

## 蛋白浓度测定

### 基本简介

蛋白质的定量分析是生物化学和其他生命学科常涉及的分析内容，是临床上诊断疾病及检查康复情况的重要指标，也是许多生物制品，药物、食品质量检测的重要指标。在生化实验中，对样品中的蛋白质进行准确可靠的定量分析，则是经常进行的一项非常重要的工作。

蛋白浓度测定的方法有很多，但每种方法都有其特点和局限性，因而需要在了解各种方法的基础上根据不同情况选用恰当的方法，以满足不同的要求。例如凯氏定氮法结果准确，但操作复杂，用于大批量样品的测试则不太合适；Lowry 法准确度较高，但是比较费时，且每步的时间要求相对严格；Bradford 法灵敏简便，但易受去垢剂的影响；BCA 法以其试剂稳定，抗干扰能力强，结果稳定，灵敏度高而受欢迎。

### 常用方法

#### 1 lowry 法

其原理是蛋白中含有酚基的络氨酸，可与酚试剂中的磷钼钨酸作用产生蓝色化合物，其吸收波长为 750nm，蛋白含量与 750nm 的吸光度成正比。

该方法的特点是灵敏度高，反应约在 15 分钟显色，并至少可稳定几个小时，不足之处是实验过程中需精准控制试剂加入时间，干扰因素较多。

#### 2 BCA 法

其原理在碱性环境下，蛋白质分子中的肽链结构能与  $\text{Cu}^{2+}$  络合，将  $\text{Cu}^{2+}$  还原成  $\text{Cu}^{+}$ 。BCA 试剂可敏感特异地与  $\text{Cu}^{+}$  结合，形成稳定的有颜色复合物。在 562nm 处有高的光吸收值，颜色的深浅与蛋白浓度呈正比。通过制备经过梯度稀释的、浓度抑制的一组蛋白质标准品，然后将其与未知浓度的待测蛋白质仪器检测，根据绘制出的标准曲线，计算样品中的蛋白浓度。

该方法灵敏度高，操作简单，试剂及其形成的颜色复合物稳定，受干扰物影响较少，其优点是不受去垢剂的影响，可兼容样品中高达 5% 的 SDS，5% 的 TritonX-100，5% 的 Tween20，60，80。但会受整合剂和略高浓度的还原剂的影响。

#### 3 Bradford 法

是利用蛋白质—染料结合的原理，定量测定微量蛋白浓度快速、灵敏的方法。考马斯亮蓝 G250，在游离状态下呈红色，光吸收在 488nm；在酸性溶液中当它与蛋白质结合后变为

青色，蛋白质-色素结合物在 595nm 波长下有光吸收。在一定范围内，其光吸收值与蛋白质含量成正比。

Bradford 法灵敏度高，可检测到微量蛋白，操作简便、快速，只需加一种试剂，重复性好，但常用的试剂会对结果有不同程度的干扰，其中 Tris、巯基乙醇、蔗糖、甘油、EDTA 及少量去垢剂有较小影响，而 1%SDS、1%TritonX-100 及 1%Hemosol 的干扰严重。且显色结果受时间和温度的影响较大，须注意样品与标准的测定必须控制在同一条件下进行；由于各种蛋白质中的精氨酸和芳香族氨基酸的含量不同，因此考马斯亮蓝染色法用于不同蛋白质测定时有较大的偏差，在制作标准曲线时通常选用 g-球蛋白为标准蛋白质，以减少这方面的偏差。

#### 4 分光光度计法

受蛋白质中络氨酸、色氨酸残基影响，蛋白质溶液在 280nm 附近有强烈的吸收。若蛋白溶液中杂有的核酸，对测定结果会有较大影响，而核酸吸收峰在 260nm。所以同时测定 280nm 及 260nm 两种波长的吸光度，通过计算可得较为正确的蛋白含量。

该方法测定不需要任何试剂，操作简单，且样品可回收。但在使用公式计算时也应该注意各种蛋白和各种核酸在 280nm 及 260nm 处的吸光值也不尽相同，故计算结果有误差。

方法	灵敏度	时间	原理	干扰物质	说明
凯氏定氮法	灵敏度低，适用于 0.2~1.0mg 氮，误差为± 2%	费时 8~10 小时	将蛋白氮转化为氨，用酸吸收后滴定	非蛋白氮（可用三氯乙酸沉淀蛋白质而分离）	用于标准蛋白质含量的准确测定；干扰少；费时太长
双缩脲法	灵敏度低，适用于 1~10mg	中速 20-30 分钟	多肽键+碱性 Cu <sup>2+</sup> →紫色络合物	硫酸铵； Tris 缓冲液某些氨基酸	用于快速测定，但不太灵敏；不同蛋白质显色相似
紫外吸收法	较为灵敏 50~100ug	快速 5~10 分钟	蛋白质中的酪氨酸和色氨酸残基在 280nm 处的光吸收	各种嘌呤和嘧啶；各种核苷酸	用于层析柱流出液的检测；核酸的吸收可以校正

Lowry 法	灵敏度高 1~5 $\mu$ g	慢速 40~60 分 钟	双缩脲反应； 磷钼酸一磷 钨酸试剂被 酪氨酸和苯 丙氨酸还原	硫酸铵； Tris 缓冲液甘氨 酸； 各种硫醇	耗费时间长； 操作要严格 计时；颜色深 浅随不同蛋 白质变化
考马斯亮蓝 法 (Bradford 法)	灵敏度高 1~5 $\mu$ g	快速 5~15 分钟	考马斯亮蓝 染料与蛋白 质结合时，其 $\lambda_{max}$ 由 465nm 变为 595nm	强碱性缓冲 液； TritonX-100； SDS	常用方法；干 扰物质少；颜 色稳定；颜色 深浅随不同 蛋白质变化

### 参考文献

- [1]李海玲, 彭书明, 李凇, 等. 4 种常用蛋白浓度测定方法的比较[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(4):3.
- [2]王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J]. 天津化工, 2009, 23(003):40-42.
- [3]甘淋, 何涛. 几种蛋白质含量测定方法的比较研究[C]// 中国蛋白质组学首届学术大会. 0.
- [4]王秀荣, 廖红, 严小龙. 应用近红外光谱分析法测定大豆种子蛋白质和脂肪含量的研究[J]. 大豆科学, 2005, 24(3):3.
- [5]史玮, 孙莹, 徐振斌. 凯氏定氮法测定粮食蛋白质含量方法研究[J]. 粮食科技与经济, 2013, 38(5):2.
- [6]史玮, 孙莹, 徐振斌. 凯氏定氮法测定粮食蛋白质含量方法研究[J]. 粮食科技与经济, 2013, 38(5):2.
- [7]尉立刚, 张生万, 齐尚忠, 等. 光度法测定肉制品中蛋白质含量的方法研究[J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2010, 33(2):3.