

蛋白质-钼(Ⅵ)-邻苯二酚紫-OP 显色体系的研究及应用

肖国荣¹, 黄选忠^{*2}

(1. 湖北兴山县医疗中心, 兴山 443700; 2. 湖北兴山县预防保健中心, 兴山 443700)

摘要: 建立了一种测定蛋白质的蛋白质-钼(Ⅵ)-PV-OP 显色体系光度法, 蛋白质含量在 0~50.0 μg/mL 范围内符合比尔定律。方法已应用于尿液、血清和豆浆中总蛋白测定, 加标回收率 90%~108%, 相对标准偏差 1.8%~3.0% (n=5), 检出限 4.0 μg/mL。

关键词: 蛋白质; 显色体系; 分光光度法

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1000-0720(2001)03-0063-03

蛋白质的定量分析在生物学、医学及营养科学等领域中具有重要意义。通常蛋白质的测定方法有凯氏定氮法和双缩脲法, 前一方法是先将样品中蛋白质消化后测定其含氮量进而推算出蛋白质含量, 操作繁杂费时, 而后一方法的选择性差且灵敏度低, 不宜作低含量分析, 因此寻求一快速测定蛋白质的方法具有重要意义。本研究发现在弱酸性条件下, 当有乳化剂 OP(以下简称 OP)存在时, 蛋白质可与钼(Ⅵ)-邻苯二酚紫(PV)体系形成一蓝色配合物, 该配合物的最大吸收波长(λ_{max})位于 675 nm, 且其吸光度与蛋白质含量在一定范围内呈良好的线性关系, 据此建立了一种测定蛋白质的新方法。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

7520 紫外/可见分光光度计(上海分析仪器厂), 721 分光光度计(四川分析仪器厂)。

总蛋白及白蛋白标准溶液(北京精细化工厂): 70.0 mg/mL 和 50.0 mg/mL, 用前用纯水稀释成 500 μg/mL 的应用液; PV 溶液: 2.0 mmol/L; 钼(Ⅵ)溶液: 1.0 mg/mL; OP 溶液: 5%; 邻苯二甲酸氢钾/盐酸缓冲溶液:pH 2.8; 混合显色剂: 将 PV、钼(Ⅵ)、OP 溶液及缓冲液按 5+15+50+75 mL

混合并稀释至 225 mL; 尿液空白对照溶液: 按尿液正常成份^[1]配成含有下列物质(g/L)的溶液: Cl⁻ (13)、Na⁺ (9.0)、HPO₄²⁻ (2.0)、SO₄²⁻ (2.0)、NH₄⁺ (0.93)、尿素 (200) 和肌酐 (1.4)。

实验用水为去离子水, 试剂为分析纯以上。

1.2 实验方法

1.2.1 工作曲线的绘制 取蛋白质标准溶液 0、50.0、100.0、150.0、200.0 和 250.0 μg 于 10 mL 比色管中并补充纯水至 0.50 mL, 然后各管加入混合显色剂 4.50 mL 混匀, 室温放置 20 min, 用 1 cm 比色皿以试剂空白为参比于 675 nm 测量吸光度并绘制工作曲线。

1.2.2 样品分析 取稀释 20 倍的质控血清 50 μL, 澄清尿样 50~200 μL(尿蛋白定性呈 1~2 个加号取 200~100 μL, 3 个加号以上取 100~50 μL)、新鲜豆浆 10 μL 及尿液空白对照液 0.10~0.20 mL 于 10 mL 比色管中并补充纯水至 0.50 mL, 以下按新实验方法操作并以尿液空白对照液(豆浆用试剂空白)为参比测量吸光度, 用工作曲线法进行蛋白定量。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

蛋白质-Mo(Ⅵ)-PV-OP 体系及相应试剂空

收稿日期: 2000-08-22; 修订日期: 2000-11-28

作者简介: 肖国荣(1962—), 男, 副主任检验技师

白的 λ_{\max} 分别位于 675 nm 和 575 nm, $\Delta\lambda = 100$ nm, 见图 1。

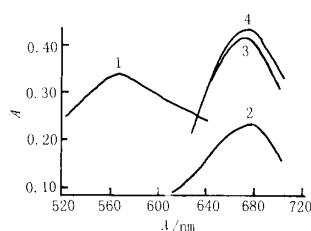


图 1 吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra

1—试剂空白(水为参比);2—蛋白质体系(1为参比);3—CTMAB 体系(1为参比);4—CPB 体系(1为参比)

2.2 酸度的影响及缓冲液用量

实验表明, 蛋白质-Mo(VI)-PV-OP 体系在 pH 1~6 范围内均可发生显色反应形成蓝色配合物, 但 pH 值在 2.2~3.6 范围内体系有最大且稳定的吸光度, 本法选用 pH 2.8 的邻苯二甲酸氢钾/盐酸缓冲液进行实验。缓冲液用量在 1.0~2.0 mL 体系有最大且稳定的吸光度, 实验选用 1.5 mL。

2.3 PV 及 Mo(VI) 溶液的用量

实验表明, 体系中 PV 及 Mo(VI) 的浓度太高, 试剂空白的吸光度太大而不易于比色测定, 而太低则测量的线性范围偏窄, 本实验 PV 的浓度选定为 4.0×10^{-2} mmol/L, 在此条件下 Mo(VI) 的用量在 100 μ g 以上体系有较大且稳定的吸光度, 但 Mo(VI) 用量偏低时方法的选择性稍差, 故 Mo(VI) 的用量选定为 300 μ g。

2.4 OP 的影响及用量

实验表明, 蛋白质-Mo(VI)-PV 配合物难溶于水而沉淀, 但经 OP 增溶后, 该配合物可溶于水而成为均匀透明的溶液, 5% OP 水溶液用量在 0.50~1.50 mL 时体系有最大且稳定的吸光度, 实验选用 1.0 mL。

2.5 试剂混合加入试验

将 PV、Mo(VI)、OP 溶液及缓冲液混合后一次性加入对显色结果无影响且大大节省了操作时间。

间提高了工作效率。

2.6 显色机理讨论

实验发现, Mo(VI)-PV 体系也可与溴化十六烷基三甲基铵(CTMAB)、溴化十六烷基吡啶(CPB)等阳离子表面活性剂形成蓝色配合物, 且最大吸收波长(λ_{\max})均位于 675 nm(见图 1 中曲线 3、4), 这与蛋白质显色体系的 λ_{\max} 一致, 据此认为在蛋白质-Mo(VI)-PV-OP 显色体系中, 蛋白质分子与 CTMAB、CPB 等阳离子表面活性剂具有相似的作用, 即在 pH 2.8 的酸性介质中, 蛋白质分子可解离成阳离子^[2], 该阳离子与 Mo(VI)-PV 分子中的阴离子基因相互吸引进而形成离子缔合物。

2.7 线性范围及体系的稳定性

在本试验条件下, 总蛋白和白蛋白均在 0~250.0 μ g/5.0 mL 范围内符合比尔定律, 其工作曲线的回归方程分别为: $A = 1.510 \times 10^{-3}c$ (TP, μ g) $- 0.0195, \gamma = 0.9998$; $A = 1.300 \times 10^{-3}c$ (A, μ g) $- 0.0420, \gamma = 0.9991$ 。若以 $A = 0.01$ 计, 本法最低检出量为 20 μ g 总蛋白, 其检出限为 4.0 μ g/mL, 在室温下体系的吸光度在 15~25 min 即达最大值且至少可稳定 1 h。

2.8 共存物质的影响

当体系中含有 150 μ g 蛋白质时, 允许误差在 $\pm 6\%$ 范围内, 下述物质(以 mg 计)不干扰: NaCl、尿素(2.0)、NH₄Cl(1.0)、肌酐、葡萄糖、乳糖、半胱氨酸、丙氨酸、HPO₄²⁻(0.2)、胱氨酸、甘油三酯、胆固醇、Ca²⁺、HCO₃⁻(0.1)、SCN⁻、SO₄²⁻(0.35)、Se(IV)、Mn²⁺、Ag⁺、Cd²⁺、Ni²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Pb²⁺、Fe²⁺(0.02)。

3 样品分析

按实验方法所述进行样品分析, 并作加标回收试验, 本法对卫生部上海生物制品研究所提供的质控血清(批号 990901)的测定结果与推荐值(双缩法 63.0 \pm 1.75 mg/mL)相吻合, 对 5 份尿蛋白定性呈 1 个加号以上尿样的分析结果为 0.51~1.38 mg/mL, 对 1 份豆浆的测定结果为 20.5 mg/mL, 加标回收率在 90%~108%, 见表 1。

表 1 试样分析及加标回收试验结果($n=5$)

Tab. 1 Determination results of protein samples

样品	测得值 (mg/mL)	RSD (%)	加入量 (μ g)	回收率 (%)
质控血清	62.9	2.2	—	—
尿 1	1.25	1.8	100	99.1
尿 2	1.31	2.3	50	90.0
尿 3	0.75	3.0	150	108.0
尿 4	0.51	—	150	103.0
尿 5	1.38	—	100	96.0
豆浆	20.5	—	—	—

参考文献

- [1] 全国中等卫生学校试用教材. 临床检验. 成都: 四川人民出版社, 1980. 162
- [2] 卫生部护理中心. 生物化学. 北京: 化学工业出版社, 1989. 10

Mo(Ⅵ)-PV-OP system and its analytical application XIAO Guo-rong (Medical Treatment Center of Xingshan County, Hubei, 443700) and HUANG Xuan-zhong (Prevention and Health Protection Center of Xingshan County, Hubei), Fenxi Shiyanshi, 2001, 20(3): 63~65

Abstract: A new spectrophotometric method for determination of protein with a colour reaction of protein-Mo(Ⅵ)-PV-OP system was established. Beer's law is obeyed in the range of 0~50.0 μ g/mL of protein. The method was applied to determine total protein in urine, serum and bean extract, with recovery of 90%~108%, relative standard deviation of 1.8%~3.0% ($n=5$), and the detection limit of 4.0 μ g/mL.

Keywords: Protein; Colour system; Spectrophotometry

Studies on colour reaction of protein-