

人血清中总蛋白的近红外荧光测定

郑洪¹, 朱昌青², 李东辉¹, 陈秋影¹, 陈小兰¹, 许金钩¹

(1. 厦门大学化学系, 福建 厦门 361005; 2. 安徽师范大学化学系, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 建立了以阴离子花菁染料—CTAB 体系依近红外荧光增强测定人血清总蛋白的方法. 最大激发及发射波长分别为 765nm 及 812nm. 蛋白质测定的线性范围为 0.4~12 μ g/mL.

关键词: 近红外荧光; 人血清; 蛋白

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

测定总蛋白的方法很多, 如 Lowry 法, 双缩脲法及凯氏定氮法, 但这些方法在测定的简单性及方法的灵敏性方面还不太令人满意. 本文报道一种基于表面活性剂诱导形成的近红外荧光染料二聚体与蛋白质作用后产生的荧光增强来测定人血清中总蛋白的方法. 该法在近红外区测定, 可有效减少背景荧光及散射光的干扰, 方法简单, 灵敏度高.

1 试剂及仪器

近红外荧光染料系本实验室参照文献^[1]路线自行合成的新化合物, 以二次去离子水稀释成 1.0mmol/L 储备液于 1~4℃ 冰箱保存. 牛血清白蛋白(中国科学院生物化学研究所), 以二次去离子水配成 100 μ g/mL 储备液于 1~4℃ 冰箱保存. 标准参考血清(人血清, 以凯氏定氮法测定总蛋白浓度为 75.3mg/mL). 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), 分析纯, 以二次去离子水配成 10mmol/L. Hitachi 650 - 10S 荧光光谱仪.

2 实验方法

在 10 mL 容量瓶中依次加入 0.15 mL pH5.0 的 0.2 mol/L HAc - NaAc 缓冲溶液、0.3 mL 10mmol/L CTAB 水溶液、0.8 mL 10 μ mol/L 的近红外染料水溶液及一定量的牛血清白蛋白溶液, 以二次去离子水稀释到刻度, 摇匀后即可测定.

3 荧光光谱的测定

该近红外染料水溶液的荧光激发波长是 765 nm, 荧光发射波长是 795 nm. 在适当的阳离子表面活性剂(如 CTAB)浓度下, 染料形成了几乎无荧光的二聚体. 当在此体系中加入蛋白质时, 体系的荧光强度逐渐回升, 且染料的最大发射波长由 795 nm 红移至 812 nm.

4 分析条件的选择

实验结果表明, pH 值在 4.8~5.2 范围内, 近红外花菁染料浓度为 0.6~1.0 μ mol/L, 温育时间在 30 min 内, 体系的 F_0/F 达到最大.

收稿日期: 1999 - 06 - 17

作者简介: 郑洪 (1967 -), 男, 博士研究生.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29775021)

5 标准工作曲线及精密度

体系荧光的增强在 0.4 ~ 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA 及标准参考血清的浓度范围内呈现良好的线性关系, 线性回归方程为 $F = 23.59 + 34.87 C$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$), 相关系数 $r = 0.9971$, 相对标准偏差 $\text{RSD} = 1.14\%$ (6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, $n = 6$), 检测限为 70ng/ mL.

6 血清样品的测定及标准回收

取血清样品 3 份, 测定其蛋白含量及回收率, 结果如表 1 所示. 样品加标回收率为 93 % ~ 105 %.

表 1 血清样品分析

试样	检出量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$		加入量 ²⁾ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/ %
	本法 ¹⁾	Biuret 法			
A	79.3	73.4	2.50	2.58	1.75
B	72.9	75.1	2.50	2.63	2.01
C	60.8	63.7	2.50	2.32	1.67

注: 1) 5 次测定平均值, 测定时样品稀释 10000 倍; 2) 测定时样品稀释 30000 倍

参考文献:

[1] Mujumdar R B, Ernst L A, Mujumdar S R, et al. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters [J]. Bioconjugate Chem, 1993, 4 (2): 105.

The Determination of Total Protein of Human Serum by Near - IR Fluorescence Enhancement

ZHENG Hong¹, ZHU Chang - qing², LI Dong - hui¹, CHEN Qiu - ying¹, CHEN Xiao - lan¹, XU Jin - gou¹

(1. Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China; 2. Department of Chemistry, Anhui Normal University, Anhui Wuhu 241000, China)

Abstract: A fluorometric method has been developed for the determination of total protein in human serum with a new near - IR reagent as a fluorescence probe, based on the fluorescence enhancement of the cyanine - CTAB system in the presence of protein. Maximum fluorescence is produced with maximum excitation and emission wavelengths at 765 and 812nm, respectively. Under optimal conditions, the calibration graphs are linear over the range 0.4 ~ 12.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for protein. The detection limit is 70ng/ mL. The relative standard deviation of six replicate measurements is 1.14 % for BSA of 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ level. The results are satisfactory.

Keywords: near - IR fluorescence; human serum; protein