

在某些干扰物质存在下测定病毒制剂蛋白质含量的一种简单方法

丁建华 焦有烈 黄志尚

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

Folin-酚显色法广泛应用于各种样品蛋白质含量的测定^[1],但有些生物制剂中,往往存在着一些干扰物质,影响了它的应用。许多文献报道过不少干扰物质如糖类^[2,3]、甘油^[2,3]、青霉素及其衍生物、链霉素^[4]、巯基化合物^[5,6]、某些金属离子^[7]、两性电解质^[2]、某些缓冲溶液^[8]和其它有机化合物^[9],并提出了排除干扰的方法。

我们在用 Folin-酚法测定 SINDBIS 病毒制剂的蛋白质含量时,发现聚乙二醇(分子量 6000)有干扰作用,它也同样干扰样品 280nm 波长紫外光谱的测定。此外, Folin-酚试剂能使病毒培养液中的酚红变色而增加样品的光密度值。参考文献[2]方法,采用高氯酸-去氧胆酸钠沉淀样品中的蛋白质,排除干扰物质,再用 Folin-酚法的改良法测定,能较准确地测得样品中的蛋白质含量,现将结果报告如下。

试验方法

高氯酸-去氧胆酸钠处理: 试管内加待测样品 0.1ml (对照加去离子水 0.1ml), 加去离子水至 3ml, 混匀后,加 2% 去氧胆酸钠 0.025ml, 摇匀后室温静置 15 分钟, 再加入 20% 高氯酸

1ml, 混匀, 溶液呈乳白色。静置 5 分钟后 3000rpm 离心 30 分钟, 弃上清液, 沉淀物内再加入 3% 高氯酸 3ml, 再重复离心一次, 沉淀样品按 Folin-酚法进行测定。当待测样品中蛋白质含量过低时,可增加样品量,再用去离子水调至 3ml。

标准曲线见图 1。

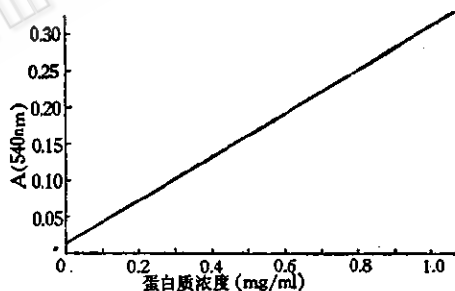


图 1 不同浓度的牛血清白蛋白用高氯酸-去氧胆酸钠处理后 Folin-酚法测定的标准曲线。测得的数值(4 次平均值)用回归分析后制图。

试验结果

一、聚乙二醇和酚红对 Folin-酚法的干扰作用
蛋白质样品中的聚乙二醇与 Folin-酚试剂作用后形成沉淀,使样品的光密度值大大降低,

结果见表 1。Folin-酚试剂能使样品中的酚红变色而增加光密度值(见表 2)。

表 1 聚乙二醇对 Folin-酚法测定的影响

样 品	光 密 度 值*		
	I	II	III
牛血清白蛋白 50μg	0.164	0.154	0.160
聚乙二醇 7.5mg**	<0	<0	<0
牛血清白蛋白 50μg 加聚乙二醇 7.5mg**	0.024	0.025	0.025

* 表中各数值都是三次测定的平均值(下表同)。
** 离心后测定上清液所得之值。

表 2 酚红对 Folin-酚法测定的影响

样 品	光 密 度 值		
	I	II	III
牛血清白蛋白 50μg	0.162	0.160	0.164
酚红 2μg	0.027	0.026	0.029
牛血清白蛋白 50μg 加酚红 2μg	0.219	0.220	0.210

二、高氯酸和去氧胆酸钠最适浓度的选择

高氯酸和去氧胆酸钠的最适浓度是沉淀回收蛋白质的关键。比较 1.5—10% 之间的五浓度的高氯酸在室温条件下对 100μg 牛血清白蛋白的沉淀作用,以 5% 最适宜,蛋白质的回收率接近 100%。

用 100μg 牛血清白蛋白比较不同浓度的去氧胆酸钠对回收率的影响(见表 3),结果以 100—200μg/ml 为适宜,去氧胆酸钠本身所造成的光密度值是很低的,用等量试剂作空白对照即可校正。

表 3 去氧胆酸钠浓度对蛋白质回收率的影响

去氧胆酸钠浓度 (μg/ml)	蛋白质回收率(%)
0	<70
50	87.4
100	95.8
125	99.0
200	97.2
300	97.3
400	94.5
500	93

三、高氯酸-去氧胆酸钠处理对聚乙二醇和酚红干扰的排除作用(见表 4)

表 4 常规 Folin-酚法和沉淀后 Folin-酚法测定的比较

样 品	光 密 度 值	
	常规法测定	沉淀后测定
牛血清白蛋白 50μg	0.160	0.163
牛血清白蛋白 50μg 加聚乙二醇 7.5mg	0.025*	0.163
牛血清白蛋白 50μg 加酚红 2μg	0.212	0.165

* 离心后测定上清液所得到的值

表 4 结果说明,几种不同样品用常规 Folin-酚法和高氯酸-去氧胆酸钠沉淀处理后,经 Folin-酚法测定所得的结果较为准确。

四、SINDBIS 病毒浓缩提纯制剂蛋白质含量的测定

病毒制剂中的上述干扰物质通过高氯酸-去氧胆酸钠沉淀能有效地排除,如表 5 所示, SINDBIS 病毒的不同制剂用两种方法测定的结果。

表 5 常规 Folin-酚法和沉淀后 Folin-酚法测定 SINDBIS 病毒制剂的结果比较

病毒样品	光 密 度 值	
	常规法测定	沉淀后测定
病毒组织培养液*	0.285	0.205
浓缩后上清液*	0.068**	0.168
浓缩物悬液	0.174	0.181

* 测定前作 1:2 稀释。

** 离心后测定上清液所得到的值。

小 结

我们用高氯酸-去氧胆酸钠沉淀法,有效地排除了聚乙二醇、酚红等干扰物质,样品中的蛋白质回收率接近 100%,回收的蛋白质即可用常规 Folin-酚法测得较为准确的结果。

参 考 文 献

[1] 潘家秀等:蛋白质化学研究技术,28页,科学出版社,1973。
[2] Andre Bensadoan et al.; *Anal. Biochem.* 70: 241. 1976.
[3] Pace G. W.; *ibid.*, 60: 649, 1974.
[4] Silverman D. J.; *ibid.*, 27: 189, 1969.
[5] Carman G. et al.; *ibid.*, 36: 207, 1970.
[6] Geiger P. J. et al.; *ibid.*, 49: 467, 1972.
[7] Higuchi M. et al.; *ibid.*, 65: 591, 1975.
[8] Robert B. et al.; *ibid.*, 62: 240, 1974.