

偶氮氯膦 I-铁(III) 配合物光谱探针测定 血清蛋白质

李 卓 曹建明^① 连国军 赵长容

(温州医学院检验医学院 浙江省温州市 325035)

摘 要 研究了在酸性溶液中偶氮氯膦 I (CPA-I)-铁(III) 配合物与牛血清白蛋白(BSA) 结合的吸光光谱行为, 建立起一种以偶氮氯膦 I-铁(III) 配合物作为光谱探针测定蛋白质的新方法。该法具有较强的抗干扰力, 弥补了偶氮氯膦 I 测定蛋白质干扰物质允许量低的问题, 该法反应灵敏、快速, 摩尔吸光系数 $\epsilon_{570\text{nm}} = 2.70 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 线性范围宽, 可达 0—82 mg/L, 用于人血清总蛋白的测定与双缩脲法相关性好。

关键词 牛血清白蛋白, 偶氮氯膦 I-铁(III) 配合物, 光谱探针。

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2006) 06-1197-04

1 引言

目前金属离子配合物与蛋白质之间的相互作用^[1-3] 成为研究的热点, 因其具有灵敏度高, 抗干扰力强而成为优良的蛋白质检测光谱探针。偶氮氯膦 I 是稀土离子的灵敏指示剂, 其与蛋白质反应后, 受各种离子等干扰大, 给蛋白质的分析带来困难, 很难直接用于血清蛋白质的测定。本研究发现, 偶氮氯膦 I 在酸性环境下与 Fe(III) 形成的配合物可灵敏的与 BSA 发生反应, 干扰物的允许量大, 直接用于人血清总蛋白质的测定, 结果令人满意。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

牛血清白蛋白: BSA, 分子量以 62200 计, 华美生物工程公司, 50g/L, 4℃ 冰箱保存, 用时稀释; CPA-I: 国药集团化学试剂有限公司, $8.44 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; Fe(III): $100 \mu\text{g/mL}$, 按临床检验操作规程配^[4]; 聚氧乙烯月桂醚(Brij-35): 5%; pH2.1—4.5 的 Michaelis 缓冲液溶液。所有试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

UV-2201 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); 721 型可见分光光度计(上海第三分析仪器厂); pH5-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

2.2 实验方法

在 5mL 试管中依次加入 1.8mL pH2.45 的 Michaelis 缓冲液溶液、0.2mL 5% Brij-35 水溶液、一定量的蛋白质标准溶液, 再加入 0.27mL $8.44 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ CPA-I 和 0.13mL $100 \mu\text{g/mL}$ Fe(III) 的混合液, 加水至总体积为 3mL, 摇匀。室温下放置 10min 后, 再用 1cm 比色皿, 以相应试剂

① 联系人, 电话: (0577) 86699121; E-mail: wycjmi@163.com

作者简介: 李卓(1977—), 女, 西安市人, 在读硕士研究生, 检验师, 研究方向为生化检验。

收稿日期: 2006-07-25; 接受日期: 2006-08-22

空白作参比扫描吸收光谱或在 570nm 处测定吸光度 A 。

3 结果和讨论

3.1 吸收光谱

在 Brij-35 存在的 pH2.45 的 Michaelis 酸性缓冲液介质中, Fe(III) 与 CPA-I 仅有微弱的反应, 吸收峰在 610nm 处; CPA-I 与 BSA 反应的最大吸收峰在 560nm; Fe(III)-CPA-I 配合物与 BSA 接触后, 吸收峰红移至 570nm, 且吸光度有所增大(见图1)。由此可知, BSA 与 Fe(III)-CPA-I 之间存在相互作用, 且这种作用强于 BSA 与 CPA-I 的作用。

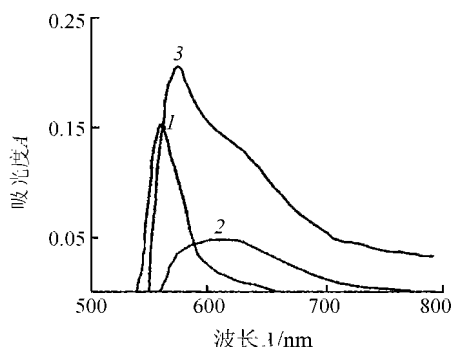


图 1 吸收光谱曲线

3.2 反应条件对试验的影响

3.2.1 缓冲体系、酸度及缓冲液用量的影响

实验了 Clark-Lubs 缓冲液: 邻苯二甲酸氢钾-盐酸 pH2.2—3.8; Michaelis 缓冲液: 酒石酸-酒石酸钠 pH 2.3—3.4; Wapole 缓冲液: 盐酸-醋酸钠 pH2.2—3.2; Sørensen 缓冲液: 甘氨酸-NaCl-HCl pH2.0—3.2; Mcllvaine 缓冲液: 磷酸氢二钠-柠檬酸 pH2.2—3.4; Britton-Ro-bin-son 缓冲液: 混合酸(正磷酸、冰醋酸、硼酸)—NaOH pH2.2—3.2 体系; 以 Michaelis、Mcllvaine 缓冲体系灵敏度高, 选用 Michaelis 缓冲液。pH 在 2.45—3.1 范围内 A 大且恒定, 选 pH2.45 为最佳酸度。缓冲溶液用量在 0.9—2.4mL 时吸光度 A 大且稳, 选取 1.8mL 为最佳用量。

3.2.2 络合物探针比例及用量的影响

实验表明 Fe(III) 与 CPA-I 的浓度比介于 0.9—1.9 范围时, 吸光度 A 大且恒定, 测定中选择 $C\text{Fe(III)}/C(\text{CPA-I}) = 1:1$ 。固定 BSA 浓度, 改变 Fe(III) 与 CPA-I 配合物的量, 测定体系的吸光度, 当 $8.44 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ CPA-I 的用量在 0.14—0.34mL 时, 浓度为 $100 \mu\text{g/L}$ Fe(III) 溶液用量在 0.06—0.16mL 时吸光度 A 大且较稳定, 选取 0.27mL $8.44 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 CPA-I 及选取 0.13mL $100 \mu\text{g/L}$ Fe(III) 的量为最佳用量。

3.2.3 表面活性剂的选择及影响

金属络合物与蛋白质结合后, 由于电荷的中和作用产生沉淀, 使体系稳定性降低。故必须选择合适的表面活性剂增稳。实验了阳离子表面活性剂十二烷基三甲基溴化铵(CTMAB), 阴离子表面活性剂十二烷基苯磺酸钠(SDBS)及非离子表面活性剂阿拉伯树胶(Acacia)、聚乙二醇辛基苯基醚(OP)、聚氧乙烯月桂醚(Brij-35), 聚氧乙烯异辛基苯基醚(TritonX-100), 聚氧乙烯失水山梨醇油酸单酯(Tween-80)等, 结果表明阿拉伯树胶和 Brij-35 的效果好, 但当加入阿拉伯树胶溶液后, 实验的线性不好, 故选用 Brij-35 作为增稳剂, 5% Brij-35 用量大于 0.15mL, 体系可稳定长时间, 用量过多, 灵敏度会逐渐降低, 实验中选用 0.2mL 可稳定 40min。而阴、阳离子表面活性剂的加入, 因电荷的作用对体系不利, 加入后使吸光度下降, 不能用于增稳。

3.2.4 试剂加入顺序的影响

实验结果表明, 不同的试剂加入顺序对反应的灵敏度、稳定性及线性有较大的影响。试验选用依次加入 Michaelis 缓冲液、Brij-35、BSA、CPA-I、Fe(III) 作为试剂的加入顺序, 灵敏度高且稳定,

pH = 2.48; $C(\text{CPA-I}) = 7.60 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$;

$C\text{Fe(III)} = 4.33 \mu\text{g/mL}$;

$C\text{BSA} = 50 \text{ mg/L}$; $C\text{Brij-35} = 0.33\%$ 。

1——(CPA-I)-BSA;

2——(CPA-I)-Fe(III);

3——(CPA-I)-Fe(III)-BSA。

线性范围 0—57mg/L。并将这些试剂组合为双试剂即 Michaelis 缓冲液和 Brj-35 组合为试剂 I, CPA-I 和 Fe(III) 组合为试剂 II。试剂 I 与 BSA 作用后, 加入试剂 II, 线性范围 0—82mg/L。

3.3 反应时间及稳定性

室温下, 偶氮氯膦 I-Fe(III) 配合物与 BSA 迅速结合形成稳定的复合物, 8min 内即可反应完全, 吸光度达最大值且可稳定 40min。

3.4 离子强度的影响

本文实验了 NaCl 对实验的影响, 结果表明, 当体系中 NaCl 的量达 1.8g/L 时, 吸光度 A 开始下降, 体系中 NaCl 的浓度越大, 吸光度 A 下降越大, 这是由于共存离子因静电作用阻碍了配合物与蛋白质的结合, 故较高的离子强度对反应不利。

3.5 共存物质的干扰试验

试验了一些生物体内常见的有机物及金属离子对结合反应的影响, 在±5% 的误差范围内允许存在的外来干扰的量为(mg/L): Ca^{2+} (3.0)、 Cu^{2+} (1.5)、 Zn^{2+} (0.3)、 Fe^{2+} (0.5)、 Mg^{2+} (3.5)、 Co^{2+} (450)、 Ni^{2+} (15.0)、 Cr^{3+} (4.0)、 Al^{3+} (0.7)、NaCl (180)、葡萄糖 (26)、抗坏血酸 (3.0)、甘氨酸 (250)、谷氨酰胺 (290)、半胱氨酸 (86)、丙氨酸 (63)、赖氨酸 (250)、苯丙氨酸 (36)、酪氨酸 (70)、脯氨酸 (15)、丝氨酸 (250)。操作时, 血清还要进行稀释, 故上述干扰可不予考虑。

3.6 最大结合数的测定

固定配合物的浓度, 改变 BSA 的浓度, 用摩尔比法测定了 BSA 对偶氮氯膦 I-Fe(III) 配合物的最大结合数(见图 2)。图中两条直线相交处对应的 BSA 浓度为 $1.01 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 计算得到最大结合数 $n = C_{\text{偶氮氯膦 I-Fe(III)}} / C_{\text{BSA}} = 75$ 。

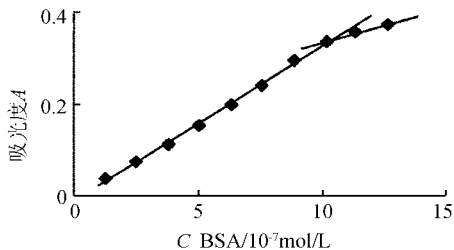


图 2 摩尔比法测 BSA 对偶氮氯膦 I-Fe(III) 配合物的最大结合数
 $C_{\text{偶氮氯膦 I-Fe(III)}} = 7.60 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

3.7 校准曲线

分别取不同量的蛋白质溶液, 按实验方法操作, 绘制了牛血清白蛋白的校准曲线。校准曲线的线性响应范围为 0—82mg/L, 直线的回归方程为 $A_{570\text{nm}} = 0.0052C - 0.0138$ (C : mg/L); 相关系数 $r = 0.998$ 。测得结合物的摩尔吸光系数 $\epsilon_{570\text{nm}} = 3.2 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; Sandell 灵敏度 $S = 0.21 \mu\text{g/cm}^2$ 。

3.8 人血清样品总蛋白含量的分析

人血清样品(温州医学院第一附属医院提供)经 10 倍稀释, 取 20μL 按实验方法进行操作, 测定吸光度, 求得总蛋白含量。所得结果见表 1。其结果与双缩脲法^[5]基本一致。平均加标回收率为 100.7%。

表 1 人血清样品中总蛋白含量的测定结果

样品	双缩脲法	本法	相对标准偏差 (%) (n= 4)
	(g/L)	(g/L)	
1	68.2	68.4	0.88
2	79.4	78.7	1.8
3	73.4	73.4	0.12

参考文献

- [1] Wei Y J, Li K A, Tong S Y. Interaction of Proteins with Fe(III)-Chrome Azurol S Complex[J]. *Chem J. Chinese Universities*, 1994, 15(10): 1470—1472.
- [2] Yu Y, HUANG F D, GAO Q. Application and Investigation of the Reaction Between ArsenazoIII-Ytterbium(III) and Bovine Serum

Albumin[J]. *Chinese J. Anal. Chem.*, 2001, **29**(10): 1205—1208.

- [3] Liu D M, Li S T, Zhao S L. Spectrophotometric Determination of Protein by Using Barium(II) -Chlorophosphonazo III Complex as Spectral Probe[J]. *Chinese J. Anal. Chem.*, 2004, **32**(9): 187—190.
- [4] 中华人民共和国卫生部医政司编. 全国临床检验操作规程[M]. 第 2 版. 南京: 东南大学出版社, 1997. 198.
- [5] 中华人民共和国卫生部医政司编. 全国临床检验操作规程[M]. 第 2 版. 南京: 东南大学出版社, 1997. 155.

Determination of Serum Protein by Chlorophosphonazo I -Ferrum(III) Complex Spectral Probe

LI Zhou CAO Jian-Ming LIAN Guo-Jun ZHAO Chang-Rong

(Department of Laboratory Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325035, P. R. China)

Abstract A new method for the determination of protein by using chlorophosphonazo I (CPA-I) -ferrum(III) complex as a spectral probe was established based on the binding interaction of protein with CPA-I -ferrum(III) complex in acid buffer. The method shows high selectivity, and overcomes the problem of interference in the determination of serum proteins by using CPA-I. This method is sensitive and rapid. The molar absorption coefficient is $2.70 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. The calibration graph for BSA is linear up to 82mg/L. The method has been employed in the assay of protein of human serum. The results are in agreement with those obtained by Biuret method.

Key words Bovine Serum Albumin, Chlorophosphonazo I -Fe(III) Complex, Spectral Probe.

致本期及以往各期每篇论文的联系 拟赠 2004 年 1—6 期《光谱实验室》1 套的通知

各有关同志:

谢谢你对本刊的支持。

《光谱实验室》2004 年 1—6 期已出版完毕, 共发表论文 349 篇, 涉及谱学分析各个分支学科的最新研究成果。如果你认为对你有参考价值的话, 可以赠送你一套, 净重 2.2kg, 邮资自付(普通印刷品 11 元, 挂号另加 3 元, 请用邮票支付), 有意者来信告知收件人和详细地址, 同时将邮票放在信中挂号寄来。

《光谱实验室》编辑部

2006 年 11 月 25 日

电话: (010) 62452937, 电邮: gsys@263.net; gsys81@citiz.net; gsys@public.sti.ac.cn。

联系地址: 北京市 81 信箱 66 分箱 《光谱实验室》编辑部联络处 刘建林, 邮编: 100095。