一种基于二喹啉甲酸- Cu^+ 显色反应的毛细管电泳 检测蛋白质的新方法

孟庆威, 郭磊, 申睿, 谢剑炜*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 : 采用毛细管电泳法和蛋白质显色反应-二喹啉甲酸(BCA)法, 结合微波辅助反应, 在 60 mmol/L 硼酸盐缓冲液(pH 9.5)中, 实现了对蛋白质的快速毛细管电泳分析检测。同时以 β -环糊精为包含添加剂, 实现了 BCA-Cu^+ 复合物和游离 BCA 的分离, 从而在波长 200 nm 处以测定特征生成的 BCA-Cu^+ 复合物来间接检测蛋白质, 其峰强度比直接检测蛋白质自身吸收的峰强度提高了 2 个数量级。对于转铁蛋白、蓖麻毒素, 其线性范围分别为 2 ~ 200 mg/L 和 2 ~ 100 mg/L, 检出限分别为 0.33 和 0.37 mg/L。将该方法成功地应用于第一届蓖麻毒素国际实验室间比对测试的部分样品, 含量测定结果满意。

关键词 : 毛细管电泳; 二喹啉甲酸; 亚铜离子; 显色反应; β -环糊精; 蛋白质

中图分类号 : O658 **文献标识码** : A **文章编号** : 1000-8713(2010)07-0682-06

A novel capillary electrophoretic method for protein determination using bicinchoninic acid- Cu^+ colorimetric reaction

MENG Qingwei, GUO Lei, SHEN Rui, XIE Jianwei*

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract : A new rapid, sensitive method for protein determination using capillary electrophoresis and specific colorimetric reaction of bicinchoninic acid (BCA) was established, assisted by microwave incubation. With 60 mmol/L boric acid buffer (pH 9.5) and inclusion additive of β -cyclodextrin, the complex of BCA-Cu^+ and free BCA molecules were efficiently separated. The peak intensity of BCA-Cu^+ was higher than those of native proteins about two orders of magnitude at a low wavelength of 200 nm. The linear ranges of this method were from 2 to 200 mg/L for transferrin, and 2 to 100 mg/L for ricin. The limits of detection for transferrin and ricin were 0.33 and 0.37 mg/L, respectively. This method was also successfully applied in the determination of some ricin samples in the First International Proficiency Test on the quantification of ricin.

Key words : capillary electrophoresis (CE); bicinchoninic acid (BCA); Cu^+ ; colorimetric reaction; β -cyclodextrin; protein

蛋白质是生命体行使生理功能的重要生物大分子之一。针对功能蛋白质的高灵敏度检测新方法的研究一直是生命科学领域的研究热点之一。针对蛋白质的高灵敏度显色体系研究是生物传感、原位示踪、蛋白质/多肽药物的含量、纯度以及酶活力测定等方面的基础^[1], 相关显色反应如 Bradford 法(考

马斯亮蓝 G-250 染料结合蛋白质)^[2]、双缩脲法(Cu^{2+} 与蛋白质的肽键在碱性条件下生成紫红色配合物)^[3]、Lowry 法(蛋白质中的酪氨酸和色氨酸残基与 Folin 试剂反应产生蓝色)^[4]和二喹啉甲酸(BCA)法^[5]等已经在蛋白质分析中有大量的实际应用。其中 BCA 方法的应用最为广泛^[5,6]。

* 通讯联系人: 谢剑炜, 研究员, 博士生导师。Tel : (010) 68225893, E-mail : xiejw@nic.bmi.ac.cn.

基金项目 : 国家自然科学基金项目(No. 20705039).

收稿日期 2010-03-05

本文将毛细管电泳(CE)方法和BCA法结合起来,以 β -环糊精(β -CD)为包合添加剂,实现了 BCA-Cu^+ 复合物和过量游离BCA分子的分离。通过微波辅助反应达到 BCA-Cu^+ 快速、完全显色的目的,实现了在低波长处对蛋白质的高灵敏度检测。本方法已成功地应用于第一届蓖麻毒素国际实验室间比对测试蓖麻毒素蛋白样品的检测。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

HP^{3D}CE 1100型高效毛细管电泳仪(美国惠普公司)配备二极管阵列紫外检测器(DAD)。内装50 μm 内径的未涂层熔融石英毛细管(鑫诺公司)。有效分离长度和总长度分别为54 cm和62.5 cm。系统控制和数据处理均由HP Chemstation工作站(版本号B.03.02)完成。WP800SL23型微波炉(格兰仕公司),频率2 450 MHz,最大输出功率1 200 W,使用额定输出功率420 W;PHM-64型pH计(丹麦Radiometer Copenhagen公司);Cary 300型紫外-可见分光光度计(美国Varian公司)。实验用超纯水(电阻率18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)均由Mili-Q型超纯水仪制备(美国Millipore公司)。

BCA、转铁蛋白(transferrin)、L-丙氨酸(L-Ala)购自美国Sigma-Aldrich公司;蓖麻毒素(ricin)由本室提取纯化^[7],纯度>95%; β -环糊精(β -CD)、硼酸、 CuSO_4 、NaOH、 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 、 CuCl 、酒石酸钾钠、二氧六环、 POCl_3 等均为国产分析纯试剂。

1.2 溶液的配制

取适量的转铁蛋白或蓖麻毒素溶于超纯水中,分别制得2 g/L的储备液。取适量的BCA及 CuSO_4 溶于超纯水中,配制浓度分别为200 mmol/L和100 mmol/L的储备液;使用前,取适量并以硼酸盐缓冲液(pH 9.5)稀释至所需的浓度(其中硼酸的最终浓度为10 mmol/L),并经0.45 μm 水相微孔滤膜(美国Millipore公司)过滤。硼酸盐缓冲液(20~300 mmol/L)用1 mol/L NaOH溶液调至所需的pH值。常规的BCA法使用的试剂包括碱性储备液(10 g Na_2CO_3 , 2 g NaOH, 4.75 g NaHCO_3 , 0.8 g 酒石酸钾钠,将其定容至100 mL,室温下保存)、50 g/L BCA溶液(4 $^\circ\text{C}$ 下保存)及40 g/L CuSO_4 溶液。使用时将碱性储备液、BCA溶液(50 g/L)和水以体积比1:1:3的比例混匀,然后再与40 g/L CuSO_4 溶液以体积比50:1混合,即得到BCA法检测蛋白质所用的试液,使用时将其pH调至pH 9.5。

1.3 CE条件

所有CE实验中,毛细管首次使用前均依次用1 mol/L NaOH和水分别冲洗30 min和5 min以活化毛细管壁。每次进样前,依次用0.1 mol/L NaOH、水及缓冲液分别冲洗毛细管3 min。样品在5 kPa(50 mbar)压力下进样10 s后,于25 kV、25 $^\circ\text{C}$ (空气动力控温模式)下进行分离。DAD检测波长设为200, 280, 330, 400及567 nm。每天使用完毕后,依次用0.1 mol/L NaOH、水和空气分别冲洗毛细管5 min后关机。

1.4 紫外-可见光谱(UV-VIS)测定

在0.5 mL Eppendorf管中,按所需浓度移取一定体积的BCA、 CuSO_4 和蛋白质储备液,用水补足至100 μL ,再准确移取100 μL 浓度为20 mmol/L硼酸盐溶液,样品涡旋混匀后,在37 $^\circ\text{C}$ 下孵育30 min后,转入1 cm样品池中,在200~700 nm范围扫描。为清楚起见,图1中仅给出415~670 nm部分的光谱图。

1.5 丙均肽的合成

丙均肽($[\text{Ala}]_n$)的合成参照文献[8]进行。取含10 mmol/L L-Ala与10 mmol/L POCl_3 的二氧六环溶液30 mL,在室温下磁力搅拌96 h后,用10 mL水终止反应,得到黄色油状液体,即为丙均肽。经正离子电喷雾质谱(ESI-MS)鉴定其为 $n < 10$ 的丙均肽混合物,其 m/z 为161.093 3($n = 2$), 303.061 2($n = 4$), 374.145 5($n = 5$), 516.247 3($n = 7$), 658.257 3($n = 9$)和729.350 0($n = 10$)。

1.6 微波反应

移取5 μL BCA储备液、1 μL CuSO_4 储备液及一定体积的蛋白质储备液置于密闭的1 mL玻璃样品瓶中,用水补足50 μL 。再加入50 μL 20 mmol/L硼酸盐溶液,涡旋混匀后,在额定输出功率420 W下反应5 min,取出后立即置于4 $^\circ\text{C}$ 环境中放置10 min,然后进行分析。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质显色反应的UV-VIS行为

BCA显色反应的原理:在碱性条件下, Cu^{2+} 离子与蛋白质中的还原性氨基酸残基(如色氨酸、酪氨酸、胱氨酸、半胱氨酸残基等)或蛋白质中的肽键^[9]发生氧化还原反应, Cu^{2+} 自身被还原成为 Cu^+ 离子,而 Cu^+ 离子与BCA反应生成紫色产物,最大吸收波长为567 nm。

BCA法一般选择pH 10~11的碳酸盐缓冲液,而采用CE分析蛋白质时,一般首选高压电场下稳

定性和生物相容性好的硼酸/硼砂体系作为其运行缓冲液。因此,本文首先比较了蛋白质 BCA 显色反应在硼酸盐缓冲体系和碳酸盐缓冲体系中的结果,如图 1 所示。

在 10 mmol/L 硼酸盐缓冲液(pH 9.5)中,当 Cu^{2+} 离子和 BCA 体系共存时,在 500 nm 以上波长下仅产生微弱的吸收(见图 1c);当加入蛋白质后,由于形成复合物 BCA-Cu^+ 后于 567 nm 处呈现出最大的吸收(见图 1d),其摩尔吸光系数约为 $2.2 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。对于碳酸盐缓冲盐体系,其加入蛋白质前后的显色行为(见图 1e 和 f)基本与硼酸盐缓冲液相似(图 1c 和 d)。在硼酸盐缓冲液中加入固定浓度的蛋白质后,随着 BCA 及 Cu^{2+} 浓度的增大,在 567 nm 处的吸光度值增加,当 BCA 浓度大于 10 mmol/L 后吸光度增加不明显; Cu^{2+} 浓度大于 1 mmol/L 时,体系产生沉淀。

图 1 BCA 显色反应的紫外-可见光谱图

Fig. 1 UV-visible spectra of BCA-Cu^+ complex in BCA colorimetric method

a. borate buffer as a blank; b. BCA in borate buffer; c. BCA and CuSO_4 in borate buffer; d. BCA, CuSO_4 and transferrin in borate buffer; e. BCA and CuSO_4 in carbonate buffer; f. BCA, CuSO_4 and transferrin in carbonate buffer. The above samples were measured at pH 9.5 after incubation at 37°C for 30 min.

The final concentration of each component: borate buffer, 10 mmol/L; carbonate buffer, 30 mmol/L; CuSO_4 , 1 mmol/L; BCA, 10 mmol/L; transferrin, 100 mg/L;

2.2 微波反应

采用 BCA 法检测蛋白质时,通常需要较高的温度和较长的时间^[9]。由于其属于慢反应进程,随着放置时间的增加,吸光度值也不断地增大,从而导致测定结果偏差较大。因此,本文采用微波加速反应,以达到快速、完全反应的目的^[10]。

采用 BCA 法测定蛋白质时,一般在 37°C 这样较低的温度下,蛋白质中还原性氨基酸残基首先将

Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ,随着反应温度提高至 60°C ,蛋白质中的肽键对体系中的 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ 的贡献增大^[6,9]。

在 10 mmol/L 的硼酸盐缓冲体系(pH 9.5)中,采用中等强度的微波输出功率(420 W)对高(100 mg/L)、中(50 mg/L)和低(20 mg/L)3 个质量浓度的转铁蛋白进行微波反应,结果如图 2 所示。其吸光度随着反应时间的增加而稳步增加,反应 5 min 后,其 567 nm 处的吸光度值是相同条件下未经微波处理在 37°C 孵育 30 min 后的 7 倍。微波反应后样品在室温下放置 48 h,其吸光度值基本无变化,表明采用微波加热可有效地加速反应,并获得稳定的测定结果。

图 2 微波反应下不同浓度的铁蛋白的吸光度值变化

Fig. 2 Absorbances of transferrin with different concentrations after microwave-assisted incubation

为了比较微波反应(420 W, 5 min)和 37°C 孵育 30 min 两种条件对反应的影响,分别以转铁蛋白、色氨酸(代表蛋白质的还原性氨基酸)、丙氨酸(阴性控制)及丙均肽(代表蛋白质间的肽键)进行反应。结果表明,在微波反应条件下,由丙均肽还原产生的 BCA-Cu^+ 峰高明显增高(见图 3c-1 和 c-2),说明在微波反应条件下,肽键对 BCA-Cu^+ 反应的贡献增加。

2.3 基于 BCA 显色反应的 CE 快速检测蛋白质

大多数蛋白质为碱性和中性蛋白质,例如转铁蛋白($\text{pI}=6.6$)和蓖麻毒素($\text{pI}=7.1$),虽然在本文选择的高 pH 值 CE 体系下均带负电荷,但仍会通过其疏水作用在毛细管壁上产生吸附^[11]。而采用 BCA 法处理蛋白质后,实际运行时仅对其特征生成的 BCA-Cu^+ 进行检测,蛋白质在 CE 管壁中的吸附因此可以忽略。

2.3.1 CE 条件的优化

本文选择样品缓冲液的浓度低于分离缓冲液的

图 3 (1)微波反应和(2)37 °C 孵育 30 min 两种条件下 BCA-Cu^+ 复合物吸光度的变化

Fig. 3 Absorbances at 200 nm for BCA-Cu^+ complex under the conditions of (1) microwave operation and (2) incubation at 37 °C for 30 min

CE injection buffer: 10 mmol/L borate buffer (pH 9.5); CE separation buffer: 60 mmol/L borate buffer (pH 9.5) containing 10 mmol/L β -CD.

a. BCA ; b. $\text{BCA} + \text{CuSO}_4 + \text{alanine}$; c. $\text{BCA} + \text{CuSO}_4 + (\text{Ala})_n$; d. $\text{BCA} + \text{CuSO}_4 + \text{tryptophan}$; e. $\text{BCA} + \text{CuCl}$; f. $\text{BCA} + \text{CuSO}_4 + \text{transferrin}$. Concentration of each component: BCA , 10 mmol/L; CuSO_4 and CuCl , 1 mmol/L; alanine, $(\text{Ala})_n$, tryptophan and transferrin, 100 mg/L.

Peak I: free BCA ; peak II: BCA-Cu^+ .

浓度,利用电场聚焦效应引起的样品堆积,提高检测灵敏度^[12],也可有效避免样品缓冲液,即 BCA 法的反应体系中硼酸盐浓度过高而引起的 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 沉淀。当硼酸盐浓度大于 10 mmol/L 时,由于碱性条件下大量 $\text{B}(\text{OH})_4^-$ 离子的存在^[13], $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 沉淀形成的可能性增加,不利于均相样品反应体系的形成。另外,正如前面提到的,当 Cu^{2+} 离子浓度大于 1 mmol/L, pH 大于 9.5 时,也容易产生沉淀。样品缓冲液中,随着 BCA 和 Cu^{2+} 的浓度分别增大至 10 mmol/L 和 1 mmol/L 时,复合物信号值增加,直至保持最大值不变。因此我们选择的样品缓冲液为 10 mmol/L 硼酸盐 (pH 9.5), 10 mmol/L BCA 及 1 mmol/L CuSO_4 。

考察了不同分离缓冲盐浓度及 pH 值对复合物峰高的影响。复合物峰随着硼酸盐缓冲液浓度的增大而升高,但当硼酸盐缓冲液浓度大于 60 mmol/L 后,复合物峰的峰高呈现降低趋势。复合物峰随着 pH 升高而升高,当 pH > 9.5 后,复合物峰的峰高呈现略微降低的趋势。因而最终选择 60 mmol/L 硼

酸盐, pH 值 9.5 为最优的分离缓冲液。但在上述条件下,由于游离 BCA 及复合物之间的淌度差异较小,无法达到基线分离。

不同环糊精的疏水性空腔的内径不同,亲水性外缘的类型也不同,可分别与不同尺寸和性质的分析物形成包合物^[14]。本文采用具有包含效应的 β -CD 为添加剂,利用游离 BCA 和 BCA-Cu^+ 复合物与 β -CD 包合作用的差异实现其有效的分离。实验结果表明,由于包合物的形成,使得 BCA 与复合物之间产生淌度差异 ($\mu_{\text{BCA-Cu}^+-\beta\text{-CD}} > \mu_{\text{BCA-}\beta\text{-CD}}$)。如图 4 所示,随着 β -CD 浓度自 0 增至 15 mmol/L,游离的 BCA 和复合物间的分离度 (R_s) 逐渐从 0.67 增加到 2.94。因样品中的 BCA 淌度远大于分离缓冲液的淌度,由 CE 谱图可见游离的 BCA 呈现一典型的前伸峰,从而亦略微导致 BCA-Cu^+ 峰形前伸。

图 4 不同浓度的 β -CD 对于游离 BCA 及 BCA-Cu^+ 复合物分离的影响

Fig. 4 Effect of β -CD concentration on the separation of free BCA and BCA-Cu^+ complex

CE separation buffer: 60 mmol/L borate buffer (pH 9.5) containing 0, 5, 10 or 15 mmol/L β -CD, separately. Other conditions are the same as in Fig. 3f-1.

Peak I: free BCA ; peak II: BCA-Cu^+ .

2.3.2 本文方法与常规 CE-UV 测定蛋白质时的灵敏度比较

通常,CE-UV 方法检测蛋白质时往往采用其末端紫外吸收 200 nm 和其特征紫外吸收 280 nm 作为检测波长。而在本方法中,基于 BCA-Cu^+ 显色反应,可实现可见区 567 nm 处的检测,可有效地消除基质的干扰。如图 5 所示,对于 100 mg/L 的转铁蛋白,未经 BCA-Cu^+ 显色时,其 200 nm 处的峰高值仅有 1.27 mAU (见图 5a),在 280 nm 波长下更未见到检测信号;但应用本方法,其 567 nm 处的峰高为 61 mAU (见图 5b),增强了 47 倍。当利用 β -CD 使 BCA-Cu^+ 复合物与过量游离的 BCA 完全分离

后,本方法还可直接在 200 nm 处检测 BCA-Cu^+ 的特征峰,以间接检测蛋白质,如 100 mg/L 转铁蛋白相对应的 BCA-Cu^+ 的峰高值为 521 mAU(见图 5c),是未经 BCA 处理时转铁蛋白峰高值的 410 倍。

图 5 转铁蛋白经 BCA 反应前后的 CE 图谱
Fig. 5 Capillary electropherograms of transferrin before and after treated with BCA-Cu^+

a. only transferrin detected at 200 nm; b. transferrin treated in BCA colorimetric method detected at 200 nm; c. the same as in Fig. 5b but detected at 567 nm. The concentration of transferrin was 100 mg/L. Other conditions are the same as in Fig. 3f-1. Peak I : free BCA ; peak II : BCA-Cu^+ ; peak III : transferrin.

2.4 线性范围及检出限

在确立的最佳实验条件下, BCA-Cu^+ 复合物的峰面积与蛋白质的浓度在一定范围内呈良好的线性关系,转铁蛋白的线性范围为 2 ~ 200 mg/L,线性回归方程为 $Y = 75.59 + 3\,605.33X$, $r = 0.999\,6$; 蓖麻毒素的线性范围为 2 ~ 100 mg/L,线性回归方程为 $Y = 103.95 + 6\,386.62X$, $r = 0.999\,3$; 转铁蛋白和蓖麻毒素的检出限分别为 0.33 和 0.37 mg/L(如图 6 所示),而常规 BCA 法的线性范围一般介于 20 ~ 200 mg/L^[9]。

2.5 本文方法在第一届蓖麻毒素国际比对测试中对部分样品的测定

2009 年 10 - 11 月,我们将建立的方法应用于德国罗伯特·科赫研究所(RKI)组织的第一届蓖麻毒素国际实验室间的比对测试工作。对 RKI 提供

图 6 转铁蛋白和蓖麻毒素的滴定曲线
Fig. 6 Titration curves of transferrin and ricin

的 S5 样品中的蓖麻毒素含量进行了测定。将该样品分别稀释 10, 20 及 100 倍后,测得其含量为 1 022 ~ 1 087 mg/L,相对标准偏差(RSD)为 0.4% ~ 6.8%(见表 1)。此值与 RKI 公布的真值($1\,018 \pm 243$) mg/L 的符合度较高,表明了建立的方法有较好的应用价值。

表 1 本文方法在第一届蓖麻毒素国际比对测试中对 S5 样品的测定结果($n = 3$)

Table 1 Results of sample 5 in the First International Ricin Proficiency Test with this method ($n = 3$)

Sample	Dilution ratio	Measured value/ (mg/L)	Real value/ (mg/L)	RSD/ %
S5-1	10	1087 ± 165		6.8
S5-2	20	1052 ± 49	1018 ± 243	3.3
S5-2	100	1022 ± 29		0.4

3 结论

本文采用 CE 法和 BCA 法,以转铁蛋白和蓖麻毒素为模型分子,辅以微波辅助孵育反应,并以 β -CD 为有效的包合添加剂,实现了 BCA-Cu^+ 复合物和过量游离 BCA 分子的分离,实现了在低波长 200 nm 下高灵敏度间接检测蛋白质的目的。该方法已成功地应用于第一届蓖麻毒素国际比对测试,显示了良好的应用前景。但尚需提及的是,对于多种蛋白质混合体系,本文方法还无法达到区分的目的,此点与 BCA 法自身的间接显色特性直接相关。

参考文献：

[1] Sapan C V , Lundblad R L , Price N C. Biotechnol Appl Biochem , 1999 , 29 : 99

[2] Bradford M M. Anal Biochem , 1976 , 72 : 248

[3] Gornall A G , Bardawill C J , David M M. J Biol Chem , 1949 , 177 : 751

[4] Lozzi I , Pucci A , Pantani O L , et al. Anal Biochem , 2008 , 376 : 108

[5] Walker J M. Methods Mol Biol , 1994 , 32 : 5

[6] Smith P K , Krohn R I , Hermanson G T. Anal Biochem , 1985 , 150 : 76

[7] Yan Y , Zhang S Z , Tang J J , et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (闫妍 , 张淑珍 , 唐吉军 , 等. 分析化学) , 2006 , 34(2) : 187

[8] Zhao Y F. Bioorganic Mass Spectrometry. Zhengzhou : Zhengzhou University Press (赵玉芬. 生物有机质谱. 郑州 : 郑州大学出版社) , 2005 : 69

[9] Wiechelman K J , Braun R D , Fitzpatrick J D. Anal Biochem , 1988 , 175 : 231

[10] Byk G , Cohen-Ohana M , Raichman D. Biopolymers , 2006 , 84(3) : 274

[11] Liu J K , Lee M L. Electrophoresis , 2006 , 27 : 3533

[12] Wang H , Lu M , Le X C. Anal Chem , 2005 , 77 : 4985

[13] Fuguet E , Reta M , Gibert C. Electrophoresis , 2008 , 29 (13) : 2841

[14] Liu Y , Chen Y. Acc Chem Res , 2006 , 39(10) : 681