

蔗糖密度梯度离心——原子吸收法测定锌在血清蛋白中的分布

丁力 吴炳辅

(北京医科大学公共卫生学院中心实验室)

提 要

用蔗糖密度梯度离心及石墨炉原子吸收法分析测定微量元素锌在人血清蛋白中的分布量,此方法具有分离效果好,能保证蛋白的完整性,以及较好的精密度等优点。

关键词 蔗糖, 锌, 原子吸收法, 血清

锌对人的营养, 健康与疾病的重要意义已得到广泛证实。但单纯测定体液总锌量并不能满足深入研究锌在体内的生理和生化作用机制的需要。因此, 需要开展锌在血清蛋白中分布的研究。据报道^[1], 血清锌几乎全与白蛋白或 α_2 巨球蛋白(α_2 MG)结合, 但其分布量未能得到一致结果。Song^[2]等人认为采用蔗糖密度梯度离心分离血清蛋白对金属蛋白之间的相互作用力影响较小, 但他们的分离结果并不理想, 这主要是由于沉降带扩散造成的。我们改变了分离条件, 取得了较好的离心分离效果。

材 料 和 方 法

一、仪器与试剂 L5-50E Backman 超速离心机(SW60 转头), 日立850型荧光分光光度计, SP-8000型紫外分光光度计, DGF-U型密度梯度自动产生器, P-E 703型原子吸收分光光度计, 白蛋白(北京生物制品研究所), α_2 巨球蛋白(北京市中心血站), 蔗糖(分析纯并经活性炭煮沸脱色去除杂质, 北京化工厂), 8-苯胺基-1-萘磺酸钠盐(美国Sigma公司), 其余试剂均为分析纯。所用玻璃仪器, 塑料器皿均经1:1硝酸浸泡去离子水冲洗后烘干。

二、实验方法 1. 采样: 血样采自健康

人, 经粗离心分离后, 取血清于塑料小瓶中, 加盖待试。

2. 血清蛋白的分离和鉴定

实验确认4~16%蔗糖线性梯度液具有最佳分离效果^[3]。以pH 7.4, 0.05 mol/L Tris-HCl为溶剂, 配制3%、4%、16%的蔗糖液, 用DGF-U型密度梯度仪以1毫升/分速度同时制备6管4~16%线性梯度液, 每管4毫升。

以生理盐水等体积稀释血清, 取0.2毫升样品液和等体积3%蔗糖液, 小心铺在梯度液顶部, 用Backman超速离心机(SW 60转头)在40000转/分4℃下, 离心4小时, 然后自上而下收集离心组份。

采用紫外分光法和1.8-ANS荧光法定量分析血清蛋白质和白蛋白含量, α_2 MG的鉴别采用板状聚丙烯酰胺凝胶电泳法。将最后10管组份与50 μ g/ml α_2 巨球蛋白标准液同时进行电泳, 发现仅最后4管含有 α_2 MG, 两者移动位置一致。

3. 微量元素锌的原子吸收分析

由于分离后的样品量极少, 且锌含量较高, 用灵敏线分析需多倍稀释, 操作繁琐, 易引入误差, 因此采用次灵敏线307.6nm石墨炉法测定。

结果与讨论

血清中蛋白质及白蛋白、 α_2 巨球蛋白离心分析结果见图 1 图 2。

比较两图，A 峰为白蛋白，且主要位于离心管上部四分之一处，分布区间较窄，说明分离效

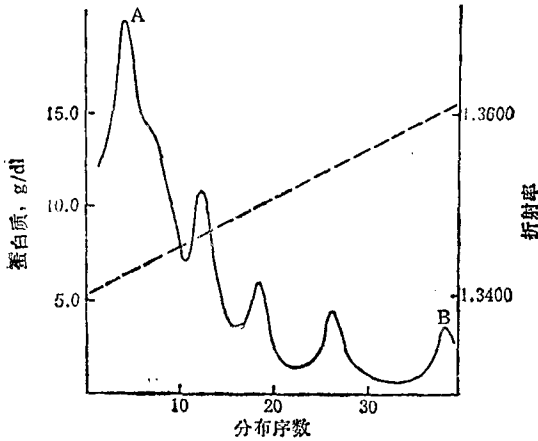


图 1 血清蛋白质在 4~16% 蔗糖梯度液中的分布
A 峰：白蛋白 B 峰： α_2 巨球蛋白

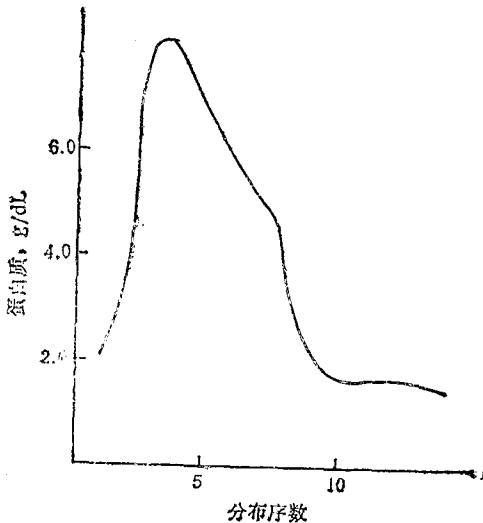


图 2 白蛋白分布图

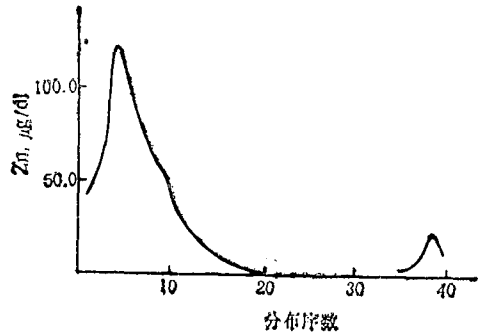


图 3 锌在血清蛋白中的分布

果满意。电泳结果证实图 1 中 B 峰为 α_2 MG。

血清锌分布测定结果见图 3。

应用本法对健康人血清蛋白中锌的分布量进行分析，结果表明：占血清总锌量的 80~90% 与白蛋白结合；白蛋白结合锌与白蛋白含量存正相关；白蛋白结合锌与血清总锌存正相关； α_2 巨球蛋白结合锌含量较为恒定，其摩尔比为 0.52 ± 0.09 。以上结果与近年来国外报道基本相同。

以上表明采用超速离心法可得到较满意的蛋白分离效果，不仅能保证分离完全，而且对蛋白与金属间的相互作用干扰较小，为准确测定不同蛋白中的锌含量建立了基础。

参 考 文 献

- 1 Prasad A S. *Human Zinc Deficiency in Biological Aspects of Metals & Metal Related Diseases*. New York: Raven Press, 1983
- 2 Song M K. *Clin Chim Acta*, 1979; 99: 13
- 3 Work T S. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 1976; 6: Part 1
- 4 Raymond F Chen, *Biochemical fluorescences*. New York: Marcel Dekker, 1976; 2: 348
- 5 Foote J W. *Analyst*, 1984; 109: 709

[本文于 1988 年 9 月 3 日收到]

信息服务

甜 蜜 素 制 法

甜蜜素是一种甜度高出蔗糖几十倍的甜味剂，可广泛用于食品、糕点、饮料行业以取代日益紧张的蔗糖。国内生产厂家少，产品销路广阔。

生产本产品，原料在各地均可买到。设备投资一千元，厂房 20 平方米即可建厂，适合中小企业及个体户

生产。面授：单位 300 元，个人 250 元；函授：单位 100 元，个人 80 元。(B107)

[北京星火技术研究所提供，通讯处：北京 867 信箱 20816 组李群，邮政编码：100024]