

蛋白质定量方法的进展

胡卓逸 孙承琦

(中国药科大学,南京)

提 要

本文在简要比较常用蛋白质定量方法的基础上,结合自己的工作,选择性地叙述了 Lowry 法、考马斯亮蓝 G-250 染料测定蛋白质的改进法。还介绍了银染色定量法和 4-甲酸喹啉测定蛋白质含量的新方法。

关键词 蛋白质定量,考马斯亮蓝 G-250,4-甲酸喹啉

蛋白质定量是生物化学和其他生物学科、食品检验等最常涉及的分析内容,也是临床检验中诊断疾病及检查疾病治疗后康复情况的重要指标,又是许多生化药物分离提纯和质量检验中最常用的手段。从事生化药物,特别是蛋白质、酶、某些多肽或蛋白质激素的分离纯化时,蛋白质的定量测定更是必不可少的。

测定蛋白质含量的方法很多,不同的方法

宏观的量级,使系统达到一个新的、时-空行为可能更加复杂的状态。这正好符合达尔文的“适者生存”的生物进化学说。

最后值得指出,力求解释生物有序现象本身就是导致建立化学耗散结构理论的主要原动力。事实上 Belousov 正是在研究生命系统的三羧酸循环时发现了化学振荡现象,而他的发现得以为广大化学工作者了解和重视在很大程度上应归功于生物工作者的热情。生命科学和非生命科学的统一,看来是科学发展的必然趋势,在这统一过程中,生命科学工作者和化学工作者的结合将是大有可为的。

参 考 文 献

- 1 Eigen M. *Ber Bunsenges Phys Chem*, 1985; 89: 658
- 2 Kai S, Muller S C, Ross J. *J Chem Phys*, 1982; 76: 1392

各有其使用特点。现将某些常用方法的优缺点列于表 1。

在引用蛋白质定量的文献中,Lowry法^[1]是引用得最多的一种方法,它结合了双缩脲法中铜盐反应与 Folin-ciocalteau 试剂反应的特点,通过芳香族氨基酸残基 Tyr 和 Try 的迅速反应及与肽链或极性侧链或两者的铜络合物较慢的反应,而把磷钼酸、磷钨酸发色团还原成暗蓝

- 3 Velarde M G, Normand C. *Sci Amer*, 1980; 243: 93
- 4 Field R J. In: Field R J eds. *et al. Oscillations and traveling wave in chemical systems*, New York: Wiley, 1985; 55—92
- 5 李如生. 非平衡态热力学和耗散结构. 北京:清华大学出版社,1986:44—49
- 6 Nicolis G, Prigogine I. *Self-organization in nonequilibrium systems*, New York: Wiley, 1977: 55—60
- 7 李如生. 化学通报,1986;(10):23
- 8 李如生. 化学通报,1988;(5):7
- 9 Hao Bailin. *Chaos, World Scientific*, Singapore, 1986: 1—74
- 10 Babloyantz A. *Molecules, dynamics and life*, Wiley, Interscience, Chichester, 1986: 5—15
- 11 Markus M, Muller S C, Nicolis G. *From chemical to biological organization*, New York: Springer, 1988: 1—250
- 12 Segel L A. *Modeling dynamic phenomena in molecular and cellular biology*, Cambridge: Cambridge Uni Press, 1984: 97—122
- 13 Garay R, Lefever R. *J Theor Biol*, 1978; 73: 417.

[本文于1988年9月1日收到]

表 1 几种常用蛋白质定量方法优缺点比较

方 法	所需蛋白质的量,mg	破坏与否	蛋白质/蛋白质变化情况	技术复杂性,速度等
双缩脲法	0.5—5	是	少	腐蚀性试剂, NH_4^+ 干扰,快
Lowry 法	0.05—0.5	是	中等	显色慢,许多试剂干扰
凯氏定氮法	0.05—3	是	少	慢,复杂
$A_{280\text{nm}}$ 吸收	0.05—2	否	大	有紫外吸收的试剂干扰
$A_{205\text{nm}}$ 吸收	0.01—0.05	否	少	同上
染料结合法	0.01—0.05	是	中等	显色快、简单,颜色吸附于玻璃容器上

色,在 750nm 处读 A_{max} 。尽管多种试剂对此法有干扰, Gary L. Peterson 列出了近 200 种化

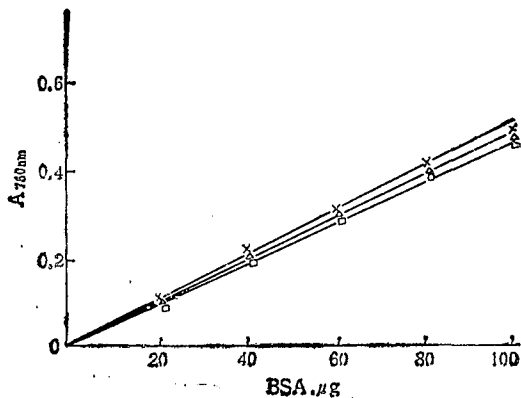


图 1 不同时间配制的碘乙酸钠试剂对测定的影响

×—× 和 □—□ 新配制的碘乙酸钠溶液,最终浓度分别为 252 和 400 mmol/L

△—△ -20°C 贮存的碘乙酸钠液,最终浓度 252mmol/L

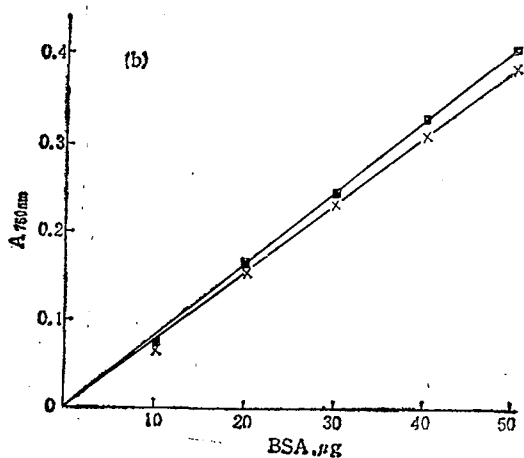
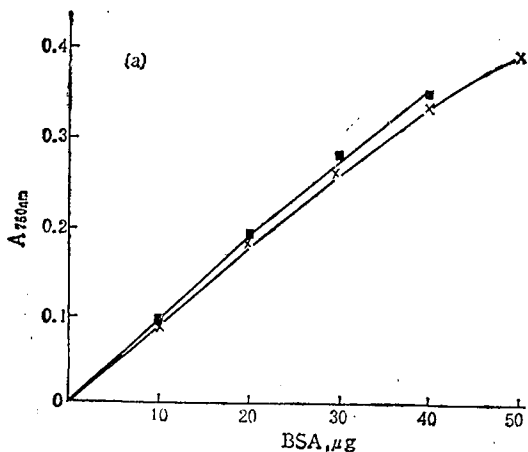


图 2 使用两种共沉淀剂后测定的标准曲线

(a) DOC 共沉淀法; (b) RNA 共沉淀法

×—× 和 □—□ 分别为显色 30min 和 60min 后的读数

合物影响 Lowry 法测定的浓度限量^[2],但三十多年来有许多改进,如加入碘乙酸盐、脱氧胆酸盐^[3]或 N-乙酰马来酰亚胺^[4]等试剂来消除二巯苏糖醇 (DTT)、2-巯基乙醇和半胱氨酸等含-SH 化合物的干扰。我们曾困于测定含有高浓度 2-巯基乙醇的 Tris-HCl 缓冲液中的稀蛋白质含量,后参阅 Elliott Ross 等以碘乙酸盐消除巯基试剂干扰的方法,得到重现性很好的结果。文献中强调碘乙酸盐需在临用前新鲜配制,我们以牛血清白蛋白为标准,比较了新配制的和配制后贮于 -20°C 冰箱 33 天的碘乙酸盐

对测值的影响,结果表明后者对测定并无影响(图 1)。

用可溶性核糖核酸^[5]或脱氧胆酸钠(DOC)作共沉淀的办法浓缩蛋白质样品溶液,离心除去上清液后,用 Lowry 法测定沉淀蛋白质的量收到良好的效果。我们以牛血清白蛋白为标准,比较了两种共沉淀剂的效果:用可溶性 RNA 时测定的线性关系优于用 DOC,但灵敏度略逊于 DOC 法;比较显色时间的影响,显色 1h 后的测值比显色 30 min 的测值增高 7—8%,测值随显色时间延长而增高,但线性关系仍然良好

(图 2)。

因为 Lowry 法很灵敏, 0.1mg/ml 或低于此浓度的样品仍可得到很好的显色反应, 这样的蛋白质浓度常常已把干扰物质的浓度稀释到一个不重要影响的水平。

以往所做对 Lowry 法的改进, 都包括了加 Folin 试剂后放置 30min 的条件。Larson 等提出了加入还原剂二硫苏糖醇 (DTT) 于 Lowry 反应体系中以促使呈色反应迅速完成的改良法, 缩短了分析周期, 提高了色泽强度^[6]。康氏^[7]等实验评价了 Larson 等的改进法, 提出了 DTT 作用的机理和选用 λ_{\max} 650 nm 的依据, 推测 DTT 的主要作用是促使蛋白质-钼-钨-Folin 试剂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原法 (λ_{\max} 750 nm) 不同的吸收值 (λ_{\max} 650 nm)^[7]。

在脂类共存的样品溶液中测定蛋白质的含量比较困难, 因为脂类的存在使溶液变混浊。Robert E. Beyer^[8]采用快速双缩脲分析于整个脂肪组织中蛋白质的测定, 对常规双缩脲法作了改进, 引入了组织样品的脂抽提和借助于脱氧胆酸钠等去垢剂和超声波处理, 使蛋白质增溶, 100℃ 水浴 30 sec 热处理, 快速显色后冰浴速冷, 以含等量脱氧胆酸钠和双缩脲试剂的空白管作对照, 读 $A_{540\text{nm}}$ 。Ronald 发展了氨基黑 10B 定量蛋白质的方法^[10]。在含有高水平脂质和非离子型去污剂情况下, 低含量蛋白质的样品溶液 (其中脂/蛋白质达到 10,000/1 (W/W)) 中的蛋白质可用氨基黑 10B 定量, 高浓度的各种缓冲液、盐和非离子型去污剂不干扰本测定。该法也可用于重组系统 (如脂质体) 中蛋白质的测定。值得注意的是, 染料结合法的应用越来越广泛。对临床检验脊髓液等微量体液中的痕量蛋白质更为合适^[10]。此法 1976 年由 Bradford 所建立^[12]。考马斯亮蓝 (CBB)G-250 在酸性溶液中呈红棕色, 与蛋白质结合后变为蓝色, A_{\max} 从 465nm 移至 595nm。在一定条件下, 蛋白质浓度与 $A_{595\text{nm}}$ 成正比, 据此作蛋白质定量。有试剂公司曾宣传有用此法代替包

括 Lowry 法在内的其他方法的趋势, 其理由是: 1. CBB G-250 法灵敏、快速, 使用更简易, 只需一个试剂, 五分钟反应完全。Lowry 法则需三个试剂 (其中一个试剂要临用前新鲜配制) 30—40 min 反应完全; 2. 染料-蛋白质复合物较稳定。而 Lowry 法为得到精确的结果, 加入试剂及测定样品液的混匀均需较严格的定时; 3. 试剂的干扰少。用双缩脲法、Lowry 法和 CBB G-250 法对 20 多种蛋白质样品的测定结果作比较表明: 不同的蛋白质样品用这三种方法测定时, 均各有差异, 但每种方法对许多样品测值的平均值仍较接近。可见, 为了消除蛋白质/蛋白质间测值的差异, 最好用与测定样品同种蛋白质作为标准品, 这样可以消除不同种蛋白质之间测值的差异性。

五年前, 国外已有商品 CBB G-250 试剂盒供应, 提供染料试剂和标准蛋白质, 使方法规格化, 使用方便, 近几年国内也有配好的 CBB G-250 染料试剂市售, 但价格比之自制要贵得多。笔者按 Bradford 法配制的试剂, 使用时有时会在比色过程中出现沉淀。于是用正交设计考察了染料浓度、磷酸浓度、乙醇浓度、蛋白质种类和显色反应时间等 5 个因素, 作 5 种水平的试验, 结合直观分析, 根据实验结果选出最佳条件为: CBB G-250 浓度为 0.012%, 磷酸和乙醇的浓度分别为 1.03 和 0.74 mol/L, 反应 5 min 后读 $A_{595\text{nm}}$ 。按改进法、经典法配制的染料试剂与市售试剂相比较, 表明前者对 5 种蛋白质测值差距减小, 比较新配和贮存 30 天后的试剂, 前者在显色的灵敏度和稳定性方面均优于后两者^[12]。

近三年来又发展了一些新的微量蛋白质定量法。比如, 基于蛋白质和银相结合的能力来定量测定蛋白质。样品先用甘油醛处理, 再与银溶液作用, 10min 后, 加硫代硫酸钠终止反应, 读 $A_{420\text{nm}}$ 。对大多数蛋白质在测定范围 15—2000 ng 时, $A_{420\text{nm}}$ 与蛋白质质量成正比, 比 CBB G-250 法灵敏 100 倍, 蛋白质-银复合物形成快, 显色稳定^[13]。

蛋白质与胶体金亲和, 已建立了微量测定

法,在可见光范围读 A_{595nm} ,可以测定 20ng 水平的蛋白质量^[15]。

4-甲酸喹啉 (BCA) 的钠盐是稳定的水溶性化合物,它在碱性环境中能与一价铜离子生成紫色复合物,利用此性质来定量蛋白质^[16]。碱性条件下,蛋白质与两价铜离子反应(双缩脲反应)中生成的 Cu^+ ,可用 BCA 试剂检测,读取 A_{562nm} ,以测定蛋白质的量。反应式如下:

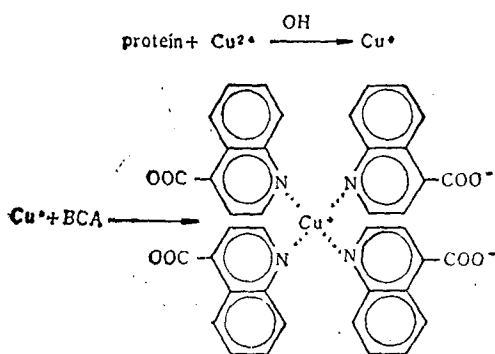


图3 BCA 与双缩脲反应中生成的 Cu^+ 作用形成紫色络合物

在广泛 pH 范围内,反应生成的颜色与蛋白质浓度成正比。与 Lowry 法相比,BCA 法的常规测定程序(100—1200 $\mu\text{g/ml}$)与 Lowry 法相近,但 BCA 法抗试剂干扰的能力和工作试剂的稳定性均优于后者,新配和配制一周的 BCA 工作试剂对测定无影响;在 60°C 反应 30min,显色后 1h 内读 A_{562nm} 值无变化,可见此法显色很稳定;用三氯乙酸沉淀蛋白质以避免若干干扰物质的影响,这种措施同样适用于两者;BCA 法除对还原糖的干扰敏感(可能是该法使糖把 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ 的原因)外,对其他干扰试剂,特别是对常用于蛋白质增溶的去污剂,对 4 mol/L 盐酸胍或 3mol/L 脲这样的变性剂均无影响;此法测定不同蛋白质时,测值变化差别较小。对含有约 0.5—10 $\mu\text{g/ml}$ 的蛋白质样液可精确测定。

Lowry 法定量蛋白质简单、灵敏和准确,

是一般实验室最广泛采用的方法。其不足处是蛋白质/蛋白质间测值差异较大,反应速度稍慢及有时出现的标准曲线的非线性等。三十多年来,许多研究者针对这些不足做了许多改进,使方法不断臻于完善,至今仍不失为蛋白质定量的一种最重要和最广泛采用的方法。蛋白质-染料结合法比 Lowry 法简单(一个试剂)、更快(5 min)和不受某些常用试剂干扰的优点,因而有取代 Lowry 法的趋势,但该法也受某些常用试剂(如去污剂)的干扰,吸收值随不同蛋白质种类而有较大差别的缺点,某些蛋白质测定时也有标准曲线非线性的问题,所以迄今未见有用染料结合法取代 Lowry 法的一致说法。BCA 法、蛋白质银染色定量法、蛋白质与胶体金亲和定量法也各有特点。当后一种方法在克服前一种方法的缺点的同时,适应了特定实验条件的需要,显示了它的优点,但由于测定体系的复杂性,必又暴露出对另一些条件下的不适应性,因而,重要的是在了解各种方法的特点的基础上,根据不同的情况,选用恰当的方法,采用与测定蛋白质相同的标准蛋白作对照,以求达到准确的测定要求。

参 考 文 献

- 1 Lowry O H *et al.* *J Biol Chem*, 1951; **193**: 265
- 2 Peterson G L. *Anal Biochem*, 1979; **100**: 201
- 3 Ross E *et al.* *Anal Biochem*, 1973; **54**: 304
- 4 Hughes J *et al.* *Anal Biochem*, 1981; **117**: 1
- 5 Potacheck I *et al.* *Anal Biochem*, 1981; **117**: 311
- 6 Larson E *et al.* *Anal Biochem*, 1986; **155**: 243
- 7 康建等. *生物化学与生物物理进展*, 1988, **15**(2): 147
- 8 Robert E B. *Anal Biochem*, 1983; **129**: 483
- 9 Schaffner W *et al.* *Anal Biochem*, 1973; **56**: 502
- 10 Kaplan R S *et al.* *Anal Biochem*, 1985; **150**: 97
- 11 Hische E A H *et al.* *Clinical Chem*, 1982; **28**: 1236
- 12 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248
- 13 胡卓逸等, *中国药科大学学报*, 1987; **18**(2): 133
- 14 Krystal G *et al.* *Anal Biochem*, 1985; **148**: 451
- 15 Stoschek C H. *Anal Biochem*, 1987; **160**: 301
- 16 Smith P K *et al.* *Anal Biochem*, 1985; **150**: 76

[本文于1988年8月24日收到]