

一种快速微量蛋白测定法

康 建 初 俊 杰

(沈阳军区总医院)

提 要

以往报道 Lowry 法的呈色反应通常须 30min。本文介绍一种利用人工还原剂促使该反应迅速完成的改良法。笔者对这一方法进行了实验评价,初步探讨了二硫苏糖醇还原 Folin 试剂所形成的吸收光谱以及选用 650nm 波长的机理。实验结果证明本法与对照法相关良好。

用于微量蛋白质测定的 Lowry 反应是双缩脲方法的发展。自 1951 年 Lowry^[1] 建立该法以来,先后已有不少作者对这一方法进行了报道并沿用至今。1986 年 Larson^[2] 利用还原剂二硫苏糖醇 (DTT) 缩短了 Lowry 法的分析周期且提高了色泽强度,颇具特点。我们移用这一优点,重新组合了试剂配制,对样品、试剂用量以及波长选择作了某些修改。实验评价了该法的特性。结果尚为满意,现报道如下:

材 料 与 方 法

一、仪器 PYE Unicam SP8-100 型紫外可见光分光光度计。波长精度与光度计精度,均参照英国国家物理实验室标准滤光片校正。

二、试剂

1. DTT, Serva 产品;牛血清白蛋白(BSA),电泳纯,上海长阳制药厂产品;氢氧化钠,硫酸铜及碳酸钠,分析纯,沈阳化工厂产品;Folin 试剂按文献[3]配制。

2. Lowry 试剂: (1)称取无水碳酸钠 2.00 克,酒石酸钾钠 0.20 克溶于 0.1mol/L 氢氧化钠 100ml 中。(2)称取硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.50 克溶于蒸馏水 100ml 中。用前将(1)和(2)液按 50:1 的比例混合,即为 Lowry 试剂,当日内使用。

3. Folin 试剂: 用前稀释一倍。

三、操作方法 取 5—100 μg 蛋白样品 1.0ml 于试管内,加入 Lowry 试剂 2.0ml,混匀,再加 Folin 试剂 0.2ml,立即振荡均匀,3min 后加入 20mmol/L DTT 溶液 0.2ml,混匀,以试剂空白调零,于波长 650nm 处,用 10mm 光径比色皿比色测定,记录吸光度(A)值,根据标准曲线之相应 A 值查得蛋白质含量。

实 验 结 果

1. 吸收光谱特征 用稀释的血浆或 BSA 标准液经本法和对照法(未加 DTT)显色后,在 Unicam SP8-100 型分光光度计上作吸收光谱特征曲线。本法在波长 650—655nm 之间有一平坦吸收峰,对照法之最大吸收谱带在波长 $750 \pm 10\text{nm}$ 。用 DTT 直接还原 Folin 试剂(图 1b),或将 Folin 试剂预先经 Lowry 试剂破坏,再加入蛋白质样品和 DTT (图 1d),二者吸收峰皆在 650nm,但试剂空白之吸收峰在 750nm,如图 1。

2. 标准曲线 用 25mmol/L 磷酸钠盐缓冲液 (pH7.4) 配制 100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ BSA 标准液。根据 BSA 消光系数, $\epsilon_{280\text{nm}}^{0.1\%} = 0.667$, 校正标准液浓度。然后将其稀释成 10—100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 等九种不同浓度。再以本法分别测定各浓度的吸光度。以吸光度 (A) 为纵坐标,经本法测得的 BSA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{dl}$) 为横坐标,绘制曲线。结

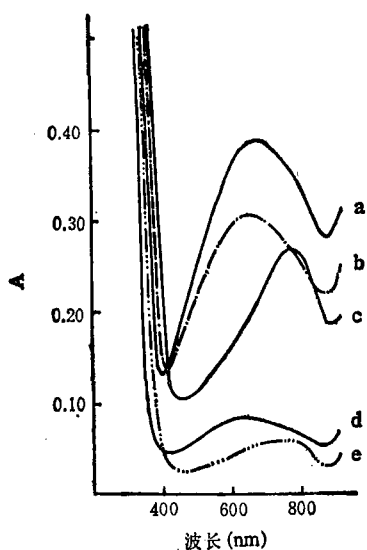


图1 对同一血浆样品用本法(蛋白浓度 32 $\mu\text{g}/\text{dl}$)和对照法(蛋白浓度 42 $\mu\text{g}/\text{dl}$)显色后之吸收光谱比较

实线: 含测试样品; 虚线: 无测试样品
a. 本法吸收光谱; b. DTT 还原游离 Folin 试剂吸收光谱; c. 对照法吸收光谱; d. Folin 试剂经部分降解后的本法吸收光谱; e. 试剂空白吸收光谱。

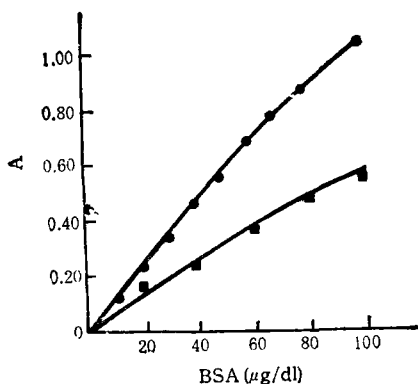


图2 BSA 标准曲线比较

● 本法 (+DTT); 测定波长 650nm.
■ 对照法 (-DTT); 测定波长 740nm.

果 BSA 在 10—100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 范围内呈线性关系, 符合比耳 (Beer) 定律, 但其中以 10—60 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 为最佳线性组段, 超出此组段曲线略偏离直线, 参见图 2。

3. 不同浓度 DTT 的显色效果 当蛋白浓度为 24.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 的同一血浆样品选用不同浓度 DTT 测定时, 显色强度随 DTT 浓度不同而改变。当 DTT 浓度为 2mmol/L 时, A 值结果为

0.129, 5mmol/L 时为 0.237, 20mmol/L 时为 0.309, 如图 3。

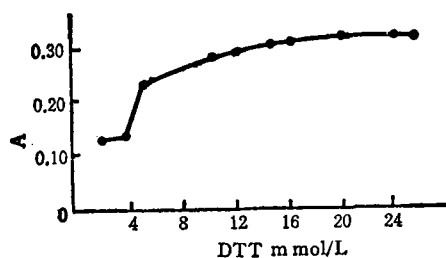


图3 不同浓度 DTT 与显色强度关系曲线

4. 显色反应的稳定性 按本法作两样品 4 次测定, 显色后在不同时间内观察色泽稳定性。显色样品在 30min 内 A 值变化不明显, 但放置 1 小时后 A 值显著减少。结果如表 1 所示。不同浓度 DTT 对显色稳定性的影响亦较明显, 二者呈正相关。

表1 不同时间内显色样品的稳定性

显色时间	样品 ₁ A	A 值减少 (%)	样品 ₂ A	A 值减少 (%)
10min	0.267 \pm 0.019	—	0.440 \pm 0.026	—
30min	0.258 \pm 0.017	3.4	0.427 \pm 0.024	2.9
60min	0.202 \pm 0.024	24.3	0.394 \pm 0.055	10.4
120min	0.181 \pm 0.011	32.2	0.290 \pm 0.026	34.1

注: 每一样品批内测定 9 次; $A = \bar{x} \pm 1.96SD$

5. 重复性及准确性 用本法对蛋白浓度为 35 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 的同一血浆样品于日内作批内 10 次重复测定, 其吸光度 \bar{x} 为 0.414, SD 为 0.0147, CV 为 3.55%。此外, 亦对 BSA 进行不同倍数稀释, 分别用本法和对照法测定, 其相关系数 (r) 为 0.997。30 份稀释的血浆及脑脊液样品经平行对照试验, 本法 $\bar{x} = 47.43 \pm 29.72 \mu\text{g}/\text{dl}$; 对照法 $\bar{x} = 47.36 \pm 32.14 \mu\text{g}/\text{dl}$ 。两法经显著性检验 $t = 0.145$, $P > 0.05$, 相差不显著, $r = 0.990 (\hat{Y} = 4.061 + 0.916x)$, 两法对比有良好的—致性及非常显著的线性相关关系, 见图 4。

在一蛋白浓度为 12.8 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 的血浆样品中分别加入 BSA 23.2, 46.4 及 69.6 μg , 其回收率为 99.4%, 91.5% 及 86.5%。结果显示蛋白含量低的样品伴有较高的回收率, 而含量高的样

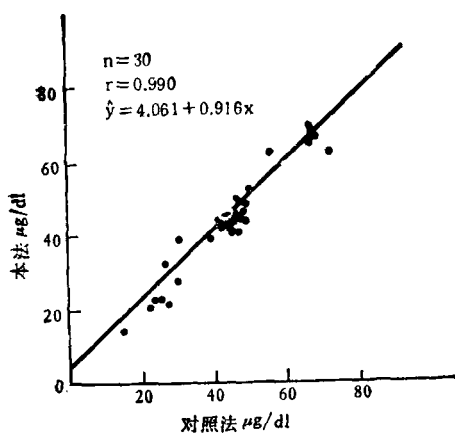


图4 两种方法比较呈现高度相关性

品,其回收率较低。

讨 论

以往对 Lowry 反应原理解释是首先形成铜-蛋白质复合物,随后该复合物还原 Folin 试剂,再通过分子重排形成最终的钼蓝-钨蓝复合物^[1]。

本实验证实了 DTT 的还原作用并观察到这种作用与铜-蛋白质复合物的含量有关。由于 Folin 试剂在碱性条件下极不稳定^[4,5],以致形成的蛋白质-钼-钨-Folin 试剂四元复合物未能充分还原,故反应完全所需时间较长,通常为 30min。当反应体系中加入 DTT 时,可促使反应迅速完成并增加色泽强度。然而, Larson^[2]提出反应步骤中的分子重排可能是一充分还原过程的假说。在我们的实验中,吸收光谱特征曲线揭示,用 DTT 还原 Folin 试剂所形成的最大吸收峰由原法^[1]的 750nm 移至 650nm。若将 Folin 试剂预先经 Lowry 试剂部分破坏降解后,再加入蛋白质和 DTT,其最大吸收波长仍为 650nm。因而,我们认为四元复合物的形成可能对结合的 Folin 试剂起着一种暂时的缓冲保护作用,以不被 Lowry 试剂所降解。当 DTT 加入后,便还原结合的氧化剂,后者含量与蛋白质含量呈正比。故推测 DTT 的主要作用是促使四元复合物中结合的 Folin 试剂进一步充分还原,并以其自身的还原特性而显示出

与对照法不同的吸收光谱。

基于光谱分析中的波长选择通常以吸收强度最大处的波长作为物质定性及定量的依据,为此本法选用 650nm。

在色泽稳定性比较中,样品在 30min 内呈色基本稳定, A 值减少不超过 3.5%。不同浓度的 DTT 对显色效果的影响比较显著。在浓度为 15—25mmol/L 时,所得结果无明显差异,色泽强度趋于饱和。然而,DTT 浓度对呈色稳定性的影响却较明显。当选用 13mmol/L DTT 时,吸光度在显色 30min 内减少 9.8%,色泽稳定性随 DTT 浓度增加而愈加稳定。因此,鉴于本实验结果推荐采用 20mmol/L。

我们曾以两种方法对 30 份适当稀释的血浆和脑脊液样品进行平行对照试验。用高、中、低三种浓度的 BSA 对同一样品进行回收试验,以评价方法准确性。实验结果表明本法与对照法相关良好,显著性检验无明显差异,平均回收率为 92.5%。

虽然已有许多文献报道巯基化合物干扰 Lowry 反应^[6,7],但在 DTT 的详细作用机理尚未完全明确之前,利用该还原剂使 Lowry 法得以改良仍是一种有益尝试。

小 结

本文采用 DTT 改良 Lowry 法比色测定蛋白质是许多实验室常用的一种微量,快速的方法。不需复杂设备,试剂价廉易得。适用于自动化或手工操作。操作中有两点关键应引为注意。一、因灵敏度高,故加液量必须十分准确,操作手法应统一标准化,以免造成人为误差。二、Folin 试剂加入后;要立即混匀,待 3min 后加入 DTT,否则 DTT 直接还原游离的 Folin 试剂,产生异常高色泽。

参 考 文 献

- [1] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.
- [2] Larson, E. et al.: *Anal. Biochem.*, 1986, **155**, 243.
- [3] 张龙翔等:《生化实验方法和技术》,人民教育出版社,

pH-比色法测定 CaATPase 活力

陈 兰 英

(中国医学科学院心血管病研究所, 北京)

提 要

基于 ATP 被酶水解后 H⁺ 生成的速度作为酶活力的指标, 在 560nm 波长和 pH 7.4, 以酚红作指示剂, 建立了 pH-比色测定肌浆网 CaATPase (Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase) 活力的分光光度法。方法简易, 可观察反应进行的过程。SR CaATPase 对底物 ATP 的 K_m = 97.4 μmol/L; 在 22—42℃ 间求得活化能 (E_{Ca}) = 20.40 千卡。用本法初步观察了汉防己甲素(简称汉甲)对酶的抑制作用。

肌浆网 (sarcoplasmic reticulum, 简称 SR) 钙泵蛋白作为钙运转载体, 主要参与主动运送 Ca²⁺ 到 SR 内。Ca²⁺ 在 SR 的跨膜转运, 不仅在生理情况下涉及细胞内、外间的钙平衡和肌肉收缩与松弛等重要功能, 且在病理情况下还与细胞死亡和心血管疾病有关。

为研究 SR 的结构与功能的关系, 需要建立一个简便可靠和易于直接观察反应进行的方法。ATPase 催化底物 ATP 水解产生等克当量的 H⁺, 最适 pH 6.5—7.5, 在此范围内测定 H⁺ 生成的速度可作为酶活力的指标。本文在 560nm 波长, 以酚红作指示剂建立了 pH-比色测定 SR CaATPase 活力 (pH7.4) 的分光光度法。

材 料 和 方 法

试剂 牛血清蛋白 (BSA)、组氨酸 (L-histidine) 和乙二醇双乙胺醚-N, N' 四乙酸 (EGTA) 为 Sigma 产品。ATP-Na₂ 和酚红分别为 Mannheim 和 E. Merck 产品。CaCl₂ 和

蔗糖分别为 MC/B (USA) 和 Schwarz/Mann Inc. 产品。汉防己甲素系浙江金华制药厂生产。其余为国产保证或分析试剂。

SR 制备 参考 Katz 等人^[1]方法, 从兔骨骼肌中提取, 悬浮于 10% 的蔗糖溶液内。

蛋白质测定 按 Lowry^[2] 法, 以 BSA 为标准。

SR Ca ATPase 活力测定 总 ATPase (Total ATPase) 活力: 2 毫升反应液中内含 40mmol/L 组氨酸, 120mmol/L KCl, 12 μmol/L CaCl₂, 5mmol/L MgATP, 0.003% 酚红, pH 7.4。基础 ATPase (Basal ATPase) 活力: 上述反应液中省去 CaCl₂, 加入 1mmol/L EGTA。总 ATPase 活力减去基础 ATPase 者即为 Ca ATPase (即 Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 或 Ca²⁺-dependent ATPase) 活力。采用日立 200 型 (带恒温装置) 的双光束分光光度计, 在对照和样品杯中各加 2 毫升反应液, 25℃ 平衡 10 分钟后, 置 560nm 波长处调节吸光度为 0, 加入 10 μl SR 蛋白到样品杯中以起反应, 用记录仪描记 3

北京, 1981 年, 165—167 页。

[4] Holme, D. J. et al.: *Analytical Biochemistry*, Longman Inc., New York, 1983, p. 394.

[5] Ohnishi, S. T. et al.: *Anal. Biochem.*, 1978, **86**, 193.

[6] 薛国政等: 《生物化学与生物物理进展》, 1986 年, 5,

60。

[7] Alexander, R. R. et al.: *Basic Biochemical Methods*, Wiley J. & Sons, Inc, 1985, p. 14.

[本文于 1987 年 5 月 28 日收到]