

# 考马斯亮蓝法测定加工后玉米秸秆中的蛋白质浓度

杨佳莹, 张丽娜

(中国农业科学院 作物科学研究所 重大平台中心, 北京 100089)

**摘要:** 试样经乙酸溶解, 经过滤后制备成测试溶液。经紫外法预测试, 蛋白浓度较低, 选择考马斯亮蓝法 (Bradford 法) 测定蛋白浓度。以 BSA 溶液浓度绘制标准曲线, 其线性相关系数达到 0.99 以上。标定样品蛋白浓度时发现测量值超出标曲的有效计算范围。降低实验测试 BSA 浓度和反应试剂体积, 重新绘制微量蛋白浓度标准曲线, 测定后可得蛋白浓度为 11.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 玉米秸秆中蛋白含量为 0.221%。

**关键词:** 蛋白质浓度; 考马斯亮蓝法; 玉米秸秆

## 1 蛋白质浓度测定方法对比

(1) **双缩脲法:** 双缩脲是在大约 180 $^{\circ}\text{C}$  条件下加热两个尿素分子, 以达到释放出一个氨分子而获得的产物。在强碱性溶液中, 缩二脲和硫酸铜形成紫色络合物, 称为缩二脲反应。当底物中含有肽键时 (多肽), 试液中的铜与多肽配位, 配合物呈紫色。可通过比色法分析浓度, 在紫外可见光谱中的波长为 540nm。

(2) **Folin 酚试剂法:** Folin—酚试剂中的磷钼酸盐—磷钨酸盐被蛋白质中的酪氨酸和色氨酸残基还原, 产生深蓝色 (钼兰和钨兰的混合物)。在一定的条件下, 蓝色深度与蛋白的量成正相关。这个测定法的优点是灵敏度高, 比双缩脲法灵敏得多。

(3) **紫外法:** 蛋白质分子中含有共轭双键的酪氨酸、色氨酸等芳香族氨基酸。它们具有吸收紫外光的性质, 其吸收高峰在 280nm 波长处, 且在此波长内吸收峰的光密度值与其浓度成正比关系, 故可作为蛋白质定量测定的依据。

(4) **考马斯亮蓝法:** 也称 Bradford 检测法, 考马斯亮蓝 G-250 在游离状态下呈红色, 最大光吸收在 488nm; 当它与蛋白质结合后变为青色, 蛋白质-色素结合物在 595nm 波长下有最大光吸收。其光吸收值与蛋白质含量成正比, 因此可用于蛋白质的定量测定。

## 2 试剂和材料

### 2.1 试剂

- 1) BSA 粉末
- 2) 乙酸
- 3) 考马斯亮蓝试剂: (Thermo Coomassie Plus Assay Reagent)

## 2.2 仪器设备

- 1) Amersham Biosciences Ultrospec 2100 *pro*
- 2) 分析天平
- 3) 涡旋振荡器
- 4) 离心机
- 5) 石英比色皿

## 3 实验方法

### 3.1 配置样品溶液

称取粉碎均匀的样品 25mg 至 15ml 离心管中, 加入 1%乙酸水溶液 5ml, 样品终浓度为 5mg/ml, 颠倒混匀至样品完全溶解。

### 3.2 配置常规蛋白浓度标准品和样品

称取 BSA 粉末 2mg 左右至 2ml 离心管中, 加入 1%乙酸水溶液 1ml, 标准品母液终浓度为 2mg/ml。用 1%乙酸水将标准品分别稀释至表 1 中标准蛋白浓度。

### 3.3 测试

用二次水做 blank。取 200 $\mu$ l 考马斯亮蓝试剂与 200 $\mu$ l 标准品/样品混合, 室温放置 10 分钟, 测定在 595nm 波长吸收值。每个测试样品至少重复三次。

### 3.4 配置微量蛋白浓度标准品

称取 BSA 粉末 2mg 左右至 2ml 离心管中, 加入 1%乙酸水溶液 1ml, 标准品母液终浓度为 2mg/ml。用 1%乙酸水将标准品分别稀释至表 2 中标准蛋白浓度。

### 3.5 微量蛋白浓度测试

用二次水做 blank。取 750 $\mu$ l 考马斯亮蓝试剂与 25 $\mu$ l 标准品/样品混合, 室温放置 10 分钟, 测定在 595nm 波长吸收值。每个测试样品至少重复三次。

## 4 结果

### 4.1 绘制标准曲线

根据 125~1000  $\mu$ g/ml OD595 绘制标准曲线, 获得线性相关曲线如图 1。线性相关方程为  $y=0.0008x + 0.0522$ ,  $R^2=0.9937$ 。