

三种测定蛋白含量方法受干扰物影响的比较

杜建生 陈曦

(中国医学科学院心血管病研究所阜外医院,北京 100037)

关键词 蛋白含量测定, 干扰物

以牛血清白蛋白(BSA)和细胞色素 c Cyt. c 两种 Tris, 胍, 和脲为干扰物, 采用三种蛋白测定方法: Lowry 法^[1]、二硫苏糖醇法 (DTT 法)^[2,3]和考马斯亮蓝

表1 各种干扰物对蛋白测定的影响

	Lowry 法			DTT 法			CBB 法		
	干扰物浓度 (μg/ml)	干扰百分比(%) BSA	Cyt.c	干扰物浓度 (μg/ml)	干扰百分比(%) BSA	Cyt.c	干扰物浓度 μg/ml	干扰百分比(%) BSA	Cyt.c
KCl	1.50	3.6	6	1.06	23.8	-6.2	1.24	1.66	-13.4
	3.00	—	—	2.12	—	—	2.48	-14.1	-23.4
SDS	0.44	11.4	9	0.41	26.4	-3.3	0.48	—	—
	0.89	7.3	3.9	0.82	17.0	-5.5	0.96	—	—
蔗糖	1.55	-1.0	-6.9	1.4	7.1	-4.0	1.65	-7.9	-21.9
	3.10	10.7	-1.2	2.8	-12.5	-11.4	3.30	-1.2	-9.81
NaCl	0.44	9.7	6	0.41	20.8	0.9	0.48	4.3	-7.9
	0.89	6.7	6.1	0.82	-37.0	-12.0	0.96	-1.3	-0.7
Tris	0.10	6.3	-5.7	0.10	-3.8	-14.8	0.12	6.6	-5.5
	0.21	-11.7	-23.4	0.20	-19.6	-30.2	0.24	-2.3	-3.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.00	-69.1	-53.4	1.8	-71.7	-59.2	2.2	14.3	8.2
	4.00	-88.9	—	3.7	—	—	4.4	-3.5	-2.0
胍	1.47	12.1	7.8	1.36	15.8	4.9	1.59	-2.3	-7.9
	2.94	—	—	2.73	—	—	3.18	9.9	-4.5
脲	0.92	16.1	11.4	0.85	22.6	2.5	1.0	5.0	0.9
	1.85	13.4	6.3	1.70	6.4	-0.6	2.0	-10.3	3.9

n = 4 负值表示减色 “—” 表示无法测定 Lowry 法反应体系终体积为 3.25ml, BSA 含量为 48μg, Cyt.c 含量为 52μg. DTT 法 终体积为 3.5ml, BSA 含量为 31μg, Cyt.c 含量为 29μg. CBB 法 终体积为 3.0ml, BSA 含量为 29μg, Cyt.c 含量为 31μg.

显色方法 (CBB 法)^[4,5]. 做了不同干扰物对三种蛋白含量测定方法影响的实验 (结果详见表 1). 实验结果表明, 对所选用的干扰物, Lowry 法受到的影响较大且广泛, DTT 法也受到广泛的影响, 而 CBB 法受到的干扰相对较少. 对于特定的干扰物来讲, 它们又各自表现出不同的特点: 例如用作蛋白沉淀剂的硫酸

铵, 对 Lowry 法和 DTT 法 均有严重的影响, 而对 CBB 法的影响则较小; 又如在用于酶的性质及构象研究中的蛋白变性剂胍和脲的存在下, CBB法亦优于 Lowry 法和 DTT 法. 而常用于蛋白质增溶的阴离子去污剂 SDS 则对 CBB 法有较为严重的影响.

无论是 Lowry 法还是 DTT 法以及简单的 CBB

法,它们都不能一法而胜任各种情况下蛋白定量测定的要求,只能在某些特定的情况下,才体现出各自的优点,所以在进行蛋白测定之前,应根据所测蛋白的种类及所处的溶液体系来选择合适的方法。

参 考 文 献

1 Lowry O H *et al.* *J Biol Chem*, 1951; 193: 256

2 Larson E *et al.* *Anal Biochem*, 1986; 155: 243
 3 康建,初俊杰. 生物化学与生物物理进展, 1988; 15(2): 147
 4 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248
 5 胡卓逸, 孙承琦. 生物化学与生物物理进展, 1990; 7 (1): 23

固氮作用色谱定量方法的改进

王梓壬 蔡玉奎

(中国科学院福建物质结构研究所,福州 350002)

关键词 气相色谱,半峰宽,系数法

以乙炔还原为乙烯的反应计量固氮作用已是普遍采用的方法,其优点是可以气相色谱法快速测定。色谱定量主要有峰高法及峰面积法,峰高法比较简便,但误差比较大,所以一般均采用峰面积法,但测量手续繁琐。根据峰面积法的色谱专用计算机已比较成熟,而价格尚比较贵,国内还有大量色谱仪未配计算机。我们在进行化学模拟生物固氮的研究中,以乙炔为底物,模型物催化还原乙炔为乙烯外还有副产物乙烷,为了快速测定体系中的甲烷、乙烷、乙烯、乙炔等四组分的含量,我们采用系数法处理色谱数据,使每日的数据测量工作简化。

1 系数法的理论根据和计算方法

当选择好色谱分离柱^[1]及操作条件后,所测定体系色谱分离较好,峰形对称满足正态分布时(如图 1 所示),用归一化法测定该四组分的百分含量为:

$$V_i\% = \frac{S_i}{S_1 + S_2 + S_3 + S_4}$$

$$= \frac{h_1 W_{\frac{1}{2}}^1}{h_1 W_{\frac{1}{2}}^1 + h_2 W_{\frac{1}{2}}^2 + h_3 W_{\frac{1}{2}}^3 + h_4 W_{\frac{1}{2}}^4} \quad (1)$$

式中 S 代表各峰面积, h 代表各峰高, $W_{\frac{1}{2}}$ 代表各半峰宽。手工测量半峰宽是比较麻烦的,需用读数显微镜或游标卡尺,并且误差大,是测定结果误差的主要来源。

根据 J. H. Purnell^[2] 提出的色谱柱有效理论塔片公式:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_k^1}{W_{\frac{1}{2}}} \right)^2 \quad (2)$$

式中 N 是有效理论塔片数, t_k^1 是化合物的实际

保留时间, $W_{\frac{1}{2}}$ 是各化合物的半峰宽, 色谱条件固定后, N 是常数。把 (2) 式开方并移项得:

$$W_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{\sqrt{5.54}} t_k^1 \quad (3)$$

令

$$\frac{1}{\sqrt{5.54}} = K,$$

(3) 式可简化为:

$$W_{\frac{1}{2}} = K t_k^1 \quad (4)$$

由 (4) 式可知各化合物的半峰宽 $W_{\frac{1}{2}}$ 与其实际保留时间 t_k^1 成正比,也就是各化合物的半峰宽之比等于其实际保留时间之比:

$$\frac{W_{\frac{1}{2}}^1}{W_{\frac{1}{2}}^4} = \frac{t_1^1}{t_4^1}, \frac{W_{\frac{1}{2}}^2}{W_{\frac{1}{2}}^4} = \frac{t_2^1}{t_4^1}, \frac{W_{\frac{1}{2}}^3}{W_{\frac{1}{2}}^4} = \frac{t_3^1}{t_4^1} \quad (5)$$

我们定义

$$f_1 = \frac{W_{\frac{1}{2}}^1}{W_{\frac{1}{2}}^4}, f_2 = \frac{W_{\frac{1}{2}}^2}{W_{\frac{1}{2}}^4}; f_3 = \frac{W_{\frac{1}{2}}^3}{W_{\frac{1}{2}}^4}$$

为各化合物的相关系数。如果暂时不考虑各化合物在氢火焰检测器上的响应因子,只要测定各化合物的实际保留时间,就可以求出这些相关系数,代入 (1) 式即得简化的计算公式:

$$V_i\% = \frac{f_i h_i}{f_1 h_1 + f_2 h_2 + f_3 h_3 + f_4 h_4} \quad (6)$$

固定色谱条件后,只要一次求出各相关系数 $f_1, f_2, f_3,$