译):《蛋白质的定量法》第二版 108—152 页,农业出版社,北京,1981.
- [3] 张龙翔等:《生化实验方法和技术》,165—167 页,人民教育出版社,北京,1981.
- [4] Schuel, H. et al.: *Anal. Biochem.*, 20: 86, 1967.
- [5] Ji TH: *Anal. Biochem.*, 52: 517, 1973.
- [6] Wang, C. et al.: *Anal. Biochem.*, 63: 414, 1975.
- [7] Dulley, J. R. et al.: *Anal. Biochem.*, 64: 136, 1975.

[本文于 1986 年 1 月 31 日收到]