

几种蛋白质微量测定方法的比较

张世军^① 孙淑斌^② 李思健^①

(^① 枣庄师专生物系, 277160, 山东省枣庄市; ^② 曲阜师大生物系, 273165, 山东省曲阜市)

摘要 报导了以牛血清白蛋白(BSA)为样品,对改良 lowry 法,CBB 法,改良 Boratynski 法、胶体金法、Smith 法等五种微量蛋白质测定方法的灵敏度、稳定性、干扰因素及操作简单程度进行了比较。

关键词 蛋白质测定 灵敏度 稳定性 干扰物

分类号 Q512·

近几年来蛋白质浓度的测定方法不断有新的报导^[1-6],并且均朝着微量快速、操作简单、干扰物少的方向发展。我们有选择性地建立了几种新的微量测定方法,并对它们进行了比较,现介绍如下。

1 材料和方法

牛血清白蛋白(美国 Sigmco 公司)母液浓度为 1mg/mL,使用时按不同要求稀释之。其它试剂为国产分析纯。

1.1 改良 lowry 法^[1] 基本采用[1]的方法,其中 Folin—酚试剂浓度改为 1 mol/L,测光密度值选定的波长为 490nm。

1.2 CBB 法 采用路阳等所报导的方法,其中考马斯亮兰 G—250 浓度为 0.12g/L。

1.3 改良 Boratynski 法^[3] 采用[3]的方法,只是在向样液中加入 BR—TP 试剂时不采用涡旋条件。

1.4 胶体金法^[4] 试剂的配制及反应操作均采用[4]方法。

1.5 Smith 法^[5] 常量法和微量法操作均采用 Smith 方法,所用试剂为国产。

2 结果和讨论

2.1 方法的灵敏范围 以 BSA 为样品对各种不同浓度样液用上测方法进行测定,得出光密度值与 BSA 浓度呈线型关系,结果如表 1,即表示这些方法在该浓度范围内是灵敏的。表 1 表明改良的 Boratynski 法、胶体金法、Smith 法对蛋白质分析达微毫克水平;Smith 法测范围最

宽(从 $0.5\mu\text{g}$ — $2000\mu\text{g}$); 胶体金法最灵敏, 最小测出量为 $20\mu\text{g}$, 比荧光法还灵敏、是一种超微量蛋白质的定量方法。

表 1 测定方法的灵敏度范围

方 法	测定 BSA 的浓度范围($\mu\text{g/mL}$)
改良 Lowry 法	1—150
CBB 法	2—50
改良 Boratynski 法	0.2—8
胶体金法	0.02—0.2
Smith 法	0.5—2000

2.2 方法的稳定性 用上述五种方法, 在其测定的灵敏度范围内对同一样品重复测定五次, 检验其方法的稳定性, 其结果见表 2。从吸光物质的稳定性上看, 胶体金法最好, 在 0.5hr — 8hr 之内测其光密度值, 基本保持不变, 而改良的 Lowry 法较差吸光物质稳定存在的时间只为 30min ; 从吸光物质形成的速度看, CBB 法最快, 5min 反应完全, 即可测其光密度值; 从方法的重复性(稳定性)上看, 改良的 Boratynski 法较好, 变异系数仅为 3.4% , 而胶体金法较差, 为 8.7% , 但该法的灵敏度最高。

表 2 测定方法的稳定性

方 法	测吸光度时间	BSA($\mu\text{g/mL}$)	变异系数(%)
改良 lowry 法	10—40min	50 ± 2.33	4.6
CBB 法	5—60min	10 ± 0.382	3.8
改良 Boratynski 法	40—120min	10 ± 0.067	3.4
胶体金法	30—480min	0.05 ± 0.0044	8.7
Smith 法*	30—120min	20 ± 0.84	4.2

* 常量法

2.3 方法受干扰物的影响 选择了几种有代表性的化合物为干扰物, 做了上述五种方法受干扰因素的影响的试验, 其结果见表 3。结果表明, 对所选的干扰物, 改良的 Boratynski 法影响较大且广泛, 其次为胶体金法, Smith 法受到的干扰较小, 都在 $\pm 10\%$ 以内。另外 CBB 法和改良的 lowry 法受干扰物的影响也大都在 $\pm 10\%$ 之内。对于不同的干扰物质, 各方法又表现出不同的敏感性, 改良 Lowry 法受蔗糖(10%)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.25%)、EDTA、脲干扰较大, 干扰率在 $\pm 10\%$ 以上, 常用的非离子型表面活性剂 Triton X-100 干扰最小, 只有 1.7% , 而常用的阴离子去垢剂 SDS 则没有干扰。CBB 法受 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.15%)、EDTA(4mM)、脲(1M)、KCl(2%)影响较大, 干扰率在 $\pm 10\%$ 之上, 而 Tris 的干扰率较小, 只有 -3.8% 。改良的 Boratynski 法除蔗糖、KCl 两种物质的干扰物在 $\pm 10\%$ 之下, 其余都在 $\pm 10\%$ 之上, 有的甚至

达到 165.5% (0.2M Tris). 胶体金法受到 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、SDS、KCl 的影响较大, 其中 SDS (0.1%) 干扰率达 - 86.6%, 而受 Friton x - 100 干扰较小, 只有 1.0% Smith 法与改良 Boratynski 法和胶体金法相比, 它受 SDS (0.05%) 的干扰率很低, 只有 - 1.6%, 相对来说它受 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.25%)、蔗糖 (10%) 和 Tris (0.2M) 的干扰较大.

表 3 各干扰物因素对各法的影响

干扰物		改良 lowry 法 (BSA50μg/mL)		CBB 法 (BSA10μg/mL)		改良 Boratynski 法 (BSA 2μg/mL)		胶体金法 (BSA200μg/mL)		Smith 法 (BSA 50μg/mL)	
名称	浓度	测定值	干扰率 %	测定值	干扰率 %	测定值	干扰率 %	测定值	干扰率 %	测定值	干扰率 %
蔗糖	5%	45.87	- 8.3	9.19	- 8.1	1.83	- 9.5	179.6	- 10.2	51.6	3.2
	10%	43.26	- 13.48	9.86	- 1.4	1.80	- 10.1	171.8	- 14.1	53.20	6.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.15%	46.87	- 6.3	11.43	14.3	0.53	- 73.5	103.6	- 48.2	48.10	- 3.8
	0.25	44.62	- 10.80	9.46	- 5.4	0.41	- 79.5	92.4	- 53.8	46.20	- 7.6
EDTA	1.5mM	43.51	- 13.0	9.03	- 9.7	3.38	69.0	195.4	- 2.3	49.10	- 1.8
	4mM	38.51	- 23.5	8.94	- 10.6	3.74	87.0	193.8	- 3.1	48.20	- 3.6
SDS	0.05%	/	/	/	/	2.70	35.0	35.7	- 82.2	49.20	1.6
	0.1%	/	/	/	/	3.01	50.5	26.3	- 86.6	48.9	- 2.4
Tris	0.1M	52.65	5.3	10.68	6.8	4.84	142	206.6	3.3	51.10	2.2
	0.2M	45.15	- 9.7	9.62	- 3.8	5.31	165.5	207.1	3.6	46.70	- 6.6
Triton x - 100	0.5%	48.11	- 3.8	9.52	- 4.8	/	/	198.0	- 1.0	50.8	1.6
	1%	50.85	- 1.7	9.38	- 6.2	/	/	197.6	- 1.2	51.2	2.4
脲	0.5M	57.81	15.5	10.57	5.7	2.41	20.5	207.5	3.8	48.80	- 3.6
	1M	56.78	13.56	8.88	- 11.2	1.62	- 19	211.6	5.8	51.20	2.4
KCl	1%	54.77	8.5	10.15	1.5	1.87	- 6.5	142.8	- 28.6	49.20	- 1.6
	2%	53.84	7.7	8.49	- 15.1	1.81	- 9.5	128.7	- 35.8	48.70	- 2.6

2.4 方法操作的简便性和其它

上述五种方法在操作上,CBB 法最简便,只需要一种试剂,并且反应速度较快、约 5min 即反应完全. 改良的 lowry 法虽然灵敏度提高,干扰物质减少,但是 Folin - 酚试剂配制需要较长时间. 胶体金法和 Smith 法试剂的配制也较复杂,前者要求用玻璃三蒸水配制金酸溶液,后者对不同含量的样液则分别配制常量试剂和微量试剂,同时它们对 pH 值都有一定要求. 从试剂的稳定性上看,Smith 法最优越,在混合前都可以长期不需要特殊条件存放,其次是 CBB 法工作试剂可以存放两周,而胶体金法则最差,只能临时配制. 从不同蛋白质的变异性上看胶体金法、Boratynski 法、Smith 法、CBB 法较改良 lowry 法都要高,故用上述方法测定某蛋白质含量时,最好用该蛋白质的标准试样作标准曲线.

总之,上述方法各有特点,当一种方法克服另一种方法缺点时,由于测定方法的系统性,又导致对另一种条件的不适应性,故而主要是要在了解各种方法的特点基础上,根据不同情况,

选用恰当的方法。

参考文献

- 1 薛政国等. 微量蛋白质的快速测定. 生物化学与生物物理进展, 1986, 5: 60~63
- 2 路阳等. 用考马斯亮兰 G—250 迅速、灵敏地测定蛋白质浓度. 生物学杂志, 1992, 45: 24~25
- 3 蔡国辉等. 一种改良的 Ag^+ 和双硫脲测定微量蛋白质的比色方法. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19: 62~65
- 4 刘农乐等. 一种毫微克水平的蛋白质定量方法. 军事医学科学院院刊, 1991, 15: 236~239
- 5 Smith P K et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. Anal Biochem, 1985, 150: 76~85
- 6 Larson E et al. Artificial Reductant Enhancement of the Lowry Method for Protein Determination. Anal Biochem, 1986, 155: 243~248

COMPARISON OF A FEW METHODS OF THE DETERMINATION OF MICRO PROTEIN

Zhang Shijun^① *Sun Shubin*^② *Li Sijian*^①

(^①Department of Biology, Zaozhuang Teachers College, 277160, Zaozhuang, Shandong;

^②Department of Biology, Qufu Normal University, 273165, Qufu, Shandong)

Abstract The paper gives a detailed comparison of five methods to determine micro protein in BSA. They are Lowry Method, CBB Method, Modified Boratynski Method, Colloidal gold staining and Smith Method. The paper compares their sensitive, stability, interfering substances and easiness to operate one by one.

Key words determination of protein sensitivity stability interferent