

# Fe<sup>3+</sup>-十二烷基苯磺酸钠作探针的 共振瑞利散射法测定血清蛋白<sup>①</sup>

胡庆红<sup>②</sup> 杨阳 江波 袁泽利  
(遵义医学院药理学系 贵州省遵义市大连路 201 号 563003)

**摘要** 在酸性条件下, 十二烷基苯磺酸钠-Fe<sup>3+</sup> 与蛋白质形成离子缔合物, 使共振瑞利散射(RRS)急剧增强。研究了相应的光谱特征, 适宜的反应条件和影响因素。在最佳条件下, 不同蛋白质在一定浓度范围内与散射强度呈良好的线性关系, 可用于多种蛋白质的测定, 方法的检出限在 14.5—53.0ng/mL 之间。本法灵敏、简便和重现性好, 已用于人血清样品中总蛋白含量的测定, 获得满意结果。

**关键词** 共振瑞利散射, Fe<sup>3+</sup>, 十二烷基苯磺酸钠, 蛋白质。

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8138(2008)04-0722-05

## 1 前言

蛋白质是重要的生命物质, 它与营养、发育、遗传、新陈代谢等生命活动有着密切的联系, 可作为人体营养健康、疾病诊断的重要指标, 因此有关蛋白质的研究是目前生命科学和化学领域中一个十分活跃的领域。自从 1993 年 Pasternack 等人<sup>[1]</sup> 首先用共振光散射技术研究了卟啉类化合物在核酸上的聚集, 使共振光散射技术逐步发展成为一门新的分析技术。尽管对该技术的原理还未认识清楚, 但是该技术仍以其简便快捷, 灵敏度高, 仪器操作方便等优点, 得到了广泛的应用。近年来已被成功用于核酸<sup>[2]</sup>、蛋白质<sup>[3]</sup>、无机离子<sup>[4]</sup>、纳米粒子<sup>[5]</sup>、免疫<sup>[6]</sup>、药物<sup>[7]</sup> 等的分析应用。

本文研究了十二烷基苯磺酸钠-Fe<sup>3+</sup> 与蛋白质形成离子缔合物的光谱特征、适宜的反应条件, 探讨了不同反应条件下散射强度的变化因素, 建立了测定人血清样品中总蛋白含量的新方法, 获得了满意的结果。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国瓦里安公司), U-3010 紫外分光光度计(日本日立公司), 奥立龙酸度计(上海热电仪器有限公司)。

蛋白质标准溶液: 牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA, German Heidelberg 公司), 人血清白蛋白(Albumin human bovine, HSA, German Heidelberg 公司),  $\gamma$ -球蛋白( $\gamma$ -G, 日本东京化成株式会社), HSA 和  $\gamma$ -G 质量比为 2:1 的混合标准溶液(H- $\gamma$ ), 以上蛋白质类溶液均为 20 $\mu$ g/mL 溶液。十二烷基苯磺酸钠(Sodium dodecylbenzene sulfonate, SDBS) 110 $\mu$ g/mL, 硫酸铁铵溶液 20 $\mu$ g/mL, B-R(Britton-Robinson) 缓冲液: 0.04mol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 HAc 与 0.2mol/L NaOH 溶液

① 国家自然科学基金(20762017) 资助

② 联系人, 手机: (0) 13595215328; E-mail: huqinghong1963@126.com

作者简介: 胡庆红(1963—), 男, 贵州省遵义市人, 副教授, 研究方向为分子光谱分析。

收稿日期: 2008-06-10; 接受日期: 2008-06-23

按一定比例混合配制成不同 pH 的缓冲液,用酸度计进行校正 pH。

## 2.2 实验方法

在 10mL 比色管中,依次加入 pH2.21 缓冲溶液 1.0mL、SDBS 溶液 1.0mL、硫酸铁铵溶液 1.0mL,加入适量蛋白质标准溶液,用二次蒸馏水定容,摇匀,反应 40min。将溶液于荧光分光光度计以  $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$  方式进行同步扫描,得到共振瑞利散射光谱,然后于共振瑞利散射峰 461nm 处测定缔合物散射光强度  $I$  和试剂空白  $I_0$  的散射光强度差值  $\Delta(I - I_0)$ 。

## 3 结果与讨论

### 3.1 共振瑞利散射光谱

实验了 pH-SDBS- $\text{Fe}^{3+}$  系列蛋白质的共振散射光谱(图 1)。结果表明,当溶液中没有蛋白质存在时,其散射光强度  $I_0$  非常微弱,加入几种不同蛋白质都使体系的散射强度  $I$  显著增大,而  $\text{Fe}^{3+}$  离子的加入进一步提高了散射强度。本体系(pH-SDBS- $\text{Fe}^{3+}$ -蛋白质)的较强散射峰位于 392nm、461nm,其中 BSA 和 HSA 灵敏度较高。而本体系形成的混合溶液几乎无色,其吸收光谱实验表明,在 275—350nm 范围内吸光度值小于 0.1,在 350—700nm 范围内吸光度值小于 0.02。即该体系的较强散射峰 392nm、461nm 处仅有非常微弱的吸收,与通常认为较强散射峰应该位于或接近分子吸收带的理论有差异。

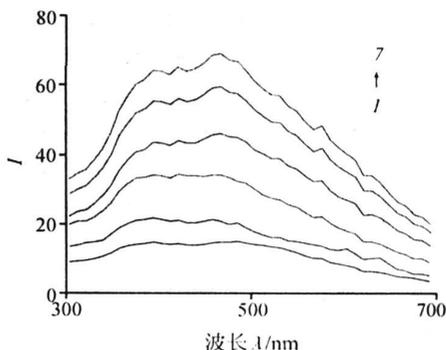


图 1 共振散射光谱

1—pH=2.21, SDBS(11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $\text{Fe}^{3+}$ (0.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  
2—1+ Y-G(4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  
3—1+ H-M(4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  
4—1+ HSA(4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  
5—1+ BSA(4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  
6—pH, SDBS, BSA(6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  
7—1+ BSA(6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

### 3.2 适宜的反应条件

#### 3.2.1 缓冲液 pH 及用量的影响

试验了不同 pH 值的 B-R 缓冲液对缔合物散射强度值的影响。结果表明当 pH 在 1.6—3.0 范围内(图 2),缓冲溶液用量为 0.6—1.5mL 时,体系的  $\Delta I$  最大且试剂空白  $I_0$  值较小,本实验选用 pH2.21 的缓冲溶液 1.0mL。

从酸度对体系的散射强度值实验表明,当溶液的 pH 低于 BSA 的等电点  $pI = 4.7$  时,体系的散射强度值较大。原因是由于此时 BSA 肽链上的氨基酸残基如赖氨酸、精氨酸和色氨酸等质子化而带正电荷;而 SDBS 中磺酸基带负电荷,二者通过静电引力结合。其次 BSA 中非极性的侧链疏水基与 SDBS 中非极性的长链烃基通过疏水力,以及 Van Der Waale 力协同作用,使 SDBS 分子聚集在 BSA 分子表面,  $\text{Fe}^{3+}$  离子通过配位键与 BSA 结合,它们一起形成三元离子缔合物。缔合物的形成导致微粒体积增大<sup>[7-9]</sup>以及聚集体外围的疏水基团与水之间形成疏水的液-固界面<sup>[8,9]</sup>,导致散射增强。当 pH 接近 BSA 的  $pI$  时,BSA 分子质子化程度大大减弱,因此 BSA 与 SDBS 分子的结合也减弱,故表现出体系的散射强度迅速下降。

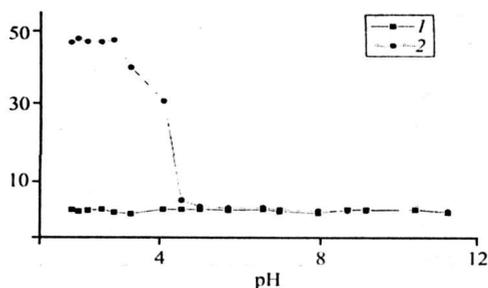


图 2 pH 值的影响

SDBS(11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $\text{Fe}^{3+}$ (0.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), BSA(4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )  
1—(pH-SDBS- $\text{Fe}^{3+}$ );  
2—(pH-SDBS- $\text{Fe}^{3+}$ -BSA)。

### 3.2.2 SDBS 与 $\text{Fe}^{3+}$ 离子浓度的影响

实验了不同浓度  $\text{Fe}^{3+}$  和 SDBS 浓度的影响。结果  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 0.1—1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,体系的  $\Delta I$  大且  $I_0$  小,本实验选用  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 0.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; SDBS 浓度为 5.5—28  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,  $\Delta I$  大且  $I_0$  小,本实验选用 11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。SDBS 的临界胶束浓度<sup>[10]</sup>为 418  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,表明此时 SDBS 未形成胶束,以单分子形式与蛋白质结合。

### 3.2.3 离子强度的影响

以氯化钠和硫酸钠进行离子强度实验(图 3)结果表明:在离子强度较高时,会破坏离子缔合物的形成,使散射强度大大降低,证明了  $\text{Cl}^-$  或  $\text{SO}_4^{2-}$  和 SDBS 将竞争与蛋白质的结合。而在一定的离子强度时,只能使离子缔合物的结构变得松弛、导致缔合物散射强度增大<sup>[8,9]</sup>。

### 3.2.4 共存物质的影响

在 10mL 比色管中,当 BSA 的浓度为 4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,共存物的影响结果(以  $\mu\text{g}/\text{mL}$  计)见表 1。有机溶剂实验表明,较高浓度的甲醇,乙醇,丙酮溶液对散射强度值影响不大。

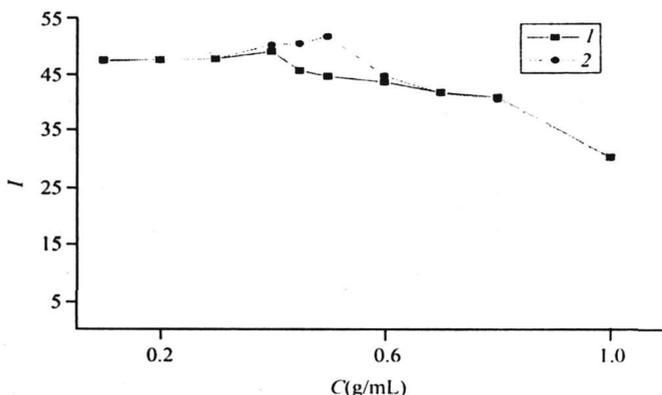


图 3 离子强度的影响

pH= 2.21, SDBS(11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $\text{Fe}^{3+}$  (0.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), BSA(4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )  
1— $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 2— $\text{NaCl}$ 。

表 1 共存物质的影响

共存物质	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$\Delta I$ 变化 (%)	共存物质	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$\Delta I$ 变化 (%)
L-天冬氨酸	600	3.1	DL- $\alpha$ -丙氨酸	750	-2.4
L-精氨酸	600	-5.2	L-谷氨酸	600	-4.7
甘氨酸	600	7.1	$\alpha$ -酮戊二酸	530	0.2
亮氨酸	750	1.9	葡萄糖	1250	-0.1
草酸铵	250	0.7	D-果糖	1500	0.7
尿素	1500	-6.1	盐酸普鲁卡因	100	-1.2
柠檬酸钠	300	-3.7	烟酸	400	-5.6
磷酸	984	4.3	氨基乙酸	480	-8.7
枸橼酸钠	150	4.7	VB <sub>6</sub>	400	-3.7
头孢吡肟	20	-8.4	MgSO <sub>4</sub>	150	-2.2
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150	2.7	KI	500	-5.0
BaCl <sub>2</sub>	165	8.1	MnCl <sub>2</sub>	400	1.4
ZnSO <sub>4</sub>	250	0.3	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	50	3.1
CuSO <sub>4</sub>	200	6.4	KSCN	50	2.6
CaCl <sub>2</sub>	250	5.5	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	200	-0.7

### 3.3 校准曲线及方法灵敏度

按照实验方法,研究了不同蛋白质的反应,并以  $\Delta I$  对不同蛋白质浓度绘制了相应的校准曲线(表 2)。

### 3.4 样品测定

取入血清样品 0.30mL 于 100mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,再稀释 10 倍。取上述试液

1. 0mL, 按照实验方法, 于共振散射峰 461nm 处测定散射光强度差值  $\Delta I(I - I_0)$ 。在人血清总蛋白中主要含有 HSA 和  $\gamma$ -G, 其质量比大约为 2 : 1<sup>[11]</sup>, 从表 2 可知, 人血清中 HSA 和  $\gamma$ -G 的响应相差较大, 因此将 HSA 和  $\gamma$ -G 按照质量比 2 : 1 混合配制 20 $\mu$ g/mL 溶液, 制得 H- $\gamma$  校准曲线(表 2)。然后以此计算血清总蛋白含量(表 3), 结果与经典的考马斯亮蓝法(CBBG-250)<sup>[12]</sup>一致, 并有较好的回收率。

表 2 几种蛋白质的校准曲线

蛋白质*	$\lambda_{\max}$ (nm)	校准曲线	线性范围( $\mu$ g/mL)	相关系数( $r$ )	检出限( $3\sigma$ ng/mL)
BSA	461	$\Delta I = 10.14C + 4.25$	0—8.0	0.9952	14.8
	392	$\Delta I = 10.41C + 3.26$	0—8.0	0.9959	14.5
HSA	461	$\Delta I = 7.68C + 0.61$	0—6.0	0.9993	19.5
	392	$\Delta I = 8.13C + 0.65$	0—6.0	0.9994	18.6
$\gamma$ -G	461	$\Delta I = 2.83C + 1.81$	0—6.0	0.9941	53.0
	392	$\Delta I = 3.36C + 1.11$	0—6.0	0.9948	44.9
H- $\gamma$	461	$\Delta I = 4.54C + 1.37$	0—5.0	0.9986	33.0
	392	$\Delta I = 4.82C + 1.36$	0—5.0	0.9975	31.3

表 3 人血清样品中总蛋白质量测定结果

样品	CBBG-250 法		本法		本法回收率(BSA)	
	平均值(g/L)	RSD(%) ( $n=4$ )	平均值(g/L)	RSD(%) ( $n=4$ )	回收率(%)	RSD(%) ( $n=4$ )
1	78.3	1.9	77.6	2.2	96.2—103.1	1.9
2	66.4	1.7	65.9	1.8	93.8—101.6	2.2

## 参考文献

- [1] Pasternack R F, Bustamante C, Collings P J *et al.* Porphrin Assemblies on DNA as Studied by a Resonance Light-Scattering Technique[J]. *J Am Chem Soc*, 1993, **115**(13): 5393—5399.
- [2] Huang C Z, Li Y F, Huang X H *et al.* Interactions of Janus Green B with Double Stranded DNA and the Detection of DNA Based on the Measurement of Enhanced Resonance Light Scattering[J]. *Analyst*, 2000, **125**(9): 1267—1272.
- [3] Liu S P, Yang R, Liu Q. Resonance Rayleigh Scattering Method for the Determination of Proteins with Orange G[J]. *Analytical Science*, 2001, **17**(2): 243—247.
- [4] 杨静, 廖力夫, 刘运美等. 钴-TAN-阴离子表面活性剂体系的共振瑞利散射及其分析应用[J]. *分析实验室*, 2008, **27**(1): 100—102.
- [5] Jiang Z L, Liu Q Y, Liu S P. Resonance Scattering Spectral Analysis of Chlorides Based on the Formation of (AgCl)<sub>n</sub>(Ag)<sub>s</sub> Nanoparticle[J]. *Spectrochim Acta, Part A*, 2002, **58**: 2759—2764.
- [6] 邓俊耀, 孙双娇, 蒋治良等. 免疫球蛋白 G 的免疫共振散射光谱分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, **26**(8): 1487—1489.
- [7] 唐晓玲, 刘忠芳, 刘绍璞等. 苯海拉明与赤藓红相互作用的吸收、荧光和共振瑞利散射光谱及其分析应用[J]. *中国科学 B 辑*, 2007, **37**(1): 68—75.
- [8] 刘绍璞, 蒋治良, 孔玲等. [HgX<sub>2</sub>]<sub>n</sub> 纳米微粒的吸收光谱、Rayleigh 散射和共振 Rayleigh 散射光谱[J]. *中国科学, B 辑*, 2002, **32**(6): 554—560.
- [9] 刘绍璞, 王芬, 刘忠芳等. 盐酸表柔比星与核酸相互作用的共振瑞利散射光谱研究及其分析应用[J]. *化学学报*, 2007, **65**(10): 962—970.
- [10] 裘炳毅. 化妆品化学与工艺技术大全[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1986. 816.
- [11] 王同明. 生物化学及检验技术[M]. 宜兴市: 江苏科技出版社, 1993. 162.
- [12] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248—254.

# Resonance Rayleigh Scattering Method for Determination of Serum Protein with $\text{Fe}^{3+}$ - Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate as Probe

HU Qing-Hong YANG Yang JIANG Bo YUAN Ze-Li

(Pharmaceutical Science Department, Zunyi Medical College, Guizhou, Zunyi 563003, P. R. China)

**Abstract** In acid medium, protein can react with sodium dodecyl benzene sulfonate to form ion-association complexes, which enhance the resonance Rayleigh scattering (RRS) intensity greatly. In this paper, the optimum reaction conditions, the influencing factors and the spectrum characteristic of the system have been investigated. Under optimum condition, The RRS ( $\Delta I$ ) intensity is linear to the concentration of different proteins. This method was convenient, better repeatability, and the detection limits was at the range 14.5—53.0 ng/mL for many kinds of protein. It was applied to analysis of total protein in human serum sample, with satisfactory results.

**Key words** Resonance Rayleigh Scattering,  $\text{Fe}^{3+}$ , Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate, Protein.

## 伟人已逝 风范长存 ——纪念卢嘉锡先生

章振乾

去年6月4日卢嘉锡先生走完了他的生命历程。许多人哀悼、赞颂他；许多人在默默的追忆、怀念他。先生是中外闻名的大学者，是广孚众望的一位国家领导人；又曾经是民主党派的首脑，我的老友和挚友。

我和卢先生早于建国之初就共事于厦门大学，论交已及半个世纪。他到北京任职之后，每次回到福州，我俩都聚首谈心。此次回来治病，不幸竟成永别！比我年少的他先我而去。我怎能不万分痛惜和哀痛呢！

我这里只说我所熟知之事。直到晚年，他虽忙于国事，但他的心始终不离科研第一线，他关心国内外科学的进展和动态，关心门生故旧在学术上取得的成就，他常年身在北京，而家却在福州，他的夫人吴逊玉大姐在福州疗养，他通常每年都回来三、四次。按理说，每次回家那难得的几天，该好好修养一下；但他却不然，还像只是换个工作地点，除了预定的约会，他每天都在自己的工作室潜心于科研。

中国自古至今有许多人，一做了官，便废了学，所谓“一行作吏，此事便废”，而他却不为此。他不仅源源不断地出了科研成果，而且在福建，他以福州大学和福建物质结构研究所为基地，指导后辈在科技前沿探索创新，为国家做出贡献。

我们知道，卢先生与英国著名科学家李约瑟有很深的友谊，当他离开中国科学院院长职位时，还自告奋勇，把出版李约瑟多卷《中国科学技术史》这浩瀚巨著的中译本，作为科学院的任务而担当起来。历史上，

(作者系福建省民盟名誉主委、原厦门大学教务长，原载《福建统一战线》2002年第1期)

我们中华民族曾有举世瞩目的科技成就，他期望现今我国科学技术再创辉煌，并为之竭尽心力。

卢先生对祖国怀有赤子之情，对事业显出赤子之诚。他在科研工作上求真存实，处事待人急公好义；他热衷培养后辈，乐于助人。我随便举出一例：当他知道一位年逾八旬的厦大离休教授身患癌症，长期以来因居住条件差而耿耿于怀，主动帮其解决了住房问题。这也许只是一件小事，他也能认真切实去办。为此感动了许多人。

更加难能可贵的是，卢先生的宽广襟怀与崇高抱负。他引用曾子“吾日三省吾身”的名言作为自己的座右铭。他的“三省”是：为“四化”大业谋而不忠乎？与国内外交流学术而缺乏创新乎？奖掖后进而不落实乎？他自己做出表率，在教学上，科研上和领导工作上，对学生、助手和有关人员也都是严格要求的，这严格要求出于关心、爱护，也是对事业尽责。

回想过去，在“左”的路线干扰下，在多次政治运动中，他也曾经遭受恶意中伤，但他总是泰然处之。过后对那些攻击过他的人，他也从不计较，他怀有信念往前看，君子坦荡荡。我国进入新的历史时期，看今朝盛世，过早离开人世的他，我深信他会因未能眼见祖国完全统一和振兴中华之宏愿而感到遗憾的。

一代宗师像一颗巨星般损落了，但先生的精神与风范长在，先生遗留的宏愿也必将实现的。