

## 固绿 FCF 分光光度法测定血清蛋白质

马卫兴<sup>1,2</sup> 钱保华<sup>1,2</sup> 杨绪杰<sup>1</sup> 陆路德<sup>\*1</sup> 汪信<sup>1</sup> 李克安<sup>3</sup>

<sup>1</sup>(南京理工大学材料化学实验室,南京 210094) <sup>2</sup>(淮海工学院化工系,连云港 222005)

<sup>3</sup>(北京大学化学与分子工程学院,北京 100871)

**摘要** 在 pH 1.4 的 Clark-Lubs 缓冲介质中,固绿 FCF 与血清蛋白质作用在室温下能迅速结合形成复合物,其最大吸收波长为 660 nm,比固绿 FCF 本身红移了 36 nm。用分光光度法研究了该结合反应的最佳条件,并在此基础上建立了测定蛋白质的新方法。在 660 nm 处各蛋白质浓度至少在 5 ~ 70 mg/L 的范围内与吸光度成正比,对测定牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)及球蛋白(IgG)的表观摩尔吸光系数  $\epsilon_{660}$  和桑德尔灵敏度  $s$  分别为  $7.87 \times 10^5$ 、 $9.52 \times 10^5$ 、 $1.60 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  和 0.083、0.072、0.093  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。除阴、阳离子表面活性剂外,其余大部分物质不干扰蛋白质的测定。所拟方法具有简便、快速、选择性好、灵敏度高等特点,应用于尿液、人血清及含乳饮料中总蛋白的测定,结果与考马斯亮蓝 G250 法基本一致。

**关键词** 固绿 FCF,分光光度法,蛋白质

### 1 引言

蛋白质最基本的作用是参与生命的新陈代谢、自我复制、高等动物的免疫反应和记忆活动等,因此,蛋白质的定量分析是生命科学和临床医学及食品营养学中的重要课题,也是一个广阔的研究领域<sup>1</sup>。目前已有不少方法用于蛋白质的测定,如直接紫外光度法<sup>2</sup>、荧光法<sup>3</sup>、共振瑞利散射法<sup>4</sup>、化学发光法<sup>5</sup>、电化学法<sup>6</sup>和光度法<sup>7~11</sup>等,其中因光度法简单、快速、重现性好等优点而受到人们关注。常用的光度法<sup>7~11</sup>在反应时间、选择性、灵敏性及重现性等方面各有优缺点。固绿 FCF(fast green FCF,分子式为  $\text{C}_{37}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_3\text{Na}_2$ )是一种生物染色剂,可作为蛋白质的定性标记试剂,但它用于生物大分子蛋白质的定量测定至今未见报道。本研究发现:蛋白质能与固绿 FCF 在酸性介质及室温条件下迅速结合生成绿色复合物,并据此结合反应建立了一个测定蛋白质的高灵敏光度分析新方法。与大多数光度法相比,该方法具有快速、简便、灵敏、选择性好及对多种蛋白质响应一致的优点。所拟方法用于实际人血清、尿液及含乳饮料样品中总蛋白质的测定,所得结果满意。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

UV-754 型紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪器厂);PHS-2 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。牛血清白蛋白(BSA,北京百泰生化技术公司);人血清白蛋白(HSA)与  $\gamma$ -球蛋白(IgG)(美国 Sigma 公司), $\alpha$ -糜蛋白酶(Chy)、溶菌酶(Lyso)、卵蛋白(OVA)、胃蛋白酶(Pep)和胰蛋白酶(Try)(中国医药集团公司上海化学试剂公司)。所有蛋白质标准溶液均为水溶液,质量浓度为 500 mg/L。固绿 FCF(fast green FCF)(上海化学试剂公司进口分装): $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  水溶液。非离子表面活性剂乳化剂 OP、Tween-20,体积分数均为 1%的水溶液;溴化十六烷基三甲基胺(CTMAB)、十二烷基硫酸钠(SDS),浓度均为  $10^{-3} \text{ mol/L}$  的水溶液;Clark-Lubs 缓冲溶液(简写 C-L)<sup>12</sup>。所用试剂均为分析纯,实验用水为二次去离子水。

#### 2.2 实验方法

于 10 mL 比色管中依次准确加入适量 BSA 标准溶液、2 mL  $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  固绿 FCF 溶液和 2 mL pH 1.4 的 C-L 缓冲溶液,以二次去离子水定容,摇匀。以相应的试剂空白为参比,在室温下用 1 cm 比色皿在波长 660 nm 处测量其吸光度  $A$ 。

2002-11-12 收稿;2003-07-19 接受

本文系江苏省教育厅自然科学基金(01KJB150011)和淮海工学院学科基金及淮海工学院自然科学基金资助项目

### 3 结果与讨论

#### 3.1 吸收光谱

固绿 FCF 及其与 BSA 形成的复合物的吸收光谱见图 1。在 pH 1.4 时,试剂固绿 FCF 本身的吸收峰为 624 nm,当加入 BSA 溶液由绿色变为浅绿色,表明固绿 FCF 与 BSA 生成了复合物,该复合物的最大吸收波长为 660 nm,与试剂相比红移了 36 nm。复合物的摩尔吸光系数  $\epsilon_{660}$  为  $7.87 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。在波长 660 nm 处 BSA 的浓度在 5 ~ 70 mg/L 范围内符合比耳定律,据此建立了蛋白质的定量分析方法。

#### 3.2 pH 值对结合反应的影响

溶液的 pH 值是影响 BSA 与固绿 FCF 结合反应的重要因素。考察了不同缓冲体系如 Clark-Lubs 缓冲体系、Britton-Robinson 缓冲体系和 HAc-NaAc 缓冲体系对结合反应的影响,结果发现:在 Clark-Lubs 缓冲体系中,体系灵敏度最高,溶液的 pH 值在 1.0 ~ 1.8 的 C-L 缓冲介质中体系复合物的吸光度最大且无显著变化。可见该体系的酸度影响范围较宽。故实验选择 pH 值为 1.4 的 Clark-Lubs 缓冲溶液来控制体系的 pH。试验了 pH 值为 1.4 的 Clark-Lubs 缓冲溶液用量的影响,其用量在 1.0 mL 以上时体系复合物的吸光度最大且保持不变。因此,本实验选用 2 mL pH 值为 1.4 C-L 缓冲溶液来控制体系酸度。

#### 3.3 固绿 FCF 用量的影响

固定 BSA 的浓度为 50 mg/L,改变试剂固绿 FCF 的用量,考察了固绿 FCF 用量对该结合反应的影响,结果表明:随固绿 FCF 用量的增加,该体系吸光度逐渐增大;当其用量在 0.7 ~ 1.1 mL 以内,体系吸光度基本保持不变;当其用量大于 1.1 mL 时,因固绿 FCF 是钠盐而使体系 pH 值高于 1.8,从而使体系吸光度下降。故实验选择 1 mL  $5 \times 10^{-4}$  mol/L 固绿 FCF 溶液作蛋白质的定量标记试剂。

#### 3.4 反应时间及温度对体系的影响

实验发现,在 20 ~ 30 的室温条件下,固绿 FCF 与 BSA 的结合反应(只需 10 min)很快完成,而且至少可稳定 6 h,说明该体系与传统的考马斯亮蓝 G 250<sup>11</sup> 等方法相比具有反应速度快、稳定性好的优点。

#### 3.5 表面活性剂的影响

实验了不同类型表面活性剂对固绿 FCF 与 BSA 结合反应的影响,结果表明:非离子表面活性剂体积分数为 1% 的乳化剂 OP 与 1% 的 Tween-20 有增敏作用。它们的用量在 0.5 mL 以上体系吸光度最大,但 Tween-20 增敏作用更强;浓度为  $10^{-3}$  mol/L 的阳离子表面活性剂溴化十六烷基三甲基胺 (CTMAB) 的用量在 0.2 ~ 0.4 mL 内有增敏作用,随其用量(0.4 ~ 3.0 mL)增加,体系吸光度随之减小,这是因为阳离子的 CTMAB 与阴离子的固绿 FCF 作用形成水溶性的缔合物,阻止了 BSA 与试剂固绿 FCF 的结合反应;而浓度为  $10^{-3}$  mol/L 的阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠 (SDS) 的加入(0 ~ 1.0 mL)使体系吸光度下降,其用量在 1.0 mL 以后趋于平缓,其吸光度下降原因是阴离子型的 SDS 与阳离子型的 BSA 的质子化产物形成缔合物,也阻止了 BSA 与试剂固绿 FCF 的结合反应。因此实验中选用 1.0 mL 体积分数为 1% 的 Tween-20 水溶液作增敏剂。

#### 3.6 结合反应机理及结合数

大多数蛋白质分子在 pH 4 以下为阳离子型的质子化产物<sup>11</sup>,故可与带 3 个磷酸根阴离子的固绿 FCF 靠静电引力形成离子对型结合物。阴、阳离子表面活性剂实验的结果进一步支持了 BSA 与标记试剂固绿 FCF 之间的结合反应机理为静电结合机理。用摩尔比法测定了固绿 FCF 与 BSA 结合反应的结合数,不论是固定 BSA 的浓度,改变固绿 FCF 的浓度,还是固定固绿 FCF 的浓度,改变 BSA 的浓度,两种摩尔比法测定的结果一致,均为一个 BSA 分子结合 52 个固绿 FCF 分子。

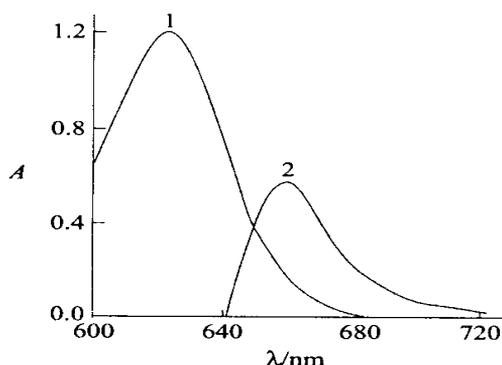


图 1 吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra

1. 试剂空白 (reagent blank); 2. 复合物 (complex)。

### 3.7 几种蛋白质的响应及其工作曲线

在确定的最佳实验条件下,试验了体系对不同蛋白质的响应情况,结果发现:胃蛋白酶(Pep)和胰蛋白酶(Try)无响应,而牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、 $\gamma$ -球蛋白(IgG)、 $\alpha$ -糜蛋白酶(Chy)、溶菌酶(Lyso)和卵蛋白均有响应,它们的标准工作曲线的回归方程、线性范围、相关系数  $r$ 、摩尔吸光系数<sub>660</sub>、桑德尔灵敏度  $s$  及测定的相对标准偏差 RSD 列于表 1 中。可见本方法具有较宽的线性范围,灵敏度高于文献方法<sup>7-9</sup>,而且 BSA 与人血清中的白蛋白与球蛋白响应较接近,故可用 BSA 作为标准蛋白质进行人血清中总蛋白的测定,这样既经济又提高了测定结果的可靠性。

表 1 几种蛋白质的工作曲线

Table 1 Working curves for the determination of some different proteins

蛋白质 Protein	线性范围 Linear range (mg/L)	回归方程 Regression equation (C:g/L)	相关系数 $r$	摩尔吸光系数 <sub>660</sub> (L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	桑德尔灵敏度 Sandell sensitivity $s$ (g cm <sup>-2</sup> )	RSD <sup>*</sup> ( $n = 11$ , %)
牛血清白蛋白 Bovine serum albumin (BSA)	5 ~ 70	$A = 12.11 C - 0.0213$	0.9965	$7.87 \times 10^5$	0.0826	1.8
人血清白蛋白 Human serum albumin (HAS)	5 ~ 70	$A = 13.90 C - 0.0119$	0.9998	$9.522 \times 10^5$	0.0719	2.0
$\gamma$ -球蛋白 Human immunoglobulin (IgG)	5 ~ 90	$A = 10.66 C - 0.0100$	0.9972	$1.600 \times 10^6$	0.093	1.6
$\alpha$ -糜蛋白酶 -Chymotrypsin (Chy)	5 ~ 100	$A = 12.36 C - 0.0143$	0.9962	$3.09 \times 10^5$	0.0809	2.5
溶菌酶 Lysozyme (Lyso)	5 ~ 70	$A = 14.70 C - 0.0137$	0.9964	$2.117 \times 10^5$	0.068	1.8
卵蛋白 Ovine albumin (OVA)	10 ~ 90	$A = 7.913 C - 0.0716$	0.9999	$3.561 \times 10^5$	0.126	2.3

各蛋白质浓度(every protein concentration): 50 mg/L

### 3.8 干扰物质的影响

在最佳实验条件下考察了多种氨基酸、金属离子、维生素、葡萄糖及尿素等对 50 mg/L 的 BSA 测定的影响,结果见表 2。测定的相对误差均在  $\pm 5\%$  以内,说明方法具有良好的选择性。

表 2 共存物质对 50 mg/L BSA 测定的影响

Table 2 Effect of foreign substances on the determination of 50 mg/L bovine serum albumin (BSA)

共存物 Substances	存在量 Added (g/L)	误差 Error (%)	共存物 Substances	存在量 Added (g/L)	误差 Error (%)
甘氨酸 Glycine (Gly)	0.1	0.8	NaCl	0.25 mol/L	- 4.7
半胱氨酸 Cystein (Cys)	0.1	1.3	Hg <sup>2+</sup>	0.01	3.6
脯氨酸 Proline (Pro)	0.1	- 1.5	La <sup>3+</sup>	0.1	- 0.6
酪氨酸 Tyrosine (Tyr)	0.1	- 0.9	Cr <sup>3+</sup>	0.1	2.1
赖氨酸 Lysine (Lys)	0.1	1.8	Pb <sup>2+</sup>	0.04	- 4.5
色氨酸 Tryptophan (Try)	0.1	1.7	V V	0.02	0.8
谷氨酸 Gutamic acid (Glu)	0.1	2.3	Mb VI	0.1	1.3
Ca <sup>2+</sup>	0.1	1.7	维他命 B <sub>1</sub> Vitamine B <sub>1</sub>	1.0	2.7
Mg <sup>2+</sup>	0.1	- 0.8	尿素 Urea	30	4.7
Al <sup>3+</sup>	0.1	2.5	葡萄糖 Glucose	1.0	- 1.9
Fe <sup>3+</sup>	0.1	- 1.7	柠檬酸 Citric acid	50	- 3.1
Zn <sup>2+</sup>	0.1	- 3.5	酒石酸 Tartaric acid	50	- 3.3
Cd <sup>2+</sup>	0.1	1.0	抗坏血酸 Ascorbic acid	1.0	- 1.9

### 3.9 样品分析

在最佳实验条件下,按实验方法直接测定了人血清样品(稀释 200 倍)和新鲜尿液及市售含乳饮料(稀释 20 倍)样品中的总蛋白含量(结果见表 3),并与经典的考马斯亮蓝 G-250(CBBG-250)法<sup>11</sup> 相比较,两种方法的测定结果基本一致。

表3 样品中总蛋白含量的测定结果 ( $n=5$ )Table 3 Results for the determination of total proteins in samples ( $n=5$ )

样品序号 * Samples	性别 Sex	年龄 Age	CBB G-250 法 CBB G-250 method		本文方法 Present Method		回收率 Recovery (%)
			mg/L	RSD (%)	(mg/L)	RSD (%)	
血清样 1 Human serum 1	男 Male	74	80.1 $\times 10^3$	2.3	79.6 $\times 10^3$	2.5	103.1
血清样 2 Human serum 2	女 Female	31	72.6 $\times 10^3$	2.3	73.2 $\times 10^3$	1.7	98.2
血清样 3 Human serum 3	女 Female	22	64.8 $\times 10^3$	2.6	64.4 $\times 10^3$	3.0	101.7
血清样 4 Human serum 4	男 Male	20	77.0 $\times 10^3$	3.2	77.3 $\times 10^3$	2.2	102.3
尿样 1 Urine 1	男 Male	38	90.2	2.9	87.9	2.7	98.3
尿样 2 Urine 2	男 Male	10	69.1	2.2	70.4	2.3	101.9
娃哈哈 AD 钙奶 Milk drink 1			10.6 $\times 10^3$	2.8	10.1 $\times 10^3$	2.6	97.3
乐百氏 AD 钙奶 Milk drink 2			10.8 $\times 10^3$	2.1	10.2 $\times 10^3$	3.2	101.5

致谢 感谢连云港市第二人民医院检验科提供血清样

## References

- 1 Guan Zhengda(管正大). *Handbook of Clinical Purpose on Medical Inspection* (医学检验临床意义手册). Beijing(北京): The People's Press of Surgeon(人民军医出版社), 1994:176~177
- 2 Dumas B T, Watson W A, Biggs H G. *Clin. Chim. Acta*, 1971, 31:87~89
- 3 Li Na, Li Ke an, Tong Shenyong. *Anal. Biochem.*, 1996, 233(2):151~155
- 4 Wang Xiaoxia(王晓霞), Shen Hanxi(沈含熙), Hao Yongmei(郝永梅). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2000, 28(11):1388~1390
- 5 Hara T, Tsukagoshi K, Imaki M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1987, 60:1537~1541
- 6 Sun Wei(孙伟), Jiao Kui(焦奎), Liu Xiaofang(刘晓方). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2002, 30(3):312~314
- 7 Hu Qiulan, Zhao Fenlin, Li Ke an. *Chinese Chem. Lett.* 2002, 13(1):71~72
- 8 Hu Qiuluan(胡秋鸾), Li Na(李娜), Zhao Fenglin(赵凤林), Li Ke an(李克安), Tong Shenyang(童沈阳). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) 1999, 27(2):166~169
- 9 Cao Qique(曹秋娥), Li Zubi(李祖碧), Wang Jialin(王家林), Li Chongning(李崇宁). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2002, 30(2):222~226
- 10 Hu Qinghong(胡庆红), Liu Shaopu(刘绍璞), Fan Li(范莉). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2002, 30(1):42~45
- 11 Bradford M M. *Anal. Biochem.*, 1976, 72:248~254
- 12 Chang Wenbao(常文保), Li Ke an(李克安). *Concise Handbook of Analytical Chemistry* (简明分析化学手册). Beijing(北京): The Press of Peking University(北京大学出版社), 1981:262~263

## Spectrophotometric Determination of Serum Proteins with Fast Green FCF

Ma Weixing<sup>1,2</sup>, Qian Baohua<sup>1,2</sup>, Yang Xujie<sup>1</sup>, Lu Lude<sup>\*1</sup>, Wang Xin<sup>1</sup>, Li Ke an<sup>3</sup>

<sup>1</sup> (Materials Chemistry Laboratory, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094)

<sup>2</sup> (Department of Chemical Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

<sup>3</sup> (College of Chemistry and Molecule Engineering, Peking University, Beijing 100871)

**Abstract** In the Clark-Lubs medium with pH 1.4, fast green FCF can bind rapidly to form a complex with serum protein at room temperature, which has a maximum absorption wavelength at 660 nm, and exhibits a bathochromic shift of 36 nm compared with the maximum absorption wavelength of fast green FCF. The optimum reaction

conditions were investigated, and a new method for the determination of proteins was developed based on this binding reaction. The absorbance of the binding system at 660 nm is proportional to the concentration of some proteins in the range of 5 ~ 70 mg/L with a molar absorptivity of  $7.87 \times 10^5$ ,  $9.52 \times 10^5$ ,  $1.60 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , and Sandell sensitivity of 0.083, 0.072, 0.093  $\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$  for the determination of bovine serum albumin (BSA), human serum albumin (HAS) and human immunoglobulin G (IgG), respectively. A lot of the foreign substances do not interfere with the determination of proteins except for the anionic surfactant and cationic surfactant. The proposed method, which is rapid, stable, and of good selectivity and high sensitivity, has been used for the determination of the total proteins in urine and human serum samples as well as milk drink samples. The results obtained by this method agreed with those obtained by the coomassie brilliant blue G250 method.

**Key words** Fast green FCF, spectrophotometry, proteins

(Received 12 November 2002; accepted 19 July 2003)

## 第九届国际电分析化学研讨会(9th ISEC)简介

由中国科学院长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室主办的“第九届国际电分析化学研讨会(Ninth International Seminar on Electroanalytical Chemistry, 简称 9th ISEC)”于 2003 年 10 月 10 日至 12 日在中国科学院长春应用化学研究所隆重召开。会议宗旨是为全世界电分析化学家提供一个高水平的科研论坛,以展示最新的研究成果和进展,并吸引国际一流电分析化学家来我国进行学术交流,推动国际合作,促进我国电分析化学研究走向世界前列。

会议由汪尔康院士担任大会主席并致开幕词,董绍俊院士(TWAS)担任国际顾问委员会主席,电分析化学国家重点实验室主任杨秀荣教授担任组织委员会主席。会议由中科院长春应用化学研究所国家电化学和光谱分析研究中心以及长春分析仪器研究技术开发中心联合协办,并得到了国家自然科学基金委、中国科技部、王宽诚教育基金、中国科学院国际合作局、中国科学院南南合作基金、中国化学会、吉林省科技厅、中科院长春分院、吉林省和长春市外国专家局以及长春应用化学科学研究中心的指导、赞助和大力支持。参加本次会议的代表有来自 10 余个国家和地区的中外学者近 220 人,发表论文 135 篇,其中大会报告 3 篇、邀请报告 48 篇、墙报 84 篇。3 篇大会报告的内容为 A.J. Bard 教授(美国得州大学奥斯汀分校,前美国总统科学顾问)的“基于电致化学发光的分析方法的原理和发展”,M. Aizawa 教授(日本东京工业大学校长)的“用于生物评价的细胞生物装置”,C. Amatore 教授(法国巴黎高师,法国科学院院士)的“超快循环伏安法研究分子内电化学”。代表们就目前国际电分析化学热点问题,如生物分子界面电化学和生物传感器、纳米技术、电化学方法和技术等领域的最新进展和发展趋势进行了热烈的研讨,学者们通过交流,活跃了学术思想,为未来研究方向和开展国际合作研究提供了新思路。

在欢迎会上,汪尔康教授代表中国科学院长春应用化学研究所授予 A.J. Bard 教授、C. Amatore 教授和 M. Aizawa 教授名誉教授称号,这是应化所首次同时授予三位外籍科学家的名誉称号。会议期间,汪尔康教授、俞汝勤教授、C. Amatore 教授和 R. Guilard 教授共同主持了中法(欧)会谈,并就相互交换研究生和博士后,互派科学家,进一步合作研究共建课题和共建实验室,定期举办交流活动,达成了初步意向。中外代表还参观了电分析化学国家重点实验室,中外代表包括电分析化学国家重点实验室外籍学术委员 M. Aizawa, C. Amatore, H. Grault, R. Guilard 和实验室顾问 A.J. Bard 对实验室取得的成绩给予了高度评价。

会议结束后很快收到许多国外代表祝贺会议成功的传真、电子邮件和信件等。ISEC 与“北京国际分析测试学术报告会和展览会[(Beijing International Conference and Exhibition on Instrumental Analysis(BCEIA)]”相衔接,以高登学术研讨会(Gordon Research Conference)为模式,对我国电分析化学的发展将会起到积极的促进作用。

(汪 莉 张柏林 汪尔康)