

# 达旦黄-曲通 X-100 体系共振光散射法测定蛋白质

冯素玲, 王瑾, 樊静

河南师范大学化学与环境科学学院, 河南省高等学校环境科学与工程重点学科开放实验室, 河南新乡 453002

**摘要** 基于在 Triton X-100 存在下, 蛋白质与达旦黄作用使得体系的共振光散射增强, 在  $\lambda=492\text{ nm}$  处光散射强度最大, 增强作用的强弱与蛋白质的含量成正比, 据此建立了共振光散射测定蛋白质的新方法。此方法对牛血清白蛋白的检出限达到  $17.7\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 线性范围为  $0.03\sim 0.9\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 用于合成样与人血清样品的分析, 取得了令人满意的结果。同时也研究了人血清白蛋白、鸡蛋白白蛋白、溶菌酶、胰蛋白酶与达旦黄的作用。

**主题词** 共振光散射; 蛋白质; 达旦黄; 曲通 X-100

**中图分类号:** O635.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)06-0927-03

## 引言

蛋白质是一类重要的生物大分子, 在生物体内占有特殊的地位, 是生命的物质基础。蛋白质的定量测定是生物化学和其他生物科学中经常涉及的内容, 也是临床检验中诊断疾病及检查治疗效果的重要指标, 又是许多生化药物分离提纯质量检验中常见的分析项目。目前蛋白质的定量测定方法主要有分光光度法<sup>[1, 2]</sup>和荧光法<sup>[3, 4]</sup>。共振光散射作为一种新的分子光谱技术, 对生物分析技术的发展有着重要的意义。近年来, 运用共振光散射技术对蛋白质进行定量测定的研究已有报道<sup>[5-9]</sup>。以表面活性剂做增敏剂用于光散射法测定蛋白质的报道见文献<sup>[10, 11]</sup>, 其中刘绍璞等<sup>[10]</sup>利用金橙 G 建立了共振光散射测定蛋白质的方法, 但仅用于合成样品中蛋白质的测定; 冯宁川等<sup>[11]</sup>利用亮黄建立了共振光散射测定蛋白质的方法, 用于尿样中蛋白质的测定。上述两种方法在测定前分别需放置 10 和 30 min。本文基于在 Triton X-100 存在下, 蛋白质与达旦黄作用使得体系的共振光散射增强, 增强作用的强弱与蛋白质的含量成正比, 建立了共振光散射测定蛋白质的新方法。将本方法用于合成样品及人血清样品的测定, 简单、快速、稳定。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

FP-6200 型荧光分光光度计(日本分光公司); 722 紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪器厂); pH-S-3C 型数字酸

度计(杭州东星设备仪器厂)。

牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、鸡蛋白白蛋白(Alb)、溶菌酶(Lys)、胰蛋白酶(Try)(Sigma 公司)。将上述溶液配成  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  水溶液, 置于冰箱中, 临用时稀释至所需浓度。Walpole 缓冲溶液(pH 0.65~5.3)。达旦黄(Titan yellow, TY)(天津市兴华化学试剂厂); 配置成 0.1% ( $\rho$ ) 水溶液。曲通 X-100(Triton X-100)(上海试剂一厂): 0.2% ( $\rho$ ) 水溶液。考马斯亮蓝 G-250(CBB G-250 试剂, Fluka 公司): 称取 100 mg 溶于 50 mL 50% 的乙醇, 再加 85% ( $\rho$ ) 正磷酸 100 mL, 定容至 1000 mL。其他试剂均为分析纯以上。配制溶液均使用去离子水。人血清试样由河南师范大学医院提供。

### 1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中依次加入 0.3 mL 0.1% 达旦黄溶液, 1.0 mL pH 1.24 的 Walpole 缓冲溶液, 1.0 mL 0.2% Triton X-100 溶液, 一定量的蛋白质溶液, 加水定容, 摇匀。定量测定时固定  $\lambda_{\text{ex}}=\lambda_{\text{em}}=492\text{ nm}$ , 测定体系散射光强度  $I_{\text{RLS}}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 光谱特征

按实验方法在 FP-6200 荧光分光光度计上对各溶液同步扫描得体系的共振光散射光谱, 结果如图 1 所示。体系在 363, 406 和 492 nm 处有 3 个散射峰, 选择灵敏度最高的 492 nm 作为定量分析的波长。Triton X-100 的加入对空白溶液的散射强度几乎没有影响, 但显著提高了测定体系的散射强度。散射强度的提高随 BSA 浓度的增大而增强。

收稿日期: 2003-12-06, 修订日期: 2004-03-18

基金项目: 河南省自然科学基金(0211020200)资助项目

作者简介: 冯素玲, 女, 1963 年生, 河南师范大学化学与环境科学学院副教授

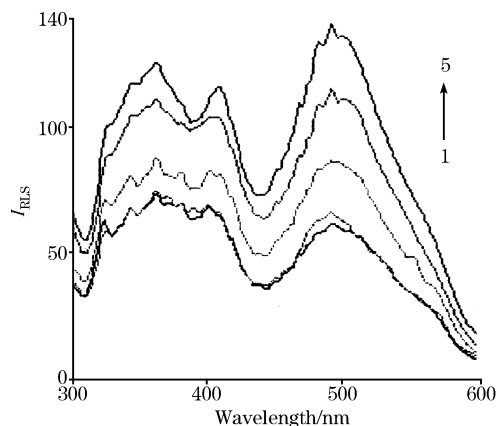


Fig. 1 Resonance light scattering spectra

- 1, Titan yellow(TY)+Walpole;
- 2, TY+Walpole+Triton X-100;
- 3, TY+Walpole+bovine serum albumin(BSA)( $0.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ );
- 4, TY+Walpole+Triton X-100+BSA( $0.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ );
- 5, TY+Walpole+Triton X-100+BSA( $0.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

## 2.2 酸度的影响

实验了 pH 在 0.6~5.3 范围内 492 nm 波长处的共振光散射强度的变化,体系 pH 在 1.09~1.71 之间相对散射强度保持稳定,实验选用 pH 1.24 的 Walpole 缓冲溶液控制溶液的酸度。蛋白质的最佳反应 pH 1.24 小于等电点 pI 4.8~4.9,因为共振光散射的产生主要是由于在酸性条件下蛋白质以阳离子存在,同以阴离子存在的光散射探针试剂依靠静电引力生成超分子结合物,导致强烈的 RLS 效应。当缓冲溶液用量大于 0.8 mL 时,体系的  $\Delta I_{\text{RLS}}$  达到最大且保持不变,实验选用 1.0 mL pH 1.24 的 Walpole 缓冲溶液。

## 2.3 达旦黄用量的影响

考察了达旦黄用量在 0.1~0.5 mL 之间对体系  $\Delta I_{\text{RLS}}$  的影响,当达旦黄的用量在 0.2~0.4 mL 时,体系的  $\Delta I_{\text{RLS}}$  值达到最大且保持不变,实验选用 0.3 mL 0.1% 的达旦黄。

## 2.4 表面活性剂的影响

实验了溴化十六烷基三甲基铵(CTMAB)、氯化十六烷基二甲基苄基铵(Zeph)、聚乙二醇 8000、吐温 80、曲通 X-100、十二烷基磺酸钠(SLS)及十二烷基苯磺酸钠(SDBS)对达旦黄-BSA 体系的增敏作用。SLS 和曲通 X-100 对体系的增敏效果较好,但用 SLS 时线性关系不好,因此选用 0.2% 的 Triton X-100 溶液做增敏剂。研究了 Triton X-100 用量对体系  $\Delta I_{\text{RLS}}$  的影响, Triton X-100 用量超过 0.9 mL 时,体系的  $\Delta I_{\text{RLS}}$  达到最大且保持稳定。实验选用 1.0 mL 0.2% Triton X-100。

## 2.5 离子强度的影响

共振光散射的产生主要是以阳离子存在的蛋白质同以阴离子存在的光散射探针试剂达旦黄依靠静电引力生成超分子结合物,导致强烈的 RLS 效应。因此离子强度对体系的光散射强度有较大的影响。讨论了离子强度对体系的共振光散射强度的影响,当 NaCl 浓度高于  $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,  $\Delta I_{\text{RLS}}$  降

低,可能是由于离子强度较大时不利于蛋白质与达旦黄生成超分子结合物,使体系的  $\Delta I_{\text{RLS}}$  减小。

## 2.6 反应时间和稳定性

反应在室温下立即完成,无需放置即可测定,散射强度至少在 30 min 内稳定不变。

## 2.7 共存物质的影响

在选定的实验条件下,研究了 20 多种氨基酸、常见金属离子及葡萄糖等物质对测定的影响,若允许  $\Delta I_{\text{RLS}}$  值的变化率为  $\pm 5\%$ ,当 BSA 的浓度为  $0.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,共存离子的干扰情况列于表 1。

Table 1 Influence of foreign substances

共存物	倍率	$\Delta I_{\text{RLS}}$ 变化率/%	共存物	倍率	$\Delta I_{\text{RLS}}$ 变化率/%
$\text{K}^+$	841	+3.8	$\text{Bi}^{3+}$	0.5	+4.3
$\text{Ca}^{2+}$	50	+3.5	葡萄糖	250	+4.1
$\text{Fe}^{3+}$	8.3	+6.3	脲	16.7	+4.5
$\text{Mg}^{2+}$	204	+3.3	酪氨酸	50	+5.6
$\text{Al}^{3+}$	90	+5.5	天冬氨酸	2 000	+5.2
$\text{Cu}^{2+}$	500	+5.6	甘氨酸	100	-2.8
$\text{Zn}^{2+}$	398	+3.6	苏氨酸	400	+5.1
$\text{Mn}^{2+}$	205	+3.2	半胱氨酸	500	+4.0
$\text{Co}^{2+}$	500	+3.9	脯氨酸	250	+2.4
$\text{Se}^{4+}$	50	+3.5	色氨酸	50	+5.3
$\text{Cd}^{2+}$	50	+3.5	蛋氨酸	250	+2.7
$\text{Ni}^{2+}$	50	+4.1	丝氨酸	250	+2.4
$\text{Hg}^{2+}$	500	+2.6	精氨酸	25	+4.5
$\text{Pb}^{2+}$	16.7	+3.3			

## 2.8 标准曲线

按实验方法分别以牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、鸡蛋白白蛋白(Alb)、溶菌酶(Lys)和胰蛋白酶(Try)绘制标准曲线,回归方程见表 2。

Table 2 Regression equation for proteins( $n=6$ )

蛋白质	线性范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回归方程/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	检测限/ $3\sigma$ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	相关系数 $\gamma$
BSA	0.03~0.9	$\Delta I=76.14c+0.55$	0.017 7	0.999 0
HSA	0.03~1.0	$\Delta I=76.64c+0.59$	0.017 6	0.999 4
Alb	0.04~0.8	$\Delta I=53.22c+0.15$	0.025 4	0.999 4
Lys	0.04~1.0	$\Delta I=61.46c+0.47$	0.022 0	0.999 3
Try	0.8~20	$\Delta I=2.894c+0.18$	0.475	0.999 5

## 2.9 样品分析

### 2.9.1 合成样品中蛋白质的测定

按实验方法对合成样品中蛋白质总量进行测定,结果见表 3。

### 2.9.2 人血清中总蛋白质的测定

以人血清白蛋白作为标准溶液测定人血清中总蛋白质的含量,并同考马斯亮蓝标准方法比较,结果见表 4。

**Table 3 The results of determination of proteins in synthetic samples( $n=6$ )**

样品	主要共存物/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	加入量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	回收率/%
1	Cysteine20+Aspartic40+Arginine20+ $\text{Fe}^{3+}$ 5+ $\text{Cu}^{2+}$ 50	BSA 5.0	4.897	4.1	97.9
2	Cysteine40+Glycine40+Threonine40+ $\text{Al}^{3+}$ 54+ $\text{Fe}^{3+}$ 5	HSA 5.0	5.139	3.1	103
3*	Methionine50+Serine50+Tryptophan50+Proline50+Tyrosine50	BSA2.5+HSA2.5	5.050	1.8	101

\* 测定 BSA 和 HSA 的混合物用 BSA 作标准溶液绘制工作曲线

**Table 4 The results of determination of proteins in human serum ( $n=6$ )**

样品	本法结果/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	考马斯亮蓝法/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$t^*$
1	92.66	3.7	93.90	0.886
2	86.89	2.3	87.90	1.24
3	98.56	1.7	100.1	2.32
4	97.11	4.3	95.28	1.08

\*  $t_{0.05,5}=2.78$

## 参 考 文 献

- [1] FENG Ning-chuan, HE Su-ping, ZHANG Juan, LIU Jian-ping(冯宁川, 何苏萍, 张娟, 刘建平). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2004, 24(2): 194.
- [2] Guo Z, Hao Y, Cong X, Shen H. Anal. Chim. Acta, 2000, 403: 225.
- [3] Li D, Yang H, Zheng H, Fang Ying, Zhu Q, Xu J. Anal. Chim. Acta, 1999, 401: 185.
- [4] Perez-Ruiz, Tomas. Analyst, 2000, 125: 507.
- [5] Huang C, Li Y, Feng P. Anal. Chim. Acta, 2001, 443: 73.
- [6] Li Y, Huang C, Li M. Anal. Sci., 2002, 18: 177.
- [7] Yang C, Li Y, Huang C. Anal. Lett., 2002, 35: 1945.
- [8] Jia R, Dong L, Li Q, Chen X, Hu Z. Talanta, 2002, 57: 693.
- [9] LI Shu-wei, LI Na, ZHAO Feng-lin, LI Ke-an(李树伟, 李娜, 赵凤林, 李克安). Spectroscopy and Spectral Analysis, 2002, 22(4): 619.
- [10] Liu S, Yang R, Liu Q. Anal. Sci., 2001, 17: 243.
- [11] FENG Ning-chuan, GONG Guo-quan(冯宁川, 龚国权). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 2002, 30: 425.

## Microdetermination of Proteins with Titan Yellow by the Resonance Light Scattering Method

FENG Su-ling, WANG Jin, FAN Jing

College of Chemistry and Environmental Science, Key Laboratory of Environmental Science and Engineering of Henan Education Department, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China

**Abstract** A resonance light scattering method for the determination of trace proteins was developed. In the presence of Triton X-100, proteins reacted with Titan yellow to form a combination product, resulting a significant enhancement of resonance light scattering(RLS). The  $\Delta I_{\text{RLS}}$  was directly proportional to the concentration of protein in the range of 0.03-0.9  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , with the detection limit 17.7  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  for BSA. This method was applied to the determination of the proteins in synthetic and human serum samples, and compared to the CBB method, with satisfactory results.

**Keywords** Resonance light scattering; Proteins; Titan yellow; Triton X-100

(Received Dec. 6, 2003; accepted Mar. 18, 2004)