

# 用邻苯三酚红钼络合显色法测定临床样品蛋白质含量

汪洪亮 吴从山

(江苏省赣榆县人民医院)

长期以来,实验室对蛋白质含量甚微的尿液、脑脊液蛋白质定量分析缺乏满意的方法。一些文献报道的微量蛋白定量法<sup>[1-3]</sup>,均有较严重的缺点。Bradford<sup>[4]</sup>、Pierce<sup>[5]</sup>等先后报道用考马斯亮兰 G-250 染料结合法测定微量蛋白质有不少优点,但测定蛋白质浓度的线性范围不宽,蛋白质浓度低时线性较差,比色皿及实验中所用器材吸附色素干扰测定,不能用于自动化分析仪器。最近金子良孝等<sup>[6]</sup>报道用邻苯三酚红钼染料络合法测定脑脊液微量蛋白,本法具有线性范围宽、结果准确、操作简便、显色稳定等优点,克服了以往测定蛋白质方法的不足。我们用于测定尿液、脑脊液、羊水及凝胶层析液中微量蛋白质,结果甚为满意,现将操作方法和实验结果报道如下。

## 材料和方法

**1. 染料** 邻苯三酚红(Pyrogallol red, PR)是一种酸性染料,微溶于水,强酸性溶液中为橙黄色,近中性溶液为酒红色,碱性溶液为紫色。分子结构式见图1。

**2. 原理** 邻苯三酚红和钼酸络合形成红色复合物,吸收峰在475nm。该复合物在酸性条件下与蛋白质形成络合物,使吸收峰移至604nm(见图1)。在604nm处吸光度与蛋白质含量成线性关系。

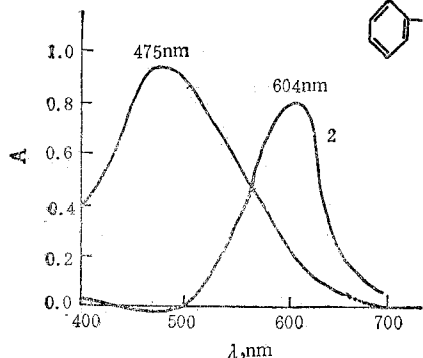
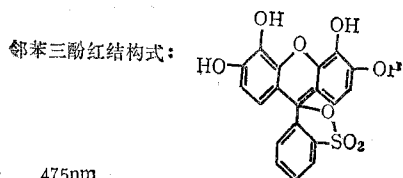


图1 邻苯三酚红钼-蛋白络合物吸收光谱  
曲线1: 试剂空白 曲线2: 测定液

## 3. 溶液的配制

(1) 显色试剂 称取邻苯三酚红(A, R) 27mg、钼酸铵  $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O, A, R]$  30mg, 用0.1 mol/L pH3.0的甘氨酸-盐酸缓冲液溶解并稀释至1L, 置棕色瓶中, 25℃以下保存。邻苯三酚红的浓度为  $6.45 \times 10^{-5}$  mol/L, 钼酸铵的浓度为  $2.43 \times 10^{-3}$  mol/L。

(2) 蛋白标准液(1.000g/L) 以上海医学化验所供给的总蛋白标准液(50g/L), 用生理盐水作50倍稀释即可。

(3) 样品溶液 尿液、脑脊液、羊水以及凝胶层析液等均可用本法作微量蛋白定量。当其蛋白浓度超过2g/L时, 样品需经稀释。尿蛋白在++以下不必稀释, 卅稀释2~3倍, 卅卅稀释5倍。脑脊液也可按潘氏试验的阳性程度, 作2~5倍的稀释。

**4. 操作** 用微量吸管吸取样品(蒸馏水、标准液1.000g/L、待测液) 0.10ml, 各加显色试剂5.0ml, 混合, 室温下放置20分钟, 1小时内用721型分光光度计, 波长604nm, 以试剂空白作参比, 读取各管吸光度A。

## 结果和讨论

**1. 工作曲线及样品稀释试验** 用分别相当于蛋白含量为0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00g/L的标准液, 用本法进行测定, 结果蛋白含量在0~2g/L范围内符合比尔定律, 由

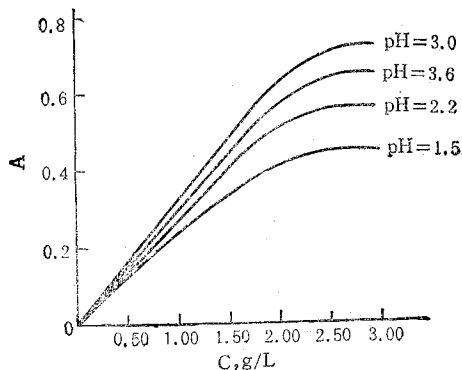


图2 不同pH显色反应的工作曲线

线性回归法求得方法的灵敏度为  $3.226 \times 10^{-3} \text{g/L}$  (见图2)。我们用1份病理脑脊液样品作2、3、4、5倍稀释,测得其蛋白含量再乘以稀释倍数,结果分别为3.580、3.585、3.595、3.590和3.600g/L。可见蛋白含量超出线性范围时,经稀释后测定,其结果不影响线性。

**2. 酸度对显色反应的影响** 不同pH显色反应均有良好的线性关系,但反应的灵敏度不同(见图2)。实验结果表明pH3.0反应的灵敏度最高,且显色稳定性较好。

**3. 试剂浓度的选择** 邻苯三酚红的浓度太低时显色太浅,灵敏度不够,线性范围下降;浓度太高,则空白干扰大。实验结果选择邻苯三酚红的浓度为  $6.45 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ , 钼酸铵浓度为  $2.43 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ , 反应的灵敏度高,且线性最好。

**4. 显色稳定性** 实验结果显色反应在10分钟时即完成,并且显色反应在20~120分钟内吸光度值稳定不变。

**5. 重复性** 1例脑脊液样品,连续测定40次,测得  $\bar{x} = 0.5361 \text{g/L}$ ,  $SD = 0.0153 \text{g/L}$ ,  $CV = 1.94\%$ , 故重复性良好。

**6. 回收试验** 将5例脑脊液样品,5例尿液样品,各加入蛋白标准液,按本法测定,不同蛋白含量的脑脊液、尿液样品的回收率接近,平均回收率为98.6%。

**7. 不同蛋白质的影响** 用本法测定人白蛋白和总蛋白,在本法的线性范围内都有良好的线性。对相同浓度的白蛋白、总蛋白标准液进行测定,所得结果无显著性差异 ( $t = 0.2806$ ,  $P > 0.5$ ), 故病理样品测定时,仍有良好的线性。

**8. 与考马斯亮兰 G-250 法的相关性** 取50份脑脊液和50份尿液样品,分别用考马斯亮兰 G-250

法和本法进行测定,结果得相关系数  $r = 0.99$ , 回归方程  $Y = 1.002X - 0.03$ ,  $Y$  表示本法,  $X$  表示考马斯亮兰 G-250 法。 $r$  值与1非常接近,说明两种方法测定结果基本一致。

### 9. 干扰因素

(1) 无色样品或颜色浅的尿液加显色试剂稀释50倍后干扰甚小,可以忽略。但是含有胆红素或其它有色物质较多的尿液对本反应有干扰。可用磺柳酸粉末20mg溶于1ml尿液中沉淀尿液蛋白质,取此尿液上清作空白管,其读数从尿液测定管读数中减去,即可克服这一困难。

(2) 一般定量显色试验常加入表面活性剂以增加显色稳定性,但本实验中表面活性剂的干扰颇大。实验表明当加入十二烷基硫酸钠(阴离子表面活性剂)会阻止显色反应。加入溴化十六烷基三甲铵(阳离子表面活性剂),具有与蛋白质类似的显色反应。加入TritonX-100、乳化剂OP、Tween80(非离子表面活性剂);十二烷基二聚氧乙烯基氨基甲酸(两性表面活性剂)也有轻度显色反应。所以反应中应避免表面活性剂的污染。

(3) 测试表明:葡萄糖、尿素、糖原、淀粉、胆固醇等对反应均无干扰。

### 参 考 文 献

- [1] 北京医学院第一附属医院检验科:《中华医学检验杂志》,1980,3,22。
- [2] Meola, J.M. et al.: *Clin. Chem.*, 1977, 25, 975.
- [3] Doetsch, K. et al.: *Clin. Chem.*, 1977, 25, 1186.
- [4] Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248.
- [5] Pierce, J. et al.: *Anal. Biochem.*, 1977, 81, 478.
- [6] 金子良孝,他:临床检查机器,试薬,1986,9,235。

[本文于1987年12月10日收到]

### 书刊简介

## 《分光光度技术及其在生物化学中的应用》简介

由郭尧君编著科学出版社于1987年9月出版的“分光光度技术及其在生物化学中的应用(紫外-可见-近红外)”一书,是一本供生物学、化学、医学、农林、食品、环保、冶金、地质等科技工作者和大专院校有关专业师生参考的技术工具书。全书共分五章。第一章分光光度技术的基本概念,包括吸收光谱的产生及定性、定量分析的依据。第二、三章仪器的结构、种类、维护、进展、性能测试,并附国内、外的仪器性能比较表。第四章差光谱、双波长、导数光谱等十二种分光光度测定方法。第五章分光光度法在一些重要生命物质测定中的应用。

本书是作者参考国内外资料,并结合自己20多年的工作经验编写成的。全书20.5万字。定价2.15元。如欲购买者请与本刊编辑部联系。外地请另寄邮费及包装费0.30元。