

茜素黄 R 与蛋白质相互作用的线性扫描极谱法研究及分析应用

王学亮 焦 奎* 孙 伟

(青岛科技大学化学与分子工程学院, 青岛 266042)

摘 要 :以电化学方法研究了在 pH 3.2 的 Britton-Robinson(B-R)缓冲溶液中茜素黄 R 与蛋白质的相互作用。茜素黄 R 在 $-0.43 \text{ V} (vs. \text{SCE})$ 有一个良好的极谱还原峰 ,加入人血清白蛋白(HSA)后 ,其峰电位不变而峰电流下降 ,利用峰电流的下降可以测定蛋白质。优化了结合反应条件和电化学测定条件 ,在最佳条件下 ,峰电流降低值同 HSA 的质量浓度在 $4.0 \sim 40.0 \text{ mg/L}$ 范围内呈线性关系 ,其线性方程为 $\Delta I_p (\text{nA}) = -5.48 + 72.28 c (\text{mg/L})$, $r = 0.993$ 。将该方法应用于人血清样品的测定 ,结果与经典的考马斯亮蓝 G-250 光度法一致 ,回收率在 $97\% \sim 103\%$ 之间。此方法还可应用于牛血清白蛋白、牛血红蛋白、卵清白蛋白等蛋白质的测定。

关键词 :血清白蛋白 ;茜素黄 R ;伏安法 ;相互作用

中图分类号 :O657.1 文献标识码 :A 文章编号 :1000-0720(2004)08-0005-04

蛋白质是生命物质的基础 ,其性质与营养、新陈代谢、免疫等生理功能密切相关 ,因此蛋白质定量分析在生命科学中具有重要意义。近年来 ,该领域引起了广泛关注。蛋白质与有机染料小分子、金属离子、药物小分子等相互作用的研究已有不少报道 ,多采用光度法^[1~4] ,而利用电化学法研究有机小分子与蛋白质相互作用及其分析应用的报道相对较少^[5~7]。本文用电化学方法研究了蛋白质与茜素黄 R(AYR)在酸性条件下的相互作用。茜素黄 R 在滴汞电极上有一个良好的还原峰 ,加入人血清白蛋白(HSA)后两者相互作用形成超分子复合物 ,使茜素黄 R 还原峰电流降低 ,峰电流降低值同 HSA 的浓度呈线性关系 ,建立了一种测定蛋白质的方法。在最佳条件下 ,测定了人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛血红蛋白、卵清白蛋白等蛋白质的工作曲线 ,已应用于人血清样品中的蛋白质的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

JP-303 型极谱分析仪(成都仪器厂) ,三电极系统 :滴汞电极为工作电极 ,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极 ,铂丝电极为对电极 ;Cary 50 型紫外-可见分光光度计(澳大利亚 Varian 公司)。

人血清白蛋白(HSA) ,牛血清白蛋白(BSA) ,卵清白蛋白(OVA) ,脂肪酶(Lipase)均为 Sigma 公司产品 ;牛血红蛋白(BHb ,天津市川叶生化制品有限公司) ;蛋白质标准溶液均为水溶液 , 4°C 冰箱保存。

茜素黄 R(AYR) ,上海化学试剂厂产品 , $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; 0.2 mol/L Britton-Robinson(B-R)系列缓冲溶液 ;考马斯亮蓝 G-250 ,上海化学试剂站分装厂进口分装 ;正常人血清样品由青岛科技大学医院提供。所用试剂均为分析纯 ,二次石英蒸馏水配制。

1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中 ,依次加入 pH 3.2 的 B-R

* 收稿日期 2003-10-14 ,修订日期 2004-01-02

基金项目 :国家自然科学基金(20075013)资助项目

作者简介 :王学亮(1977 -) ,男 ,硕士研究生

万方数据

缓冲溶液 2.0 mL 1.0×10^{-5} mol/L 的茜素黄 R 1.0 mL 和不同浓度的 HSA 溶液,用水稀释到刻度;以不加 HSA 的相应溶液作参比,用线性扫描二阶导数极谱法测定其峰电流值 I_p'' 并计算电流变化值 $\Delta I_p''$ 。

2 结果与讨论

2.1 结合反应体系的线性扫描二阶导数伏安曲线

在 pH 3.2 的 B-R 溶液中,AYR 在 -0.43 V 有一个灵敏的线性扫描二次导数还原峰(图 1 曲线 2),当加入 HSA 后,AYR 的还原峰电位不变而还原峰电流明显下降(图 1 曲线 3),这是由于 HSA 与 AYR 结合生成了一种超分子复合物,降低了溶液中 AYR 的游离质量浓度,相应的其还原峰电流下降,峰电流的降低值同 HSA 的质量浓度在一定范围内有线性关系,可用于 HSA 的测定。

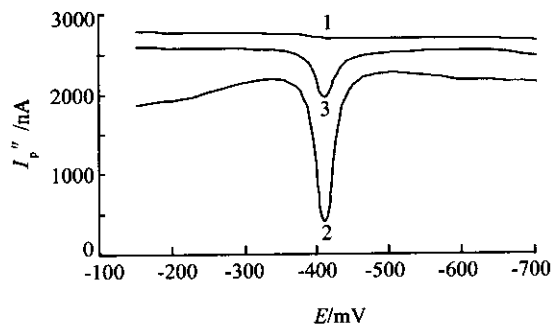


图 1 结合反应体系的线性扫描二阶导数极谱图

Fig. 1 Secondary derivative linear sweep polarograms of AYR-HSA reaction system

1 - pH 3.2 B-R 缓冲溶液; 2 - 1 + 1.0×10^{-5} mol/L AYR;
3 - 2 + 20.0 mg/L HSA 扫描: 800 mV/s

2.2 结合反应体系的紫外-可见吸收光谱

图 2 为结合反应体系在 300 ~ 600 nm 范围的紫外-可见吸收光谱图。在 pH 3.2 的 B-R 缓冲溶液中, HSA 没有吸收峰, 茜素黄 R 的最大吸收波长为 370 nm, 两者混合后, 茜素黄 R 的最大吸收波长发生红移, 而且吸光度逐渐增大, HSA 质量浓度越大, 吸光度增大越多, 表明两者之间有很强的相互作用形成一种超分子复合物。

2.3 结合反应条件的选择

2.3.1 酸度的选择 缓冲溶液的 pH 对结合反应体系有较大的影响。实验考察了线性扫描二阶导数极谱还原峰电流降低值 ($\Delta I_p''$) 与 pH 变化的关系, 结果表明, 在 pH 3.2 时, $\Delta I_p''$ 达到最大值且茜

素黄 R 还原峰峰形较好, 因此选择结合反应的最佳 pH 3.2。

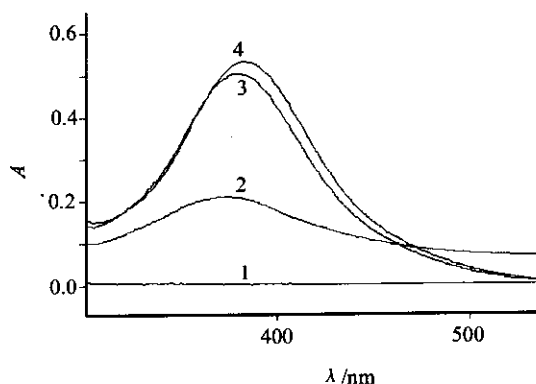


图 2 结合反应体系的紫外-可见光谱图

Fig. 2 UV-Vis absorption spectra of AYR-HSA reaction system

1 - pH 3.2 B-R 缓冲溶液 + 50.0 mg/L HSA 2 - pH 3.2 B-R 缓冲溶液 + 2.0×10^{-5} mol/L AYR 3 - 2 + 50.0 mg/L HSA 4 - 2 + 100.0 mg/L HSA

2.3.2 茜素黄 R 浓度的影响 在 pH 3.2 的 B-R 缓冲溶液条件下, 固定 HSA 的质量浓度为 10.0 mg/L, 考察了茜素黄 R 浓度对结合反应的影响, 随着茜素黄 R 溶液浓度的增大, $\Delta I_p''$ 值逐渐增大, 当茜素黄 R 溶液浓度为 1.0×10^{-5} mol/L 时, $\Delta I_p''$ 最大且稳定, 继续增大茜素黄 R 溶液浓度, $\Delta I_p''$ 值减小。因此选择茜素黄 R 的浓度为 1.0×10^{-5} mol/L。

2.3.3 反应时间和温度的影响 茜素黄 R 和蛋白质的结合反应在 10 min 内达到稳定, 且在 40 min 内没有大的变化。考察了温度对体系的影响, 在 15 ~ 30 °C 的范围内, 体系随着温度的升高 $\Delta I_p''$ 变化增大, 结合增强, 30 °C 之后减弱, 40 ~ 60 °C 的范围内, 体系趋于稳定, 所以选择 30 °C 为反应温度。

2.3.4 共存物质的影响 考察了柠檬酸、葡萄糖、氨基酸及 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 等 17 种物质对 20.0 mg/L HSA 测定的影响, 结果如表 1 所示。该体系对 HSA 的测定具有较好的选择性。在所试验的共存物质浓度下, 对 HSA 作 3 次平行测定, 所产生的相对误差均 < 5%。这些共存物质对体系没有大的影响, 所以本方法能够直接用于人血清样品中蛋白质的测定。

2.3.5 仪器条件的选择 对仪器的扫描速度 v 和

滴汞静止时间进行了考察,随着扫速的增加, I_p 值增大,当扫速在 800 mV/s 时,峰形较好,峰电流降低值 ΔI_p 达到最大,实验以 800 mV/s 作为电位扫

描速度,静止时间在 15 s 时,峰电流降低值 ΔI_p 达到最大,因此以 15 s 作为静止时间。

表 1 共存物质对 20.0 mg/L HSA 测定的影响

Tab. 1 Effect of coexisting substances on the determination of 20.0 mg/L HSA

共存物质	质量浓度 ρ (mg/L)	相对误差 / %	共存物质	浓度 c (mmol/L)	相对误差 / %
L-谷氨酸	50.0	- 5.3	Mn ²⁺	20.0	- 1.6
L-精氨酸	50.0	- 0.5	Ca ²⁺	20.0	- 3.2
L-色氨酸	50.0	2.9	Co ²⁺	20.0	- 0.9
L-亮氨酸	50.0	- 0.85	Cu ²⁺	20.0	- 1.2
L-丝氨酸	50.0	0.70	Ba ²⁺	0.20	- 1.1
L-谷酰胺	50.0	- 2.7	Pb ²⁺	0.020	- 0.56
L-酪氨酸	25.0	1.3	Fe ³⁺	0.20	0.85
柠檬酸	2.0	2.1	Ni ²⁺	20.0	- 1.7
葡萄糖	500.0	3.7			

2.3.6 NaCl 及乙醇的影响 NaCl 对体系有很强的干扰,在溶液中 NaCl 的浓度大于 0.2 mol/L 时,随着 NaCl 的量的加大,干扰加强,其原因可能是 Cl⁻ 对蛋白质分子结合部位(正电荷)的竞争结合作用加大,从而减弱了茜素黄 R 与蛋白质分子的结合作用,导致体系 ΔI_p 下降。乙醇对体系也有着很强的干扰,在 10 mL 溶液中乙醇的加入量大于 2 mL 时,随着乙醇的加入量增大,导致蛋白质变性,使茜素黄 R 与蛋白质分子的结合作用减弱, ΔI_p 下降。

2.3.7 表面活性剂的影响 考察了 β -环糊精(β -CD)、明胶、十二烷基硫酸钠(SDS)、四丁基氯化铵等表面活性剂对体系的影响。发现除阴阳离子表

面活性剂使体系 ΔI_p 下降外,当加入少量其它表面活性剂时, ΔI_p 没有大的改变,此结果进一步表明 AYR 与 HSA 之间主要靠静电力结合,阴阳离子表面活性剂削弱了 AYR 与 HSA 之间的静电力作用。

2.4 测定不同蛋白质的工作曲线

在最佳条件下,分别测定了人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛血红蛋白、卵清白蛋白、脂肪酶等多种蛋白质工作曲线,如表 2 所示。由表可见本体系对不同的蛋白质均有较好的响应,可用于多种蛋白质总量的检测。对 20.0 mg/L 的 HSA 进行了 11 次平行测定, RSD 为 4.2%。

表 2 测定不同蛋白质工作曲线

Tab. 2 Working curves for determination of different proteins

蛋白质	线性范围 ρ (mg/L)	回归方程	检出限 ρ (mg/L)	相关系数 (r)
HSA	4.0 ~ 40.0	ΔI_p (nA) = - 5.48 + 72.28 ρ (mg/L)	3.0	0.993
BSA	6.0 ~ 30.0	ΔI_p (nA) = 268.21 + 77.27 ρ (mg/L)	5.0	0.993
BHb	3.0 ~ 30.0	ΔI_p (nA) = 3152.80 + 58.63 ρ (mg/L)	2.0	0.992
OVA	10.0 ~ 100.0	ΔI_p (nA) = 1798.30 + 14.09 ρ (mg/L)	9.0	0.996
脂肪酶	8.0 ~ 40.0	ΔI_p (nA) = - 178.77 + 57.39 ρ (mg/L)	7.0	0.993

2.5 样品分析

移取 0.1 mL 健康人血清样品于 10 mL 比色管中定容。在最佳条件下,对稀释后的人血清样品中的白蛋白进行了定量分析,并与考马斯亮蓝 G-250 (CBB G-250)光度法作了对比,结果如表 3 所示。可见用本方法测得的结果与用 CBBG-250 法测得的结果基本一致。回收率实验结果如表 4 所示,回收率在 97% ~ 103% 之间,表明本方法具有较高的回收率。

表 3 人血清样品中白蛋白的测定

Tab.3 Results for determination of HSA in human serum samples

样品	本方法 $\rho(\text{g/L})$ ($n=3$)	RSD/%	CBB G-250 光度法 $\rho(\text{g/L})$	RSD/% ($n=3$)
1	84.18	2.23	83.07	4.2
2	87.85	4.67	87.16	2.1
3	90.47	2.07	91.12	0.3
4	84.65	5.87	88.40	1.6

表 4 测定 HSA 的回收率

Tab.4 Determination results for recovery test

样品	加入量 $\rho(\text{g/L})$	检测量 $\rho(\text{g/L})$	回收率 /%	RSD/% ($n=3$)
1	20.0	20.2	101.0	1.3
2	20.0	19.4	97.0	3.6
3	20.0	20.6	103.0	0.17
4	20.0	20.3	101.5	2.1

参考文献

[1] Bradford M M. Anal Biochem ,1976 ,72 :248
[2] 马卫兴,钱保华,杨绪杰等. 化学世界 2003 ,7 :356
[3] 胡庆红,刘绍璞,范莉. 分析化学 2002 ,30(1) :42

[4] 冯宁川,龚国权. 分析化学 2002 ,30(4) :425
[5] 孙伟,焦奎,刘晓云. 分析化学 2002 ,30(3) :312
[6] Sun Wei, Jiao Kui. Talanta 2002 ,56 :1073
[7] 韩英强,罗登柏,蓝金贵等. 分析科学学报 2003 ,19(2) :113

Linear sweep polarographic studies on the interaction of alizarin yellow R with proteins and its analytical application WANG Xue-liang , JIAO Kui and SUN Wei(College of Chemistry and Molecular Engineering , Qingdao University of Science and Technology , Qingdao 266042) , Fenxi Shiyanshi 2004 ,23(8) 5 ~ 8

Abstract : The interaction between alizarin yellow R (AYR) and proteins in Britton-Robinson (B-R) buffer solution was studied with electrochemical method . In pH 3.2 B-R buffer solution , AYR showed a sensitive secondary derivative linear sweep polarographic reduction peak at -0.43 V (vs . SCE) at a hanging mercury drop electrode . After human serum albumin (HSA) was added to the AYR solution , the reduction peak current of AYR decreased without shift of the peak potential . Under the optimal conditions , the reduction peak current of AYR decreased linearly with HSA concentration in the range of $4.0 \sim 40.0 \text{ mg/L}$ with the regression equation of $\Delta I_p(\text{nA}) = 5.48 - 72.28 \alpha(\text{mg/L})$ ($r = 0.993$) . The proposed method was applied to determine the content of HSA in blood samples and the results were in good accordance with the traditional Coomassie brilliant blue G-250 spectrophotometric assay . This method was also applied to the determination of bovine serum albumin , bovine hemoglobin , egg albumin with satisfactory results .

Keywords Serum albumin ; Alizarin yellow R ; Voltammetry ; Binding interaction