

对乙酰基偶氮氯膦-钡()-乳化剂 OP 分光光度法测定蛋白质

翟庆洲*, 张 静

(长春理工大学纳米技术研究中心, 长春 130022)

摘 要:提出了借对乙酰基偶氮氯膦(CPA_{pA})-钡()-乳化剂 OP 与蛋白质显色反应分光光度法测定蛋白质的高灵敏方法。在 pH 2.5 Britton-Robinson 缓冲介质中,蛋白质可与 CPA_{pA}-钡()-乳化剂 OP 形成蓝色复合物,蛋白质的加入可使 Ba()-CPA_{pA} 配合物溶液增色且增色程度与蛋白质的质量浓度成正比。体系的最大吸收波长位于 362 nm,测定白蛋白(BSA)表观摩尔吸光系数 $\epsilon_{362\text{ nm}} = 6.11 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,BSA 在 0 ~ 20 mg/L 浓度范围内遵守比耳定律。加入乙醇可提高体系的稳定性和灵敏度。表面活性剂 OP 的加入,显著地提高体系的稳定性。血清中常见组分不干扰蛋白质的测定。所提出的方法可用于人血清样品中蛋白质总量的测定。

关键词:蛋白质;分光光度法;对乙酰基偶氮氯膦;钡(II);乳化剂 OP;血清

中图分类号:O657.32

文献标识码:A

文章编号:1000-0720(2005)08-0055-03

蛋白质是人体的必需营养成分,在生化、医药、食品及临床分析中为经常检验的项目,因此蛋白质的测定具有重要的意义。蛋白质的测定方法过去多采用 Lowry 法、双缩脲法、Bradford 法(也称考马斯亮蓝法)等^[1,2],但这些方法具有一系列缺陷如灵敏度低、线性关系较差等^[2]。近年来,染料类试剂在适宜条件下,可作为蛋白质试剂,但多为阴离子染料,如曙红 B^[3]、偶氮胂 K^[4]。这些方法的主要缺陷是灵敏度低、抗干扰能力差以及不同蛋白质之间的测定差值差异性大等。近年来,已发展到了采用借金属离子-染料和蛋白质在适宜条件下反应,进行蛋白质分析的方法,文献已报道的有二溴苯基荧光酮-Ti()^[5]、二溴羟基苯基荧光酮-Mb()^[6]、水杨基荧光酮-Mb()^[7]、BPR-Zn()^[8]、络天青 B-Be()^[9],这类方法具有不同蛋白质之间的测定值差异性小,方法灵敏度高、抗干扰能力强等优点。对乙酰基偶氮氯膦(CPA_{pA})曾用作稀土元素显色剂^[10]。本文以 CPA_{pA}-Ba()配合物作为蛋白质的新型光谱探针,在乳化剂 OP 存在下,研究了其与蛋白质的结合

反应。本法可直接用于人血清蛋白质总量的测定。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

对乙酰基偶氮氯膦(CPA_{pA},上海长科试剂研究所)溶液: $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$,准确称取 0.0274 g CPA_{pA} 溶于适量水中,定容于 100 mL 容量瓶中; Ba()溶液:2 g/L,准确称取 0.3562 g BaCl₂·2H₂O 溶于适量水后定容至 100 mL 容量瓶中;Britton-Robinson (B-R)缓冲溶液(pH 2.5):取三酸混合液(H₃PO₄、乙酸、硼酸浓度均为 0.04 mol/L) 100 mL,加入 0.2 mol/L NaOH 溶液 15 mL。牛血清白蛋白(BSA,北京博星生物技术责任有限公司)工作液 100 mg/L:准确称取 25 mg BSA 溶于适量水中,于 250 mL 容量瓶中用去离子水定容。无水乙醇;体积分数 2% OP 水溶液;实验用水为去离子水。

722S 型分光光度计(上海棱光技术有限公司)配 1 cm 石英比色皿。

1.2 实验方法

于 10 mL 容量瓶中,依次加入体积分数 2% OP

* 收稿日期:2004-08-24;修订日期:2004-09-17

作者简介:翟庆洲(1968-),男,教授

溶液 2.0 mL, pH 2.5 B-R 缓冲溶液 2.0 mL, 4.0×10^{-4} mol/L CPApA 溶液 1.0 mL, 2 g/L Ba() 溶液 1.0 mL, 无水乙醇 2.0 mL, 牛血清白蛋白工作液 1 mL, 放置 10 min 后, 用 1 cm 比色皿以水为空白作参比, 在 362 nm 处测量试剂空白 (A_0) 和 Ba()-CPApA 配合物与蛋白质的结合物的吸光度 (A), 并求出 $A = A - A_0$ 。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

按实验方法显色测定吸收光谱, 结果表明(图 1), CPApA(曲线 a) 加入 Ba() 后形成络合物(曲线 c), CPApA-Ba() 加入 BSA 后, 吸光度进一步增加, 表明新复合物形成(曲线 d)。加入表面活性剂 OP 和乙醇后, CPApA-Ba()-BSA 体系灵敏度进一步增大(曲线 f)。从曲线 g, h 可进一步看出 OP 和乙醇加入后(曲线 h), 会提高体系灵敏度。由曲线 h 可知, BSA-Ba()-CPApA-OP-C₂H₅OH 体系最大吸收波长位于 362 nm 处, 实验选取测定蛋白质波长为 362 nm。

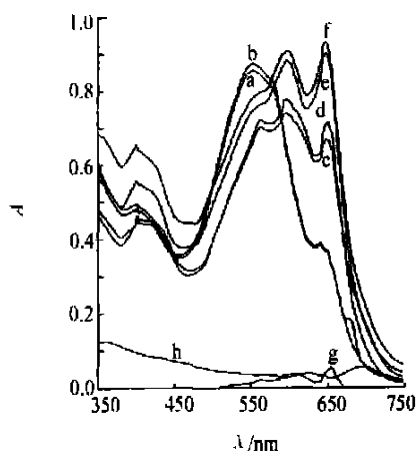


图 1 吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra

a: CPApA; b: CPApA-BSA; c: CPApA-Ba(); d: CPApA-Ba()-BSA; e: (c) + OP + C₂H₅OH; f: (d) + OP + C₂H₅OH; (a-f: 对水); g: BSA-Ba()-CPApA; h: (g) + OP + C₂H₅OH; (g-h: 对试剂空白)

2.2 酸度的影响

按实验方法加入不同 pH 值的缓冲溶液进行实验, pH 在 2.0 ~ 3.0 范围内, A 较大且波动较小, 选用 pH 2.5 作为最佳 pH 值。实验结果表明, 缓冲溶液用量在 1.5 ~ 2.5 mL 范围内, A 较大且

平稳, 实验选用 2.0 mL 缓冲溶液控制体系酸度。

2.3 表面活性剂的影响

在不加表面活性剂时, 体系生成沉淀。本文研究了乳化剂 OP, 吐温-80 (Tween-80), 十六烷基三甲基溴化铵 (CTMAB), 十二烷基磺酸钠 (SDS) 表面活性剂的影响, 发现 OP, CTMAB 有增色作用, Tween-80 有褪色作用, 加入 SDS 体系立即生成沉淀。加入 CTMAB, Tween-80 的体系只能稳定 40 min。本文采用乳化剂 OP, 其增色效果最好, 增稳效果最好, 体系可稳定 2 h。按实验方法加入不同量的 OP 溶液, 适宜用量以 1.0 ~ 2.5 mL 效果较好, 采用 2.0 mL。

2.4 试剂用量的影响

实验结果表明, CPApA 溶液适宜用量为 0.50 ~ 1.5 mL, 实验采用 1.0 mL。

按实验方法加入不同量的 Ba(), 结果表明, 加入 0.8 ~ 1.6 mL Ba() 溶液时, A 较大, 采用 1.0 mL。加入乙醇后, 随着乙醇加入量增加, 体系吸光度逐渐增大, 灵敏度提高。考虑体系容量, 在 10 mL 体系中, 加入 2 mL 乙醇较为适宜。加入乙醇后, 体系灵敏度得到了提高。实验表明, 试剂加入次序, 以按实验方法次序为佳 (OP + B-R + CPApA + Ba() + BSA + C₂H₅OH)。如按其它次序, 结果不够理想。

考察了离子强度的影响, 按实验方法分别加入 1.0, 5.0, 10 g/L NaCl 溶液各 1 mL, 发现 NaCl 加入对此体系影响不大, 吸光度变化很小。

2.5 体系的稳定性

按实验方法加入各种试剂后, 体系反应 10 min 达到平衡, 吸光度稳定, 体系至少稳定 2 h。

2.6 最大结合数的测定

实验采用摩尔比法测定了蛋白质与 CPApA 的最大结合数, 表明 $n(\text{BSA}) : n(\text{CPApA}) = 160 : 1$ 。

2.7 共存离子的影响

当测定的 BSA 为 10 mg/L 时, 按实验方法实验生物体内一些常见氨基酸及金属离子的影响, 以相对误差不超过 $\pm 5\%$ 为限时, 其允许量(倍数)如下: 尿素(0.5), 酒石酸(0.02), 柠檬酸(5), 抗坏血酸、苯丙氨酸、酪氨酸、赖氨酸(0.05), 脯氨酸(0.1), 色氨酸、丝氨酸(0.03), 葡萄糖(0.5), Fe^{2+} 、 Cu^{2+} (0.02), Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} (0.05), Mg^{2+} (0.2), Ca^{2+} 、 Zn^{2+} (0.1)。

2.8 工作曲线

按实验方法加入不同量的牛血清白蛋白绘制工作曲线,结果表明,方法线性回归方程为 $A = 0.00988 - 0.00115 \text{ (mg/L)}$,相关系数 $r = 0.9992$,方法线性范围为 $0 \sim 20 \text{ mg/L}$,经工作曲线算得方法表观摩尔吸光系数 $_{362 \text{ nm}} = 6.11 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

2.9 样品分析

准确移取血清样品 0.50 mL 于 100 mL 容量瓶

中,用去离子水定容,摇匀,作为工作液。于 10 mL 容量瓶中,按实验方法依次加入各种试剂和 0.5 mL 上述血清工作液,放置 10 min 后,以水空白为参比,在波长 362 nm 处用 1 cm 吸收皿测量试剂空白(A_0)和血清样品中蛋白质与 $\text{Ba}(\text{ })\text{-CPAPa}$ 配合物的结合物的吸光度(A),求出 $A = A - A_0$,并由工作曲线回归方程算出血清样品中的蛋白质。

以上样品分析结果见表 1,本法加标回收率结果在 $96.8\% \sim 97.6\%$ 之间,5 次测定结果相对标准偏差不超过 2% ,符合一般分析需要。

表 1 人血清样品中蛋白质总量测定结果

Tab. 1 Determination results of total protein in human serum

人血清样品	测得值 / (g/L)	平均值 / (g/L)	RSD / %	回收率 / %
1	55.74, 56.25, 54.73, 57.77, 55.63	56.62	2.0	97.6
2	62.83, 63.84, 62.83, 64.35, 64.35	63.64	1.4	98.8

参考文献

- [1] Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 248
- [2] 郭敏亮,姜涌明. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23 (6): 558
- [3] 李华岑,高建华. 光谱实验室, 2004, 21(1): 112
- [4] 胡秋雯,赵凤林,李克安. 分析测试学报, 2000, 19 (1): 45
- [5] 汤桂那,魏 巍,王保宁. 分析化学 1993, 21(7): 831
- [6] Guo Z X, Hao Y M, Cong X *et al.* Anal Chim Acta, 2000, 403: 225
- [7] 沈含熙,刘六战,刘玉国. 光谱与光谱分析, 1999, 19 (3): 444
- [8] Zhu K, Li K A, Tong S Y. Anal Lett, 1996, 29(4): 575
- [9] Fujita Y, Mori I, Toyoda M. Anal Sci, 1992, 8: 313
- [10] Pan J M, Yang R, Hsu C G. Anal Chim Acta, 1992, 257: 117

Determination of protein with p-acetylchlorophosphonazo-barium ()-emulgent OP by spectrophotometry ZHAI Qing-zhou and ZHANG Jing (Research Center for Nanotechnology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022), Fenxi Shiyanshi, 2005, 24(8): 55 ~ 57

Abstract: A highly sensitive spectrophotometric method

is proposed for the determination of protein with p-acetylchlorophosphonazo-barium ()-emulgent OP-protein system. In a Britton-Robinson buffer medium of pH 2.5, the bovine serum albumin (BSA) can form a blue complex with $\text{Ba}(\text{ })\text{-CPAPa}$ complex. The addition of protein can enhance the colour of the complex and the degree of increase colour is proportional to the concentration of the protein. The maximum absorption wavelength of the system is at 362 nm . The apparent molar absorptivity for the determination of BSA is $6.11 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Beer's law is obeyed over the range of $0 \sim 20 \text{ mg/L}$ for BSA. The addition of ethanol can enhance the stability and sensitivity of the system. The addition of surfactant OP can obviously enhance the stability of the system. The common components in serum do not interfere with the determination of protein. The proposed method was used in the determination of the total protein in human serum samples with satisfactory results. The method possesses the advantages of high sensitivity, high selectivity, fast and easy operation.

Keywords: Protein; Spectrophotometry; p-Acetylchlorophosphonazo; Barium(); Emulgent OP; Serum