

2'-脱氧胞苷探针测定血清样品中蛋白质含量

丁素君^{1,2}, 李路瑶¹, 崔凤灵¹

(1. 河南师范大学 化学化工学院, 河南 新乡 453007; 2. 漯河医学高等专科学校 基础医学部, 河南 漯河 462002)

摘要:白蛋白在血浆总蛋白中占有很大的比例, 高达40%~60%, 它在人体内起着至关重要的作用, 可以通过分析蛋白质的含量来反映人体的健康状况. 人血清白蛋白表面具有多样化的结合位点, 2'-脱氧胞苷能够与人血清白蛋白(HSA)相结合, 但由于这种结合改变了HSA的结构, 其荧光性质也就随之发生了改变. 发明了一种新的测定蛋白质的方法, 用2'-脱氧胞苷作荧光探针分子结合固定波长同步荧光光谱法对蛋白质的含量进行分析. 在一定的条件下, 当HSA的浓度满足在 $1.38\sim 276\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 这一条件时, 溶液的同步荧光强度(I_{SF})与HSA的浓度具有确定的线性关系. 通过测定11份空白溶液发现检出限为 $0.024\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($n=11$). 对实验条件进行了探究, 发现溶液的pH值、扫描波长的变化量($\Delta\lambda$)、试剂的加入顺序以及溶液的离子强度等因素都会影响体系荧光光谱特征及强度. 还测量了人血清中的蛋白含量, 回收率在98.4%~104.3%范围内.

关键词:人血清白蛋白; 同步荧光光; 分子探针; 2'-脱氧胞苷

中图分类号: O657.3

文献标志码: A

蛋白质是生物体内重要的物质, 生物化学、食品检测、临床检验、质量检验、药物的分离和提纯等重要检测中, 蛋白质的定性和定量分析都起着关键性作用^[1]. 目前, 测定蛋白质含量的方法很多, 常见的经典方法有凯氏定氮法、双缩脲法、Folin-酚法^[2]、考马斯亮蓝法、紫外分光光度法^[3]、金属-染料结合分光光度法^[4]、荧光光度法^[5]、共振瑞利散射法、化学发光法等. 人血清白蛋白(Human Serum Albumin, 简称HSA)在人血浆蛋白中占有相当大的比例, 是人体内重要的储存和输运物质^[6], 例如, 体液中有可以运输脂肪酸、金属离子、氨基酸等物质的蛋白, 还有许多蛋白可以作为治疗分子, 蛋白质还可以维持血液渗透压, 同时能够使血液的容量得到提高. 人血清蛋白主要由585个氨基酸残基组成, 被分为3个同源域(I-III), 每个域含有A和B两个子域, 被17个二硫键连接固定^[7]. 从HSA的晶体结构中得知, 在IA和IIA子域的憎水空腔内, 有两个主要的高亲和位点: Sudlow site I (warfarin点)、Sudlow site II (indole点)^[8]. 血清白蛋白上的Trp位于IIA子域^[9]并且在Sudlow site I (warfarin点)上, 因此当小分子与血清白蛋白结合时, 其荧光性质就会发生变化. 机体内蛋白含量的变化会直接影响到机体的正常工作, 因此可以通过分析蛋白质的含量来反映人体的健康状况, 并且药物的治疗效果在很大程度上依赖于药物分子与蛋白的结合能力^[10], 因此蛋白质含量的确定在医学及生物学方面都具有重要的意义. 目前, 研究药物分子怎样与血清白蛋白结合的方法有很多种, 如傅里叶变换红外光谱^[11]、电化学方法^[12]、液相色谱法^[13]、荧光光度法^[14]和圆二色谱法^[15]等测试技术. 同步荧光光谱法与某些传统分析方法相比具有很多优点, 例如灵敏度高、选择性强、谱带简化、散射光影响小. 核苷是生物体的基本结构单元, 是核酸的重要组成部分, 具有显著的生理功能^[16-17]. 由于核苷类化合物具有抑制病毒复制的作用, 因此能够很好地抵抗病毒^[18], 目前在药物化学中对其的研究已经广泛的受到人们的关注. 2'-脱氧胞苷是核苷类药物合成中重要的中间体, 它还可以被进一步合成具有抗癌、抗菌、抗病毒等作用的核苷类药物. 但目前用以2'-脱氧胞苷为分子探针通过固定波长同步荧光光谱法的方法来测定血清中白蛋白含量

收稿日期: 2016-03-21; 修回日期: 2016-06-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30970696); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A150018); 河南省重点科技攻关项目(142102310273)资助.

第1作者简介: 丁素君(1982-), 女, 河南漯河人, 漯河医学高等专科学校讲师, 主要从事食品、药品分析.

通信作者: 崔凤灵(1963-), 女, 山东郓城人, 河南师范大学教授, 博士, 主要从事荧光分析, E-mail: fenglingcui@hotmail.com.

还未见报道. 与其他方法相比, 本文中介绍的测定蛋白质含量的方法具有简单、易操作、灵敏度高等优点. 下面是 2'-脱氧胞苷的分子结构示意图.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

主要试剂: 2'-脱氧胞苷(2'-Deoxycytidine)水溶液($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 人血清白蛋白(Human Serum Albumin, 华兰生物工程股份有限公司)水溶液($2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 在冰箱中(调至温度为 $1 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$)保存备用; NaCl 水溶液($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); Tris-HCl(Tris 为三羟基甲基氨基甲烷)缓冲溶液($\text{pH}=7.40$). 实验过程中所有用到试剂的规格级都是分析纯, 试验用水为高纯水.

主要仪器: Cary Eclipse 荧光分光光度计(VARIAN, USA); PHSJ-4F 型实验室 PH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司); BSA224S 型电子天平(武汉科赛思机电有限公司).

1.2 实验方法

分别用量程合适的移液管吸取 1.5 mL NaCl 水溶液($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 2.0 mL Tris-HCl 缓冲溶液($\text{pH}=7.4$)、一定体积 HSA 水溶液($2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 1.0 mL 的 2'-脱氧胞苷溶液($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)依次加入 10 mL 比色管中, 然后用高纯水定容至刻度, 摇晃均匀, 开始进行荧光测试, 各参数设置分别为 $\Delta\lambda=50 \text{ nm}$, 荧光发射与激发的狭缝宽度均为 5 nm , 以同步荧光信号(相对强度)对激发波长得到同步荧光光谱图, 实验中运用控制变量法, 即 2'-脱氧胞苷水溶液的浓度一定, 令 HSA 水溶液的浓度等梯度浓度增加, 进行扫描.

2 实验结果与讨论

2.1 2'-脱氧胞苷-HSA 体系的荧光猝灭光谱图

图 2 为 2'-脱氧胞苷对 HSA 的内源荧光猝灭光谱图. 由图 2 可以看出, 当 2'-脱氧胞苷溶液浓度不断增加, HSA 的内源荧光强度(I_F)会随之有规律的降低, 从图 2 还可以清楚地看到, 当激发波长在 280 nm 时, HSA 在 340 nm 左右会出现较强的荧光, 这些实验现象说明 2'-脱氧胞苷与人血清白蛋白发生了相互作用, 从而使人血清白蛋白发色团周围的微环境发生了变化, 最终导致体系的荧光强度发生改变.

2.2 同步荧光光谱特征

同步荧光光谱按照固定的物理量, 可分为固定波长和固定能量的两种同步荧光光谱图. 在本实验中, 采用的是由 Lloyd^[18]提出的固定波长的同步荧光光谱法对人血清白蛋白进行研究. 图 3 是在各实验条件最优的情况下 2'-脱氧胞苷与 HSA 体系的同步荧光光谱图, 由图 3 可以清楚地知道, 当 HSA 浓度的增加有所增加, 同步荧光强度就会随之有规律的增大, 并且当人血清蛋白的溶度符合一定要求时, 此体系的同步荧光强度与人血清白蛋白的浓度具有确定的线性关系. 根据此线性关系, 用 2'-脱氧胞苷作荧光探针分子并结合固定波长同步荧光光谱法对蛋白质的含量进行分析.

3 实验条件的选择

3.1 选择合适的试剂加入顺序

本实验随意对 8 组溶液进行同步荧光信号扫描, 这 8 组溶液除了试剂加入顺序不同, 其他实验条件均相同. 8 组溶液试剂加入顺序分别为 Tris-HCl→NaCl→HSA→2'-脱氧胞苷、NaCl→HSA→2'-脱氧胞苷→Tris-HCl, HSA→2'-脱氧胞苷→Tris-HCl→NaCl, 2'-脱氧胞苷→Tris-HCl→NaCl→HSA, 2'-脱氧胞苷→HSA→NaCl→Tris-HCl, HSA→NaCl→Tris-HCl→2'-脱氧胞苷, NaCl→Tris-HCl→2'-脱氧胞苷→HSA, Tris-HCl→2'-脱氧胞苷→HSA→NaCl. 经过探究发现当以“Tris→NaCl→HCl→HSA→2'-脱氧胞苷”的顺序加入时, 溶液的同步荧光信号最强, 因此这 8 组加入顺序里 Tris→NaCl→HCl→HSA→2'-脱氧胞

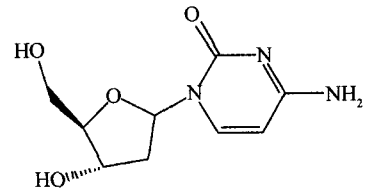
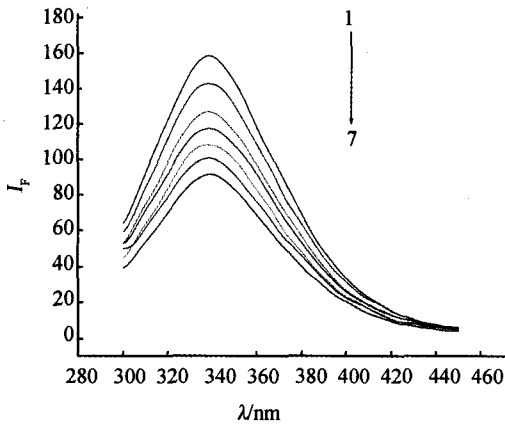


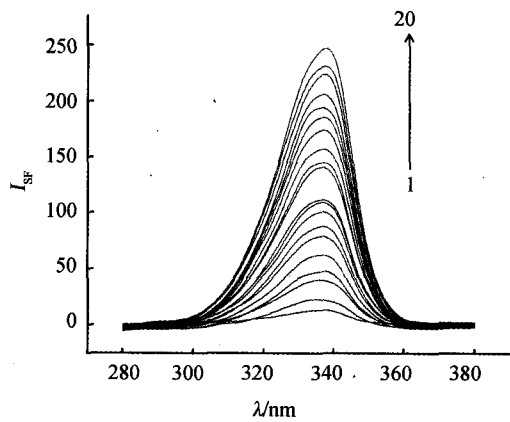
图1 2'-脱氧胞苷的分子结构(分子式量: 227.22)

皆是最好的加入顺序,实验中所有溶液的加入顺序均为此顺序.



$C_{HSA} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 从1→7, $C_{2\text{'-脱氧胞苷}} = 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

图2 血清白蛋白与2'-脱氧胞苷相互作用的荧光猝灭光谱图



$C_{2\text{'-脱氧胞苷}} = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 从1→20, $C_{HSA} = 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0 \times 2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

图3 HSA与2'-脱氧胞苷在最佳实验条件下的同步荧光光谱图

3.2 选择最佳的缓冲溶液用量

本实验为了探究缓冲溶液的用量对体系同步荧光强度的影响从而选择最佳的缓冲溶液用量,具体方法为在其他量不变的情况下只改变缓冲溶液的用量,观察同步荧光信号的变化.实验中分别取 pH 值为 7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液 0~3.0 mL 进行荧光测试,通过对比荧光强度可以看出,当 Tris-HCl 缓冲溶液的值取为 1.5 mL 时,同步荧光信号的强度最大.因此,在进行实验的过程中 Tris-HCl 缓冲溶液均取 1.5 mL.

3.3 选择最好的离子强度

经过大量的实验认证发现,当离子浓度范围在 0~3.5 mL 之间时,离子浓度对体系才会对同步荧光强度有一定的影响,并且 NaCl 的最佳用量及最佳浓度分别为 2.0 mL 和 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,因为此条件下的同步荧光强度最大,且此时体系的灵敏度最高.所以实验中 NaCl 的用量为 2.0 mL,浓度为 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

3.4 选择适当的仪器测量参数

在同步荧光技术中,Δλ 直接关系到实验的灵敏度和选择性,因此 Δλ 的合适取值在实验过程中显得尤为重要.在其他条件一定的情况下,分别设置 Δλ 为 10、15、20、30、40、50、60、70、80 和 90 nm,观察体系的同步荧光光谱特征.结果显示,当 Δλ=50 nm 时,实验结果最为理想.所以,本次实验中,选择设置 Δλ=50 nm.

3.5 工作曲线、线性范围、检出限

按照 IUPAC 的规定^[13],为了减小随机误差,取 11 份同一试样,在相同的操作条件下对它们进行测定,得到其相应的检出限为 $0.021 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.在各个实验条件为最佳的情况下以体系的同步荧光强度为纵坐标,HSA 的浓度为横坐标绘制标准工作曲线(如图 4).由图 4 可知,在 $2.76 \sim 234.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内,溶液的荧光强度与 HSA 的浓度具有良好的线性关系;其线性回归方程为 $I_{SF} = 122.24x(\text{mL}) + 3.46 (M_{HSA} = 69\ 000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1})$,相关系数 $R = 0.9993$.

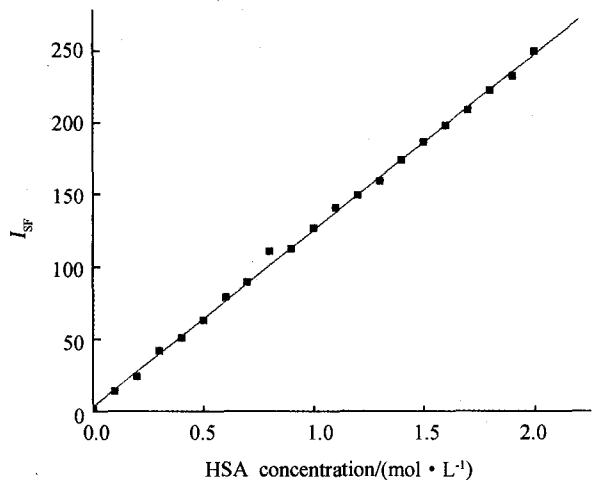


图4 同步荧光强度对HSA浓度绘制标准工作曲线

3.6 共存离子的影响

在各实验条件均满足以上所说的最佳的实验条件情况下,探究了在某些离子存在的情况下,此法

2.76 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 人血清白蛋白(HSA)的测定结果,发现相对误差控制在 $\pm 5\%$ 之内.实验结果见表1.

表1 共存离子对测定人血清白蛋白的影响

共存离子	干扰倍率	误差
K^+	0.362	-4.2
NH_4^+	0.181	-3.4
Ca^{2+}	0.362	-4.1
CO_3^{2-}	0.362	-4.8
SO_4^{2-}	0.362	4.4

3.7 样品的测定

人的血清中蛋白质的含量很高,浓度比较大,远远超出了具有线性关系的浓度范围,因此在测定前要将样品用二次去离子水稀释到2.76~234.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内,放入冰箱保存待用.用本文中提供的试验方法对样品即人血清进行加标回收实验,表2为测定结果.

表2 血清样品的测定结果 (n=6)

样品	加入量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	测得值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率/%	RSD/%
血清	0	104.0		0.49
加标样品1	27.6	132.8	104.3	0.65
加标样品2	55.2	158.3	98.4	0.79
加标样品3	82.8	189.6	103.3	0.18

4 结论

本实验用2'-脱氧胞苷作荧光探针分子结合固定波长同步荧光光谱法对蛋白质的含量进行分析.还考察了波长差 $\Delta\lambda$ 、离子强度、缓冲溶液用量、加入顺序、人血清白蛋白用量等实验条件对体系测定结果的影响.经过一系列的改变实验条件,找出最佳的实验条件,在选定的最佳实验条件下,对此次实验中的样品进行了加标回收实验,得到加标回收率在98.4%~104.3%的范围内,所得到的实验结果比较准确.

参 考 文 献

- [1] 乐萍,雷颖,熊建铭.蛋白质测定方法比较与研究进展[J].江西化工,2007(2):50-52.
- [2] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1997.
- [3] Korenaga T, Stewart K K. Seeking high-sensitivity flow injection analysis[J]. Anal Chim Acta,1988,214:87-95.
- [4] Satoka A. Determination of human serum albumin by chemiluminescence immunoassay with luminol using a platinum-immobilized flow-cell[J]. Anal Chim Acta,2001,436(1):103-108.
- [5] Saito Y, Okazaki Y, Sano S, et al. A sensitive spectrofluorimetric method for tination of total protein in human serum by near infrared fluorescence recovery[J]. Fresen J Anal Chem,2000,368(5):511-515.
- [6] Nahid S, Monireh F, Saba H, et al. Molecular modeling and multispectroscopic studies of the interaction of hepatitis B drug, adefovir dipivoxil with human serum albumin[J]. J Lumin,2015,167:339-346.
- [7] Chen T T, Zhu X T, Chen Q, et al. Interaction between Z-ligustilide from Radix Angelica sinensis and human serum albumin[J]. Food Chem,2015,186:292-297.
- [8] Ashima M, Jayanta K, Sandip K, et al. Interaction of ANS with human serum albumin under confinement: Important insights and relevance[J]. J Lumin,2015,167:316-326.
- [9] Peng X, Wang X C, Qi W, et al. Affinity of rosmarinic acid to human serum albumin and its effect on protein conformation stability[J]. Food Chem,2016,192:178-187.
- [10] Parvez A, Sumit K C, Tamanna A, et al. Biophysical and molecular docking insight into the interaction of cytosine β -D arabinofuranoside with human serum albumin[J]. J Lumin,2015,164:23-130.
- [11] Renjith R, Sheena M Y, Hema T V, et al. Spectroscopic investigation (FT-IR and FT-Raman), vibrational assignments, HOMO-LUMO analysis and molecular docking study of 1-hydroxy-4,5,8-tris(4-methoxyphenyl) anthraquinone[J]. J Phys Chem Solids,2015,87:110-121.
- [12] Bi S Y, Yan L L, Wang B B, et al. Spectroscopic and voltammetric characterizations of the interaction of two local anesthetics with bo-

- vine serum albumin[J]. *J Lumin*, 2011, 131(5): 866-873.
- [13] Shen Q, Jin R Y, Xue J, et al. Analysis of trace levels of sulfonamides in fish tissue using micro-scale pipette tip-matrix solid-phase dispersion and fast liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Food Chem*, 2015, 194: 508-515.
- [14] Huo R N, Li C, Cui F L, et al. Spectroscopic and molecular modeling studies of the interaction between 4'-O-(α -L-Oleandrosyl) daunorubicin and Human Serum Albumin and Its Analytical Application[J]. *J Fluor*, 2012, 22: 111-119.
- [15] Liu Y Y, Zhang G W, Liao Y J, et al. Binding characteristics of psoralen with trypsin; Insights from spectroscopic and molecular modeling studies[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Mole Biomole Spectro*, 2015, 151: 498-505.
- [16] Alba F T, Immacolata S, Miguel A, et al. Development of an immobilized biocatalyst based on *Bacillus psychrosaccharolyticus* NDT for the preparative synthesis of trifluridine and decytabine[J]. *Catal Today*, 2015, 259: 197-204.
- [17] Jason M H, Justin L G, Ryan D T, et al. Real-time monitoring of extracellular adenosine using enzyme-linked microelectrode arrays[J]. *Biosens Bioelectro*, 2015, 75: 512-517.
- [18] 吴耀文, 蒋宇扬, 付 华, 等. 抗癌核苷类似物[J]. *有机化学*, 2003, 23(10): 1091-1098.

Determination of Protein by Synchronous Fluorescence Technique with 2'-Deoxycytidine as Probe

DING Sujun^{1,2}, LI Luyao¹, CUI Fengling¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Hennan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Basic Medical Department, Luohe Medical College, Luohe 462002, China)

Abstract: The percentage of the albumin is large which reaches 40%—60%. It plays a vital role in the human body. The health of human body can be known by the content of protein. The binding sites on the surface of HSA are diversified, and 2'-Deoxycytidine can react with human serum album. But the fluorescence have been altered because of the change on the structure of HSA. In this article, we reported a new method for the proteins determination by synchronous fluorescence spectrometry using 2'-Deoxycytidine as a fluorescence probe. The linear range of the synchronous fluorescence method was 1.38—262.2 mg · L⁻¹ with the detection limit 0.024 μ g · mL⁻¹ ($n=11$) for HSA. We found that the characterization and intensity of synchronous fluorescence spectral were related to the value of $\Delta\lambda$, pH, ionic strength and so on by researching the experimental conditions. And the determination of the proteins in human serum samples was detected and the RSD was 98.4%—104.3%.

Keywords: human serum albumin; synchronous fluorescence spectrum; fluorescence probe; 2'-deoxycytidine