

卟啉全内反射同步荧光法测定蛋白质

陈莹, 姚闽娜, 唐尧基, 李耀群*

厦门大学化学化工学院与现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005

摘要 应用全内反射与同步荧光相结合的技术, 建立了利用蛋白质吸附在液-固界面上的同步荧光信号来测定本体蛋白质溶液浓度的新方法。其原理为 meso-四(4-磺酸基苯基)卟啉(TPPS)标记牛血清蛋白(BSA)在石英界面的吸附后信号强度随本体溶液浓度的增加呈线性关系。方法的检出限是 $94 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。用于实际人血清蛋白样品的测定, 结果令人满意。

主题词 全内反射; 同步荧光; 卟啉; 血清蛋白

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2005)12-2048-04

引言

全内反射荧光技术 (total internal reflection fluorescence, TIRF) 是目前研究生物大分子在界面上吸附的一种有效手段^[1]。当光以大于临界角的角度从光密介质入射到光疏介质时, 在界面上发生全内反射。发生全内反射的光在 Z 轴方向产生“倏逝波”(Evanescent wave)。倏逝波频率与入射光相同, 能量随着离开界面的距离呈指数衰减。倏逝波渗透到光疏介质的厚度一般可以达到几十到几百个纳米范围, 而且可通过调整入射光的角度、波长、折射指数来改变倏逝波渗透到界面的深度, 因此 TIRF 能够灵敏且有选择性地检测界面附近的荧光团。

同步荧光具有同时测定多组分荧光物质, 减小光谱重叠、窄化谱带等优点^[2]。

蛋白质在固-液界面上有强烈的吸附能力^[3]。本文应用 TIRF 和同步荧光相结合的技术^[4, 5], 研究了牛血清蛋白(BSA)和 meso-四(4-磺酸基苯基)卟啉(TPPS)相结合吸附到玻璃界面的性质, 利用液-固界面荧光信号与溶液中蛋白质浓度的线性相关, 定量表征溶液中的蛋白质, 并应用于实际人血清样品中蛋白质的含量测定。目前这种利用石英-水界面上吸附的荧光信号表征溶液中物质含量的方法尚未见文献报道。

1 实验部分

1.1 试剂和实验仪器

TPPS(porphyrin products Inc.)用水配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol}$

$\cdot \text{L}^{-1}$ 溶液冷藏保存; 牛血清蛋白 BSA (Boehringer 进口分装, 纯度: 生化试剂)用磷酸盐生理缓冲液(PBS)配成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 放置于冰箱中。其他试剂均为分析纯(AR)。实验所用水均为二次蒸馏水。实验体系的缓冲溶液取邻苯二甲酸氢钾($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)用 NaOH 和 HCl 配成不同 pH 值的缓冲液体系。人血清样品由厦门大学医院提供。

实验室自制荧光分光光度计, 酸度计为 Delta320A/CpH 计(Mettler toledo)。图 1 是样品池的结构示意图: 半圆柱形棱镜(石英玻璃), 光以大于临界角的角度(本实验 $\theta_c \approx 66^\circ$)通过半圆柱形棱镜照射到界面上, 产生全内反射现象; 石英流通池, 进样口位于池子侧下端, 出样口在池子的上端。

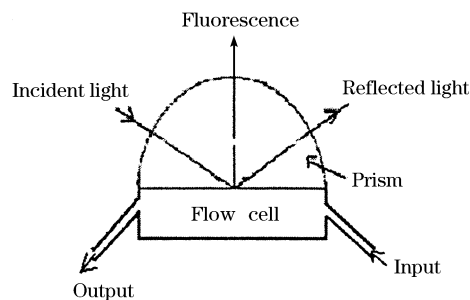


Fig. 1 The optical arrangements of synchronous TIRF measurement

1.2 实验方法

于 10 mL 比色管中, 加入一定体积的 TPPS, BSA 和 NaCl 溶液, 用邻苯二甲酸氢钾缓冲液稀释到刻度。样品池采用流动进样, 每次样品进样之前用洗液(乙醇: 浓盐酸 = 2: 1)、缓冲液依次冲洗, 以此获得洁净的石英表面; 蛋白质

收稿日期: 2004-06-28, 修订日期: 2004-10-08

基金项目: 教育部优秀青年教师资助计划项目(教人司[2001]39号)和国家自然科学基金(29875023)资助项目

作者简介: 陈莹, 1980年生, 厦门大学化学化工学院硕士研究生 * 通讯联系人

吸附时间为 15 min, 以趋于吸附平衡。将样品架置于荧光计中, 使入射光角度大约 70° ; 选择荧光激发波长为 380 nm, 发射波长为 610 nm, 以 $\Delta\lambda=230$ nm 扫描全内反射同步荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 全内反射荧光光谱

BSA 在溶液中的荧光较弱, 需要对其进行标记。TPPS 是一种水溶性卟啉, 其分子结构见图 2, 在水溶液中有很强的荧光, 被广泛应用于荧光分析中, 因此可以用 TPPS 作为探针来标记溶液中的 BSA^[6-8]。图 3 是 TPPS 在不同环境下的同步荧光光谱。本体溶液中 TPPS 的信号在 438 nm 处, 而其在石英界面上的吸附很小, 加 BSA 到溶液中, 使其与 TPPS 结合, 在界面上的吸附能力可大大加强。从图中可以看出 TPPS 和 BSA 结合体在界面上的信号(421 nm)不同于本体信号(438 nm), 据此可以排除本体信号干扰, 获得较为纯粹的界面信息。

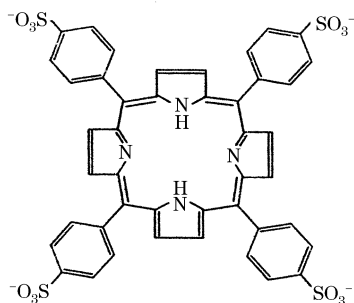


Fig. 2 The molecular structure of TPPS

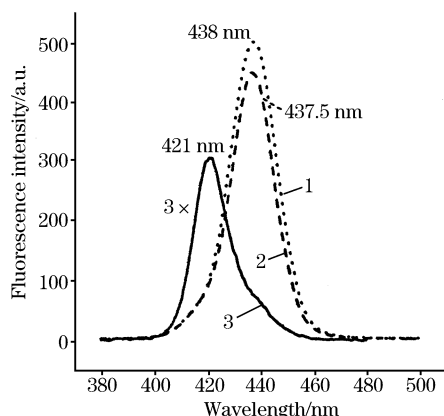


Fig. 3 The synchronous fluorescence spectra ($\Delta\lambda=230$ nm) of TPPS in different environment (the intensity of interface was amplified three times in the figure)

$[TPPS]=1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $[BSA]=6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 4.25

1, Bulk solution (TPPS); 2, Bulk solution (TPPS+BSA);

3, Interface (TPPS+BSA)

界面信号强度随本体溶液浓度的增加呈线性关系, 在此基础上建立了由吸附在界面上蛋白质信号来测定本体蛋白质溶液浓度的新方法。

2.2 工作条件的选择

2.2.1 pH 的影响

图 4 是界面上 BSA 和 TPPS 结合体的荧光强度随 pH 变化的曲线。在 pH 4.25 时, 界面荧光强度达到最大, 故实验选在 pH 4.25 的介质中进行。

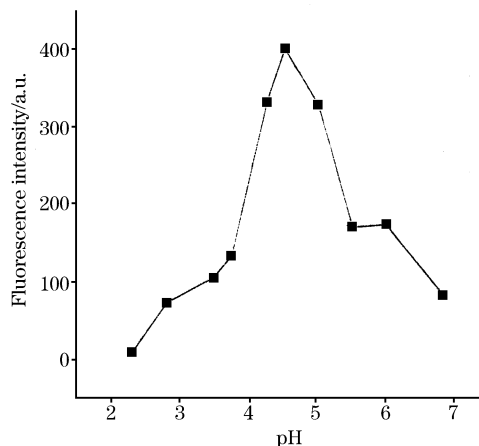


Fig. 4 The pH dependence of fluorescence intensity of TPPS binding to BSA at the interface

$c_{TPPS}=1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{BSA}=6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

2.2.2 TPPS 浓度的影响

图 5 是界面荧光信号随 TPPS 浓度变化的曲线。TPPS 的浓度在 $1.5 \times 10^{-6} \sim 2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 界面荧光信号出现递减趋势, 当浓度高于 $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 随着 TPPS 浓度的增高, 信号重新增高, 但是其受本体影响也增大, 所以实验条件选择 TPPS 浓度为 $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

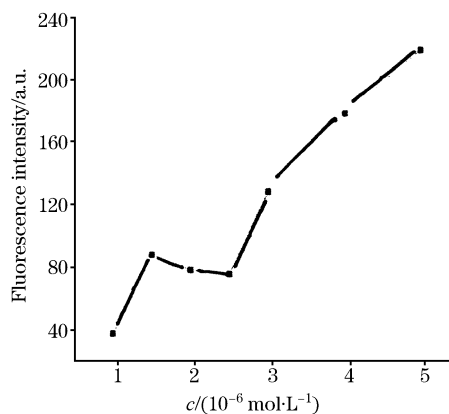


Fig. 5 The TPPS dependence on interfacial fluorescence intensity

pH 4.25, $c_{BSA}=6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

2.2.3 离子强度的影响

实验加入不同浓度的 NaCl, 考察离子强度对体系信号的影响。当溶液中 NaCl 浓度为 $0.065 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, TPPS 和 BSA 的结合体在界面上的信号强度效果较好。

2.2.4 试剂加入顺序的影响

考察了 TPPS-BSA-NaCl, NaCl-TPPS-BSA, TPPS-NaCl-BSA 几种加入顺序, 其中以 TPPS-NaCl-BSA 的加入顺

序时, 界面荧光强度最大。

2.3 干扰实验

对蛋白质测定中常见的干扰物质的影响进行了考察

(见表 1)。从表可知常见的氨基酸对体系的影响不大, 而无机离子 Cd^{2+} , Ca^{2+} 和 Cr^{3+} 允许存在的量较低。总体上该法的选择性较好。

Table 1 Effect of foreign substances on the determination

共存物	存在量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	误差/%	共存物	存在量/ $(10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	误差/%
赖氨酸	50	-5	Cu^{2+} , SO_4^{2-}	20	6
L-色氨酸	55	6	Cd^{2+} , Cl^-	5	7
酪蛋白	83	7	Ca^{2+} , Cl^-	2.5	5
谷氨酸	28	5	Zn^{2+} , Cl^-	10	6
苯甘氨酸	40	-6	Cr^{3+} , NO_3^-	6	6
维生素 B_{12}	45	3			

BSA, $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; TPPS, $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Potassium hydrogen phthalate buffer, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; NaCl, $0.065 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 4.25

2.4 蛋白质的工作曲线和血清样品分析

在最佳的实验条件下得出 BSA 的工作曲线(见图 6), 表 2 为其分析参数。检测的线性范围是 $1.0 \sim 8.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 工作曲线 $F = -3.40 + 21.43c_{\text{BSA}}$, $r = 0.995$, 检出限是 $94 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

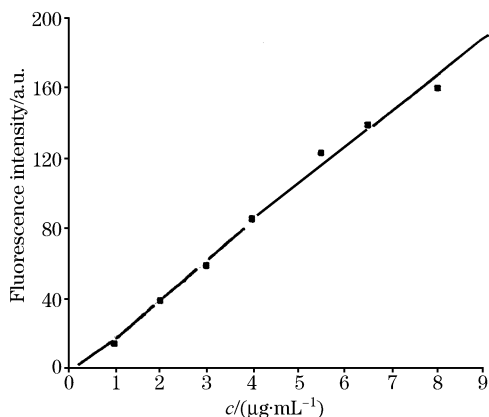


Fig. 6 The working curve for determination of BSA

按上述实验方法以 BSA 为标准蛋白质, 直接测定人血清蛋白样品, 实际人血清样用水稀释 100 倍, 测定条件与工作曲线相同。结果见表 3, 与标准溴甲酚绿方法(临床数据)比较, 结果一致。

Table 2 Analytical parameters

	线性范围 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回归方程 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	检出限* $/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	相关 系数 r
BSA	1~8	$F = -3.40 + 21.43c_{\text{BSA}}$	94	0.995

TPPS, $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Potassium hydrogen phthalate buffer, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; NaCl, $0.065 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 4.25

* 基于空白的 3 倍标准偏差 ($n=11$)

Table 3 The result for the determination of protein in samples

样品	本法测得的结果* $/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	溴甲酚绿方法测得 结果/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
血清样 1	73.8 ± 2.0	73.5
血清样 2	74.7 ± 4.3	74.4
血清样 3	79.0 ± 3.6	78.4

* Three measurements (average \pm SD)

参 考 文 献

- [1] Hirschfeld T. Appl. Opt. , 1976, 15: 2965.
- [2] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescence Analytical Methods(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 201.
- [3] Stanislaw P, Tricia Cregger, Zhao B, et al. Langmuir, 2001, 17: 7645.
- [4] Li Y Q, Xu J J, Wang R T, et al. Chinese Chem. Lett. , 2002, 13: 571.
- [5] Yao M N, Li Y Q. Chinese Chem. Lett. , 2004, 15: 109.
- [6] Li N, Tong S Y. Talanta, 1994, 41(10): 1657.
- [7] Borissevitch I E, Tominaga T T, Hidetake I, et al. J. Luminescence, 1996, 69: 65.
- [8] LIAN Shao-hui, YANG Shi-zhen, JIANG Shou-ping, NIU Jing-yi(连少辉, 杨士珍, 江寿平, 钮经义). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 1994, 14(1): 33.

Determination of Protein with TPPS by Total Internal Reflection Synchronous Fluorescence Spectroscopy

CHEN Ying, YAO Min-na, TANG Yao-ji, LI Yao-qun*

Department of Chemistry, the MOE Key Laboratory of Analytical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract A new method of quantitative determination for serum albumin in aqueous solution has been developed by measuring total internal reflection synchronous fluorescence at the solid/liquid interface. The combination of bovine serum albumin (BSA) and meso-tetrakis (4-sulphonatophenyl) porphyrin (TPPS) adsorbed onto the glass surface produced a synchronous fluorescence signal at 421 nm. At pH 4.25, the signal intensity of BSA adsorbed on the interface was proportional to the BSA concentration in bulk solution. The linear range of 1.0–8.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the detection limit of 0.94 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ were obtained. The human serum samples were determined with satisfactory results.

Keywords Total internal reflection; Synchronous fluorescence; TPPS; Protein

(Received Jun. 28, 2004; accepted Oct. 8, 2004)

* Corresponding author