

探针 3-(2-氰基乙基)胞嘧啶同步荧光法测定血清中蛋白质

崔凤灵, 王俊丽, 崔延瑞, 渠桂荣, 卢雁, 樊静

河南师范大学化学与环境科学学院, 河南 新乡 453007

摘要 在模拟人体生理条件下, 基于 3-(2-氰基乙基)胞嘧啶(CECT)与人血清白蛋白(HSA)和牛血清白蛋白(BSA)之间的相互作用, 以 CECT 为分子光谱探针研究了 CECT-蛋白质体系的同步荧光光谱特征。同步荧光光谱特征及强度与 $\Delta\lambda$ 值、反应介质、反应温度等因素有关。在此基础上, 建立了以 CECT 为分子光谱探针定量测定血清样品中蛋白质含量的新方法。在最佳实验条件下, CECT-HSA 和 CECT-BSA 体系的同步荧光强度分别在 $0 \sim 441.4$ 和 $0 \sim 351.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内与蛋白质浓度呈现良好的线性关系, 检测限分别为 0.023 和 $0.035 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相对标准偏差(RSD) $1.2\% \sim 3.3\%$, 加标回收率为 $97.2\% \sim 100.4\%$ 。该方法具有简单、快速、灵敏度较高、线性范围宽、精密度和回收率较好等优点。该法可直接用于血清样品中蛋白质总量的测定, 结果令人满意。

关键词 人血清白蛋白(HSA); 牛血清白蛋白(BSA); 3-(2-氰基乙基)胞嘧啶(CECT); 同步荧光光谱
中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2008)02-0384-05

引言

蛋白质是构成一切生物生命的物质之一, 蛋白质化学是生命科学研究的前沿领域。研究蛋白质与小分子作用的形式及机理, 利用小分子探针定量分析蛋白质是生物化学和其他生物学科、食品检验、诊断疾病、临床医学、药物化学等领域研究的热点之一。血清白蛋白是动物和人体血浆中重要的载体蛋白, 是血浆中最重要的蛋白质, 它可以作为许多内源性和外源性化合物的存储和转运蛋白。血清白蛋白的定量研究更是临床中诸如恶性肿瘤、糖尿病、肾功能衰退、肝硬化、结核病、外科手术等许多疾病诊断不可缺少的内容。因此开展其分析测定方法及其临床方面的研究, 有着非常重要的现实意义^[1,2]。目前测定蛋白质含量的方法有多种, 常用的经典方法有 Lowery 法^[3]、Bradford 法^[4]、溴酚蓝法^[5]、溴甲酚绿法^[6]等, 但这些方法或灵敏度较低、或线性范围窄、或存在较强的吸附作用。近年来又建立了一些测定蛋白质的新方法如分光光度法^[7]、荧光光度法^[8]、共振光散射法^[9]、化学发光法^[10]和电化学方法^[11]。其中荧光光度法, 由于具有简单、快速、灵敏度高等优点而备受关注。与普通荧光法相比, 同步荧光法还具有光谱简化、谱带窄化和减小散射光影响的优点, 已成功应用于多组分的同时测定^[12]和生物分子^[13]的

分析研究中。我们用自己合成的硫脲衍生物新试剂, 不仅对铜和钼等金属离子进行了分析测定^[14-16], 并运用荧光光谱法测定了血清样品中的蛋白质总含量^[17]。

核苷是由戊糖和碱基缩合而成的, 在生理生化过程中起着调控作用, 具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒等药效。近来有许多抗病毒核苷类似物已应用于临床, 如阿糖胞苷、拉米夫定、阿昔洛韦等抗病毒药物。3-(2-氰基乙基)胞嘧啶(CECT)是无环核苷类似物, 目前还未见其与血清白蛋白相互作用并作为分子探针测定蛋白质的文献报道。本文在模拟人体生理条件下, 利用荧光猝灭光谱研究了 CECT 与 HSA 和 BSA 的相互作用。另外, 在相同实验条件下, 随着蛋白质浓度的不断增加, 同步荧光强度(ISF)明显增强, 据此建立了以 CECT 为分子光谱探针测定蛋白质的新方法。该方法具有操作简便、试剂不玷污器壁、灵敏度高、重现性好、线性范围宽和测定结果可靠等优点, 可直接用于血清样品中蛋白质总量的测定。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

人血清白蛋白(HSA, 华兰生物有限公司)和牛血清白蛋白(BSA, 华兰生物有限公司)分别配制成 4.0×10^{-5} 和 $2.0 \times$

收稿日期: 2006-10-06, 修订日期: 2007-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(20673034), 河南省青年骨干教师资助计划(200470)和河南省教育厅自然科学基金项目(2006150012)资助

作者简介: 崔凤灵, 1963年生, 河南师范大学化学与环境科学学院教授 e-mail: fenglingcui@hotmail.com

$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,并置于冰箱 $1 \sim 5^\circ\text{C}$ 保存备用; CECT (合成, 产率 83%) 用 DMF 与水混合溶剂配制浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液; 实验用缓冲液 (pH 值 7.40) 为 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸 (HCl, 北京化工厂) 与 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 北京化工厂) 混合; NaCl (北京化工厂) 配制成 $0.50 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液; 人血清样品 (河南师范大学附属医院) 和牛血清样品 (河南周口兽医站) 溶液被稀释 100 倍。所用试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

FP-6200 荧光分光光度计 (日本分光公司); pH-3C 数字型酸度计 (杭州东星仪器设备厂); CS501 型超级恒温器 (上海市实验仪器厂)。

1.2 实验方法

在一系列 10 mL 的容量瓶中, 依次加入 2.0 mL pH 7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液、2.0 mL 的 NaCl 水溶液、一定量的 HSA 或 BSA 溶液和 CECT 溶液, 以二次蒸馏水定容, 振荡摇匀。在 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 300 \sim 400 \text{ nm}$ 的条件下分别扫描 CECT 对 HSA 和 BSA 的荧光猝灭光谱。在 $\Delta\lambda = 20$

nm, $\lambda_{\text{ex}} = 260 \sim 320 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 280 \sim 340 \text{ nm}$ 条件下, 记录 CECT 存在时 HSA 和 BSA 的同步荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 CECT 与 HSA 和 BSA 的相互作用

图 1 中的 (a) 和 (b) 分别为 CECT 对 HSA 和 BSA 的内源荧光猝灭光谱。由图 1 看出, 在激发波长为 280 nm 时, HSA 和 BSA 在 345 nm 左右有较强的荧光发射, 随着 CECT 浓度的不断增加, HSA 和 BSA 的内源荧光强度 (F) 有规律的降低, 且最大发射波长发生蓝移。根据荧光光谱发生蓝移可以推断色氨酸残基是否处于疏水环境^[18]。加入 CECT 后 HSA 和 BSA 的最大发射波长向短波移动, 说明 CECT 与血清白蛋白的相互作用使血清白蛋白发色团周围的微环境发生了变化, 使其疏水性增强^[19]。表明 CECT 与 HSA 和 BSA 主要通过疏水作用发生相互作用。

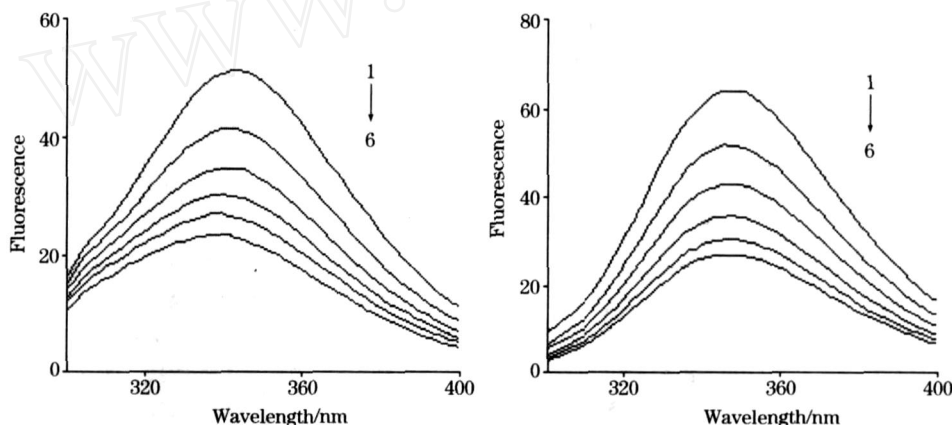


Fig 1 Fluorescence quenching spectra of CECT-HSA (a) and CECT-BSA (b)

(a): The concentration of HSA is $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ while the CECT concentration corresponding to 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ from 1 to 6

(b): The concentration of BSA is $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ while the CECT concentration corresponding to 0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0 $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ from 1 to 6

2.2 体系 CECT-HSA 和 CECT-BSA 的同步荧光光谱特征

基于 CECT 与血清白蛋白的相互作用, 在 $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ 条件下扫描 CECT 存在时 HSA 和 BSA 的同步荧光光谱。由图 2 可知, CECT 在 305 nm 处有比较弱的同步荧光强度, 因此可以消除 CECT 的内过滤影响。CECT-HSA 和 CECT-BSA 体系在 302 nm 左右有较强的同步荧光强度, 同步荧光强度随着 HSA 和 BSA 浓度的不断增大而有明显的增强。在一定范围内与血清白蛋白的浓度具有良好的线性关系, 据此建立了以 CECT 为分子光谱探针测定蛋白质的新方法。

2.3 实验条件的选择

为了选择最佳的实验条件, 用 HSA 分别对实验条件 $\Delta\lambda$ 、反应介质、CECT 的浓度、反应时间、反应温度和离子强度进行了优化实验。

2.3.1 $\Delta\lambda$ 值的选择

在人体生理酸度下 (pH 7.40), 研究了 $\Delta\lambda$ 变化对同步荧

光强度的影响, 表明体系的同步荧光强度随着 $\Delta\lambda$ 的增大而增强。但是在 $\Delta\lambda$ 小于或大于 20 nm 时, 都会出现两个距离相近而强度不等的峰, 根据同步荧光光谱图对称性好的特征, 实验选择 $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$, 此时同步荧光强度主要由 HSA 的酪氨酸残基产生。

2.3.2 介质的选择

考察了 pH 7.40 的 Tris-HCl, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_3\text{BO}_3 + \text{NaCl}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, Britton-Robinson 和 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 等不同缓冲溶液对体系同步荧光强度的影响。结果表明, 在 Tris-HCl 缓冲溶液中体系灵敏度较高。另外, 研究了该缓冲液用量在 0~5 mL 范围内对体系同步荧光强度的影响。表明缓冲溶液用量在 1.0~3.5 mL 范围内同步荧光强度基本稳定, 实验选用 2.0 mL Tris-HCl 缓冲溶液为反应介质。

2.3.3 CECT 用量对体系同步荧光强度的影响

在 $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ 的条件下, 研究了 CECT 浓度对体系同步荧光强度的影响, 随着 CECT 浓度的不断增大, 体系的同步荧光强度没有明显的变化且强度比较低, 可以消除 CECT 的

内过滤效应。因此对 CECT 的浓度没有严格的要求, 实验选择 $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

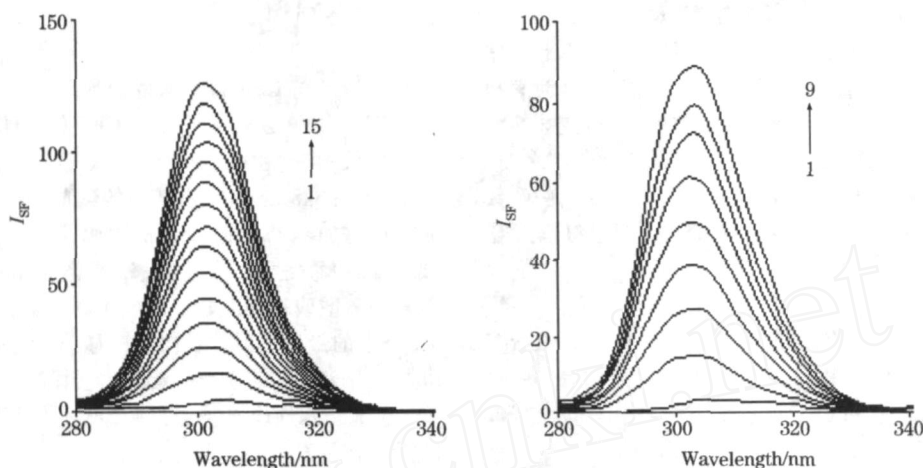


Fig 2 Synchronous fluorescence spectral of CECT-HSA (a) and CECT-BSA (b) ($\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$)

- (a): The c_{CECT} is $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ while the c_{HSA} corresponding to 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0, 4.4, 4.8, 5.2, $5.6 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ from 1 to 15
 (b): The c_{CECT} is $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ while the c_{BSA} corresponding to 0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8, $5.4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ from 1 to 9

2.3.4 反应时间与体系的稳定性及反应温度

实验表明: 在上述条件下, 17 °C 室温下 5 min 内反应即可完全, 且 8 h 内同步荧光强度基本保持不变。

但随着温度的升高, 空白溶液的同步荧光强度基本不变, 而体系 CECT-HSA 的同步荧光强度则明显降低。原因是温度的升高使分子内发生了能量转移, 致使荧光量子产率降低。

2.3.5 离子强度对体系同步荧光强度的影响

在上述最佳实验条件下, 用 NaCl 调节离子强度, 在 $0 \sim 1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内研究了离子强度对体系同步荧光强度的影响。发现离子强度对体系的灵敏度基本没有影响。原因可能是 CECT 是难电离的物质, 与 HSA 主要通过疏水作用

力相互作用。因此, 实验用人体生理离子强度 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 线性范围、检出限和精密度的测定

在确定的最佳实验条件下, 研究了分子光谱探针 CECT 与 HSA 和 BSA 的同步荧光强度的响应情况, 并绘制了 HSA 和 BSA 的标准工作曲线。图 3 表明, 同步荧光强度与 HSA 和 BSA 分别在 $0 \sim 441.4$ 和 $0 \sim 351.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的较宽范围内具有良好的线性关系, 其线性回归方程分别为 $y = 9.62 + 21.04 \times 10^6 c$ 和 $y = 5.44 + 17.47 \times 10^6 c (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$, 相关系数分别为 0.998 5 和 0.998 1。根据 IUPAC 的定义, 重复测定 11 次标准空白溶液计算相应的检测限分别为 0.023 和 $0.035 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

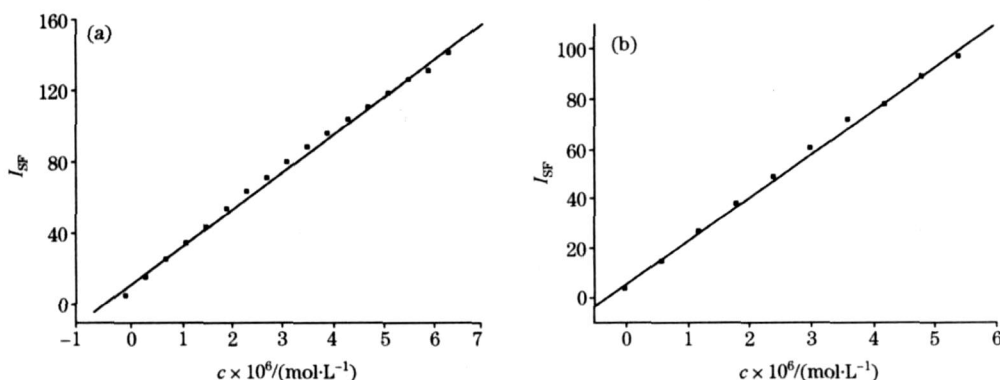


Fig 3 Standard working curves of HSA (a) and BSA (b)

- (a) The c_{CECT} is $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ while the c_{HSA} corresponding to 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0, 4.4, 4.8, 5.2, $5.6 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 (b) The c_{CECT} is $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ while the c_{BSA} corresponding to 0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8, $5.4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.5 血清样品中蛋白质含量的测定

用该方法对血清样品中蛋白质总量进行平行测定 ($n=6$)。测定前, 首先将新鲜的血清样品用水稀释 100 倍, 且按实验方法测定 1.0 mL 人血清样品和 0.8 mL 牛血清样品中蛋白质总量。为验证方法的可靠性, 在含有不同量 HSA 和 BSA 标样和 $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CECT 中分别加入 1.0 mL 人血清和 0.8 mL 牛血清样品, 进行加标回收实验, 测定结果和回收率见表 1, 回收率在 97.2%~100.4% 的范围内。表明方法具有操作简便, 重现性好、灵敏度高和测定结果可靠等优点, 可用于临床检验中血清样品的测定。

3 结 论

在模拟人体生理条件下, 运用荧光光谱研究了 CECT 与 HSA 和 BSA 之间的相互作用。结果表明, 由于 CECT 与 HSA 和 BSA 相互作用而使 HSA 和 BSA 的内源荧光强度有规律的降低, 且主要作用力是疏水作用。在此基础上研究了体系的同步荧光光谱特征和反应时间及温度等实验条件对同步荧光强度的影响。在最佳实验条件下, 体系 CECT-HSA 和 CECT-BSA 的同步荧光强度分别在一定范围内与 HSA 和

BSA 的浓度呈现良好的线性关系。据此建立了以小分子 CECT 作为分子光谱探针, 用同步荧光技术定量测定蛋白质的新方法。该方法操作简单、快速、试剂不玷污器壁、重现性好、灵敏度高、线性范围宽、测定结果可靠。方法用于血清样中蛋白质总量的测定, 获得了令人满意的结果。该法有望用于生化分析和临床分析领域。

Table 1 Results of determination of proteins in albumin samples ($n=6$)

血清 白蛋白	加入量 / ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	测得量 / ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	相对标准 偏差 / %	回收率 / %
HSA	0	1.2246×10^{-6}	1.7	
	1.6×10^{-6}	2.8317×10^{-6}	1.2	100.2
	2.4×10^{-6}	3.6278×10^{-6}	1.2	100.1
	3.2×10^{-6}	4.3665×10^{-6}	1.6	98.7
BSA	0	9.3150×10^{-7}	2.4	
	8.0×10^{-7}	1.7381×10^{-6}	1.8	100.4
	2.0×10^{-6}	2.8496×10^{-6}	2.8	97.2
	4.0×10^{-6}	4.8296×10^{-6}	3.3	97.9

参 考 文 献

- [1] Cui F L, Fan J, Li J P, et al. Bioorgan. Med. Chem., 2004, 12: 151.
- [2] Cui F L, Fan J, Fan Y C, et al. J. Pharmaceut. Biomed., 2004, 34: 189.
- [3] Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. J. Biolog. Chem., 1951, 193(1): 265.
- [4] Bradford M M. Anal. Biochem., 1976, 72(1-2): 248.
- [5] Flores R. Anal. Biochem., 1978, 88(2): 605.
- [6] Doumas B T, Watson W A, Biggs H G. Anal. Chim. Acta, 1971, 31(1): 87.
- [7] Guo Z X, Shen H X. Analyst, 1999, 124(7): 1093.
- [8] Jiang C Q, Luo L. Anal. Chim. Acta, 2004, 506(2): 171.
- [9] FENG Sur-ling, WANG Jin, FAN Jing(冯素玲, 王 瑾, 樊 静). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(6): 927.
- [10] Li Z P, Fan S S, Zhang L N, et al. Anal. Sci., 2004, 20(9): 1327.
- [11] Zhang H M, Zhu Z W, Li N Q. Fresenius J. Anal. Chem., 1999, 363(4): 408.
- [12] YAN Yuan, PENG Xue-jun, XU Jin-gou, et al(鄢 远, 彭学军, 许金钩, 等). Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报), 1995, 14(1): 1.
- [13] Cui F L, Wang J L, Cui Y R, et al. Anal. Chim. Acta, 2006, 571(2): 175.
- [14] Ma D L, Cui F L, Xia D S, et al. Anal. Lett., 2002, 35(2): 413.
- [15] MA Dong-lan, HOU Feng-lian, CUI Feng-ling, et al(马东兰, 侯风莲, 崔凤灵, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(5): 755.
- [16] MA Dong-lan, JIANG Ling, LI Jia-ping, et al(马东兰, 蒋 玲, 李建平, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1998, 18(2): 240.
- [17] Cui F L, Cui Y R, Luo H X, et al. Biopolymers, 2006, 83(2): 170.
- [18] SUN Chong-rong, LI Yur-min(孙崇荣, 李玉民编著). The Chemical Guide of Proteins(蛋白质化学导论). Shanghai: The Press of Fudan University(上海: 复旦大学出版社), 1991.
- [19] Yuan T, Weljie A M, Vogel H J. Biochem., 1998, 37: 3187.

Determination of the Proteins in Serum Albumins by Synchronous Fluorescence Technique with 3-(2-Cyanoethyl) Cytosine as a Probe

CUI Feng-ling, WANG Jun-li, CUI Yan-rui, QU Gui-rong, LU Yan, FAN Jing

College of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract Under simulative biological conditions and upon the interactions between 3-(2-cyanoethyl) cytosine (CECT) and human serum albumin (HSA) or bovine serum albumin (BSA), the authors studied the characteristics of synchronous fluorescence spectra of CECT-protein system with CECT as a molecular spectral probe. The spectral characteristics and intensity of synchronous fluorescence were related to the value of $\Delta\lambda$, reaction medium, reaction temperature and so on. On the basis of these, the new method for the determination of proteins in serum albumin was developed with CECT as a molecular spectral probe. Under the optimum experimental conditions, the synchronous fluorescence intensities of CECT-HSA and CECT-BSA systems were in good proportion to the concentrations of HSA and BSA in the ranges of 0-441.4 and 0-351.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The detection limits were 0.023 and 0.035 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. Relative standard deviations located between 12% and 3.3%, and the addition standard recovery was 97.2%-100.4% for all elements. The results suggested that the method features easy of implementation, rapidity, high sensitivity, broad linear range, and better RSD and recovery etc., and was employed directly to determine the total proteins in serum albumin samples with satisfactory results.

Keywords Human serum albumin (HSA); Bovine serum albumin (BSA); 3-(2-cyanoethyl) cytosine (CECT); Synchronous fluorescence spectra

(Received Oct. 6, 2006; accepted Jan. 8, 2007)