

蛋白质 分析技术



郑玉才 伍 红 主编

PROTEIN ANALYSIS
TECHNIQUE



中国农业出版社

蛋白质分析技术

郑玉才 伍 红 主编

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质分析技术/郑玉才, 伍红主编. —北京:
中国农业出版社, 2013. 12

ISBN 978-7-109-18611-8

I. ①蛋… II. ①郑…②伍… III. ①蛋白质—分析
—研究 IV. ①Q51

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 273021 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

责任编辑 林珠英 黄向阳

北京中科印刷有限公司印刷 新华书店北京发行所发行
2014 年 1 月第 1 版 2014 年 1 月北京第 1 次印刷

开本: 700mm×1000mm 1/16 印张: 20.25

字数: 400 千字

定价: 58.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

内容简介

本书对蛋白质研究中的相关技术进行了较系统地介绍,内容既包括常规分析技术,也涉及一些新的实验方法。本书在简要阐述实验理论和主要技术环节的基础上,以提供方法指南为主要目标。

全书共 12 章,包括蛋白质定量技术、蛋白质分离纯化技术、蛋白质的大肠杆菌表达、蛋白质的定性方法、蛋白质序列分析、蛋白质化学修饰与突变的检测、蛋白质构象分析方法、蛋白质生物活性检测及基因功能验证、蛋白质相互作用研究技术、蛋白质与核酸之间相互作用研究技术、蛋白质组学技术和蛋白质生物信息学分析。

本书可作为生物科学、农业科学、医学等领域从事蛋白质研究的研究生、科技人员和教师的工具书,也可作为本科或研究生相关课程的教学参考书。

本书编委会

主 编 郑玉才 伍 红

编著者（按姓名笔画排序）

刘 骥 伍 红 林亚秋

郑玉才 贺庆华 赵燕英

FOREWORD · 前 言

生命科学在 20 世纪获得了迅猛发展,以基因工程、分子生物学为核心的相关生物技术已经全面提升了生物科技水平,并对人类生活产生了深远的影响。在过去的几十年中,重组 DNA 技术在生命科学、农业、医学等诸多领域中已经发挥了巨大作用,并展示了广阔的应用前景。

人类基因组计划完成后,生命科学进入了后基因组时代。功能基因组、蛋白质组、代谢组、生物信息学正在成为新的研究热点。蛋白质的结构与功能、蛋白质之间的相互作用、细胞中蛋白质的时空动态变化等已经成为生命科学研究的前沿领域。与之相关的一些新的研究技术,在蛋白质研究中得到迅速发展和完善。

《蛋白质分析技术》一书是作者在从事相关科研、教学数十年的基础上,参考国内外相关专业文献和书籍编写而成的。全书共分 12 章,具体编写分工为(以章节顺序排列):郑玉才,前言、第 1 章、第 4 章;赵燕英,第 2 章、第 8 章;贺庆华,第 3 章、第 12 章;伍红,第 5 章、第 11 章;刘骥,第 6 章、第 7 章;林亚秋,第 9 章、第 10 章。本书在重点介绍蛋白质常规检测技术的基础上,对近年来出现的一些新的技术,如蛋白组学研究技术、质谱技术等进行了阐述,以拓宽研究人员的视野,了解学科和技术发展现状及趋势,为从事蛋白质研究提供方法和思路。书中对一些常用的重要分析方法做了较详细的介绍,以便读者能对一些实验技术有更加全面的了解,提高了该书的实用价值。

由于篇幅有限,本书的核心目标是提供给读者有关蛋白质研究中的思路和一些技术策略,而对于某些实验的具体方法和过程,一般需要参考更加详细的书籍或文献资料。需要指出的是,尽管参加本书编写的成员都有一定的蛋白质化学方面的相关教学和科研经验,但由于学科发展日新月异,使我们深感学识浅薄,因此,疏漏和错误仍然难免,敬请专家、读者批评指正。

编著者

2014 年 1 月

CONTENTS · 目 录

前言

第 1 章 蛋白质定量技术	1
1.1 生物样品的前处理	1
1.2 总蛋白含量的分析	3
1.3 特定蛋白组分含量的分析	12
1.4 蛋白质含量测定方法的发展	26
第 2 章 蛋白质分离纯化技术	29
2.1 蛋白质纯化方法和技巧	29
2.2 原材料的选择和预处理	32
2.3 组织细胞的破碎和碎片去除	32
2.4 粗分离	37
2.5 精细纯化	45
2.6 成品化	60
第 3 章 蛋白质的大肠杆菌表达	62
3.1 表达载体的选择	62
3.2 重组表达载体的构建	64
3.3 表达宿主菌的选择及转化	66
3.4 工程菌的诱导表达	67
3.5 目的蛋白的分析	73
3.6 目的蛋白的鉴定和定量	77
3.7 目的蛋白的纯化	78
第 4 章 蛋白质的定性方法	82
4.1 蛋白质分子量的测定	82
4.2 蛋白质等电点的测定	91
4.3 蛋白质纯度检测	92

4.4 蛋白质氨基酸组成分析	95
4.5 蛋白质的鉴定	99
第5章 蛋白质序列分析	114
5.1 蛋白质的 N-末端序列分析法	114
5.2 蛋白质的 C-末端序列分析法	128
5.3 蛋白质序列测定中新技术的应用	131
第6章 蛋白质化学修饰与突变的检测	135
6.1 蛋白质化学修饰的意义	135
6.2 影响蛋白质化学修饰的因素	137
6.3 典型功能基团的化学修饰及其进程的监测	139
6.4 蛋白质的定点突变及检测	150
6.5 蛋白质翻译后修饰分析	154
第7章 蛋白质构象分析方法	162
7.1 X-射线晶体衍射技术	163
7.2 二维和多维核磁共振技术	167
7.3 低温电子显微镜技术	169
7.4 光谱技术	170
7.5 其他方法	183
第8章 蛋白质生物活性检测和基因功能验证	188
8.1 蛋白质的定位	189
8.2 基因功能验证	193
8.3 生物性状或功能检测	198
第9章 蛋白质相互作用研究技术	205
9.1 酵母双杂交系统	206
9.2 噬菌体展示技术筛选相互作用的蛋白质	209
9.3 表面等离子共振技术	212
9.4 荧光能量转移技术	214
9.5 串联亲和纯化技术	215
9.6 蛋白质芯片技术	219
9.7 免疫共沉淀技术	220
9.8 融合蛋白沉降技术 (pull - down) 分析	224

第 10 章 蛋白质与核酸之间相互作用研究技术	229
10.1 凝胶阻滞试验	229
10.2 酵母单杂交技术	234
10.3 染色质免疫沉淀技术	238
10.4 足迹实验	242
第 11 章 蛋白质组学技术	253
11.1 蛋白质组样品制备及预分级技术	253
11.2 蛋白质组分离技术	263
11.3 蛋白质组研究中的蛋白质鉴定技术	274
11.4 定量蛋白质组学	283
11.5 定向蛋白质组学简介	288
第 12 章 蛋白质生物信息学分析	291
12.1 UniProtKB 蛋白知识库	291
12.2 PROSITE 数据库	297
12.3 酶数据库	299
12.4 SWISS-2DPAGE 数据库	301
12.5 蛋白质数据库 (PDB)	306
12.6 蛋白质分析工具	308

第 1 章

蛋白质定量技术

蛋白质 (protein) 是由氨基酸构成的生物大分子, 是细胞中含量最多的有机成分, 通常占细胞干重的 50% 以上, 具有广泛的生物学功能。蛋白质是生命活动的体现者, 因此, 蛋白质研究一直是生命科学、农业科学和医学研究的重点领域。

蛋白质定量分析是生物学、临床医学及相关研究中常用的和最基础性的工作。很多与蛋白质相关的基础性研究, 都需要确定生物样品中的蛋白质含量, 如电泳时确定蛋白质上样量、计算酶的比活力等; 在农业、饲料和食品加工工业、发酵工业等领域, 蛋白质定量分析也是一种重要手段; 在医学领域, 人体液中总蛋白质和某些特定蛋白质的测定, 可作为疾病诊断治疗和病程观察的重要指标。在研究或医学检验中, 了解血液或组织液中某一特定蛋白组分的含量有时更为重要。这就要求有特异的检测方法, 如血清中白蛋白可采用溴甲酚紫进行比色测定; 还根据蛋白质的功能建立分析方法, 如胰蛋白酶抑制剂的测定 (扩散法等)。此外, 免疫双扩散、火箭电泳等免疫化学方法也可用于检测特定的蛋白组分。但对于生物组织或血液中微量蛋白、蛋白类激素等组分的分析, 则需要更灵敏和特异的方法。

从形态来看, 蛋白质样品有固体 (如生物组织、饲料等) 和溶液, 分析方法有差别。一般来说, 没有完全完美的简便方法测定所有样品中的蛋白质含量。方法的选择取决于样品的性质和其他组分的性质, 以及对分析准确度、速度、灵敏度等的要求。

蛋白质的定量分析根据所分析的蛋白种类, 大体上可以分为总蛋白含量和特定蛋白组分含量的测定这两类, 所涉及的方法差异明显, 并有很多方法可以选择。对于总蛋白定量, 可能最准确的方法是将蛋白质进行酸水解, 然后再分析氨基酸, 但该方法过于繁琐。

1.1 生物样品的前处理

生物样品的前处理和准备对蛋白质的分析至关重要, 相关的每个环节都需要科学、精确地完成。该过程可能产生的误差往往高于后续的仪器分析, 因此

必须高度重视并确保样品的质量。

(1) 样品的选择 生物组织具有不均一性, 因此, 用于蛋白质分析的样品必须具有代表性。例如对乳酸脱氢酶 (LDH) 而言, 其 LDH1~LDH5 同工酶在不同骨骼肌中的比例是有差异的。即使同种类型的肌肉, 其表面和内部的某些蛋白组分 (如肌纤维类型) 也可能存在明显的差异。可见, 科学的取样对后续分析是十分关键的。另外, 取样时的量要充足。对动物进行取样及人类医学研究还要符合动物福利、伦理学等相关的法律法规。

(2) 保存 生物样品取样后, 有时需要进行一些前处理, 如去除杂质、脂肪和结缔组织等。另外, 为了便于后续分析, 往往需要进行分装保存。保存的温度一般来说越低越好, 如用液氮、超低温冰箱等进行保存。 -20°C 并不适合生物样品的长期保存。个别蛋白质在室温下比冰箱中更稳定, 如肌红蛋白在低温条件下反而容易导致冷变性。样品尽量减少反复冻融, 以减少对蛋白质生物活性的破坏。蛋白质样品解冻时一般应在冰上完成, 不要直接放在 37°C 条件下, 因为这样有可能引起蛋白质凝聚而发生沉淀。盛放生物样品或纯蛋白质溶液的容器需要能耐受低温, 这对于液氮、超低温冰箱保存尤其重要。

样品保存过程中须预防蛋白质水解、凝聚 (aggregation) 和某些化学反应。破碎的组织抽提液中往往含有大量的蛋白水解酶, 即使纯化蛋白中微量的蛋白水解酶, 都可能在样品长期保存中水解蛋白质。蛋白水解酶主要包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、酸性蛋白酶和金属蛋白酶。 $2\sim 5\text{mmol/L}$ 的 EDTA 能有效抑制金属蛋白酶, $0.1\mu\text{mol/L}$ 胃酶抑素 A (pepstatin A, 一种五肽胃蛋白酶抑制因子) 能抑制酸性蛋白酶; 苯甲磺酰氟 (PMSF) 能抑制丝氨酸蛋白酶, 使用的终浓度为 $0.5\sim 1\text{mmol/L}$ 。

低浓度的蛋白溶液容易发生变性, 尤其是寡聚蛋白, 在低浓度时可发生亚基的解离。一般来说, 浓度低于 $1\sim 2\text{mg/ml}$ 的蛋白溶液应尽快通过超滤等方法进行浓缩。加入其他蛋白 (如 BSA) 有助于防止低浓度蛋白溶液的变性。冻干是蛋白质长期保存的有效方法, 但需要注意的是, 蛋白质溶液在冻干过程中仍会不同程度地引起蛋白质活性的降低。

(3) 蛋白质的抽提 抽提是指用适当的溶液 (抽提液) 将蛋白转移到溶液中。该环节对蛋白质的定量分析十分关键。抽提液的组成取决于后续分析的要求, 蛋白质抽提常采用离子强度较低的缓冲溶液, 如 $20\sim 50\text{mmol/L}$ 磷酸缓冲液 ($\text{pH}7\sim 7.5$)、 0.1mol/L Tris-HCl ($\text{pH}7.5$) 等, 在使用前可加入一些蛋白酶抑制剂, 如 PMSF、二异丙基氟磷酸 (diisopropyl fluorophosphate, DFP)、胃酶抑素 A、EDTA 等。

不同实验目的所采用的抽提液有差异。例如, 双向电泳抽提组织蛋白时, 常用的裂解液含 7mol/L 尿素、 2mol/L 硫脲、 4% (W/V) 丙磺酸

(CHAPS)、2mmol/L 磷酸三丁酯 (TBP) 或 β -巯基乙醇、0.2%两性电解质、1mmol/L PMSF 等。这种条件能有效地提取更多的蛋白质,并抑制蛋白水解酶的作用;免疫印迹 (western blot) 则常采用 RIPA 裂解缓冲液对细胞和组织进行快速裂解,其中的主要裂解成分为 Triton X-100、SDS、脱氧胆酸钠等,尤其适用于膜蛋白和核蛋白的提取。有些实验还可能需获得细胞中的核提取物进行分析,则需要专门的试剂和方法。目前有很多公司开发了可用于总蛋白、可溶性蛋白、膜蛋白、细胞骨架蛋白、核蛋白及亚细胞蛋白分部抽提的试剂盒,不需要超速离心机等设备,即可方便的获取目标蛋白组分。

蛋白质的抽提过程须在 4℃左右的环境中进行,一般需要至少 5 倍组织体积的抽提液(习惯上将每克组织按 1ml 计算),常用 10 倍甚至 20 倍体积的抽提液,以获得更好的抽提效果。蛋白质抽提过程通常与组织细胞的破碎结合在一起,通过研磨、匀浆、超声波等方式,在破碎细胞的同时完成蛋白质的抽提,再经过高速离心(12 000r/min 以上,4℃离心 20min 左右)获得含蛋白的上清液,分装低温保存。有时还可以根据后续分析的要求,加入防腐剂、保护剂,或者冻干保存。

蛋白质抽提液在做某些分析时,可能还需要不同程度的纯化,以去除其中的干扰成分,如采用透析、超滤等方式脱盐。有不少商业化的色谱柱可用于样品的前处理,如 Waters 公司的各类固相萃取小柱 (SPE),使用十分方便,回收率高,重复性好。

1.2 总蛋白含量的分析

生物样品总蛋白含量的测定方法很多,基于各种方法的原理、准确性、操作的难易程度都有差别,实际工作中应根据需要合理选择。需要考虑的因素包括蛋白质浓度的高低、干扰成分(主要是去污剂、还原剂)、准确性、简便程度以及成本等。一些常见的重要的蛋白质含量测定方法简要介绍如下。

1.2.1 凯氏定氮法 凯氏定氮法 (the Kjeldahl nitrogen determination) 是蛋白质定量分析的经典方法,历史悠久(建立于 1883 年)。其原理是根据蛋白质含氮比例为 14%~16%而设计的,即 1g 氮相当于 6.25g 蛋白质,系数通常采用 6.25,但对于某些特定的生物样品(如牛奶),该系数可能会有变动,并使结果更加准确。凯氏定氮法最主要的特点是可测定各种不同形态的样品,特别适合固体样品分析,因此,在食品、饲料、种子、生物制品的蛋白含量测定方面应用广泛。凯氏定氮法方法复杂、费时,但目前已经有全自动的凯氏定氮仪,大大提高了分析的效率。

凯氏定氮法主要过程包括:

(1) 消化 将一定量的蛋白质与浓硫酸共热,使其中的有机氮转化为胺

盐，即硫酸铵，为了加快反应，添加硫酸铜和硫酸钾的混合物，前者为催化剂，后者可提高硫酸的沸点。这一步骤需要 30min~1h。

(2) 加碱蒸馏 硫酸铵与浓 NaOH 作用生成 NH_4OH ，加热后生成 NH_3 ，通过蒸馏后，用标准的酸溶液（硼酸）吸收。

(3) 滴定 标准的酸溶液吸收 NH_3 后，剩余的酸可用标准 NaOH 滴定，采用甲基红为指示剂。由所用酸的摩尔数减去滴定消耗的 NaOH 的摩尔数，即为被吸收的 NH_3 的摩尔数，计算出样品中氮的含量，即可换算成蛋白质含量。本法适用于 0.2~2.0mg 的氮测定。

方法介绍：微量凯氏定氮法测定蛋白含量

(1) 主要试剂 浓硫酸、30% H_2O_2 、10mol/L NaOH、0.01mol/L 标准盐酸、标准硫酸铵 (0.3mg 氮/ml)、催化剂 (硫酸铜：硫酸钾=1：4，研磨成末)、指示剂 (0.1% 甲基红乙醇溶液)。

(2) 主要器材 微量凯氏定氮仪 (图 1-1)、凯氏烧瓶等。

(3) 方法

①样品处理：称取 BSA 50mg 于凯氏烧瓶中，加入 500mg 催化剂，再加入 5ml 浓硫酸。同时做一空白对照组，一般做两个平行样。

②消化：在通风橱中电炉上加热，开始需要控制火力，避免液体冲到瓶颈。待瓶内水分蒸发完，硫酸开始分解并释放出 SO_2 白烟时，适当加大火力，使液体微微沸腾，维持 2~3h。待消化液变为褐色后，为加快消化，可取下凯氏烧瓶，稍冷后加入 30% H_2O_2 溶液 1~2 滴，继续消化，直到溶液呈透明的淡蓝绿色。冷却后用蒸馏水定容至 50ml。

③洗涤：蒸汽发生器中盛有加入数滴硫酸的蒸馏水和沸石。每次使用前需用蒸汽洗涤 10min 左右。将 1 个含 5ml 2% 硼酸和 1~2 滴指示剂的锥形瓶放在冷凝管下端，使管口插入液面下，继续蒸馏 1~

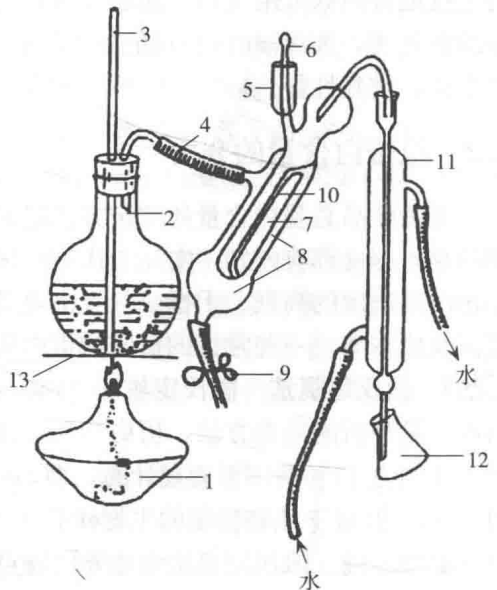


图 1-1 微量凯氏定氮仪示意图

1. 热源 2. 烧瓶 3. 玻璃管 4. 橡皮管
5. 玻璃杯 6. 棒状玻塞 7. 反应室
8. 反应室外壳 9. 夹子 10. 反应室中插管
11. 冷凝管 12. 锥形瓶 13. 石棉网

2min, 如硼酸溶液颜色不变, 表明仪器已洗干净。

④蒸馏: 50ml 锥形瓶, 加入 25ml 的 0.01mol/L 标准盐酸和 1~2 滴指示剂。取 2ml 稀释的消化液, 由小漏斗加入反应室。锥形瓶放置在冷凝管下端, 使管口插入液面以下。取 5ml 的 10mol/L NaOH 溶液, 加入小漏斗, 让溶液缓缓流入反应室, 并留少量水在漏斗内用于封闭。加热水蒸气发生器, 沸腾后关闭收集器活塞, 使蒸汽冲入蒸馏瓶内, 反应生成的氨溢出被吸收, 待氨蒸馏完全, 移动锥形瓶使液面离开冷凝口约 1cm, 用少量蒸馏水洗涤冷凝口。用 0.01mol/L NaOH 标准溶液滴定, 记录消耗的体积。蒸馏完毕后, 移走热源, 夹紧蒸汽发生器与收集器间的橡皮管, 可使反应室中的残液吸至收集器。

⑤计算: 样品的含氮量 (mg/ml) = $(A-B) \times 0.01 \times 14 \times N/V$ 。其中 A 和 B 分别为滴定空白对照和样品所对照消耗的 NaOH 的体积 (ml); V 为样品体积; N 为样品的稀释倍数。

1.2.2 紫外吸收法 紫外吸收法 (ultraviolet absorption method) 利用蛋白质分子中色氨酸、酪氨酸残基在 280nm (近紫外) 有吸收峰, 这些具有紫外吸收的氨基酸在许多蛋白质中的总含量大致恒定, 因此, 蛋白质浓度与紫外吸收成正比, 可进行比色测定。另外, 苯丙氨酸和二硫键也有一定的紫外吸收。该法测定蛋白质浓度的范围为 0.05~0.5mg/ml。

定量计算方法可以用 BSA 等蛋白制作标准曲线 (1mg/ml BSA 的 $A_{280} = 0.66$)。标准蛋白的选择最好与所分析的样品蛋白组成接近, 这样可以提高分析的准确性。另外, 研究表明多种蛋白质的混合溶液, 当浓度为 1mg/ml 时, 用 1cm 比色皿测定 $A_{280} = 0.8$, 因此, 蛋白含量 (mg/ml) = $A_{280}/0.8$ 。样品溶液需稀释到分光光度计可准确测定的范围内, 一般吸光值在 2 以下, 最好在 0.05~1.0 之间, 尤以中间值 (0.3 左右) 最佳。

样品中的核酸对蛋白含量测定有显著影响, 经测定表明, 纯化的蛋白质 280nm/260nm 光吸收比值约为 1.75, 而核酸 280nm/260nm 光吸收比为 0.5。为了消除 DNA 的干扰, 可以用经验公式: 蛋白含量 (mg/ml) = $1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$ 。其他经验公式包括:

$$\text{蛋白含量 (mg/ml)} = 1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$$

$$\text{蛋白含量 (mg/ml)} = (A_{235} - A_{280}) / 2.51$$

$$\text{蛋白含量 (mg/ml)} = 0.183 A_{230} - 0.075 A_{260}$$

除了利用 A_{280} 的近紫外吸收测定蛋白质含量外, 还可采用其他波长。肽键在 190nm 处有强烈的紫外吸收 (远紫外吸收, far UV absorbance), 但由于氧气对该波长的吸收影响和分光光度计的限制, 实际测定时波长一般采用 205nm (数值仅相当于 A_{190} 的一半) 或 215nm。1mg/ml 的蛋白溶液 A_{205} 摩尔消光系数在 30~35, A_{210} 摩尔消光系数在 20~40。一些氨基酸残基如

Trp、Phe、Tyr、His、Cys、Met 和 Arg 的侧链影响 A₂₀₅ 值。该方法的优点是简单、灵敏，样品可回收，并且不同蛋白质之间的测定误差小；缺点是需要准确校正分光光度计，同时，很多缓冲液和血红素等对测定有强烈的干扰。另外，还有报道利用 215nm 和 225nm 吸光值测定蛋白含量，对于稀的蛋白溶液 (20~100 μg/ml)，可利用下列经验公式计算：蛋白质浓度 (mg/ml) = 0.144 (A₂₁₅ - A₂₂₅)。

紫外吸收法需要紫外分光光度计，测定结果易受样品组成的干扰（尿素、胆红素），因此，通常需要将蛋白质分离纯化后再进行测定。另外，对于纯蛋白含量的精确测定，还可以采用干重法 (dry weight)，即把蛋白质经过透析脱盐，干燥至恒重 (50~100℃，真空，加干燥剂)，然后用分光光度计测定含量。

说明：

(1) 紫外吸收法简单、快速、灵敏度较高 (最低测定值 10 μg)，可以对微量样品进行分析，这需要微量的比色皿，如 Cary50 分光光度计使用的 10 μl 比色皿。近年来一些新型的分光光度计利用液体表面张力技术，无需比色皿，对至少 0.5 μl 的液体进行直接的分析，并能检测高浓度的样品 (通过自动调整光径)，还能在 200~900nm 左右的波长范围内进行全波长扫描。

(2) 紫外吸收法准确度相对较低，只能用于测定液体，要求杂质少。Triton X-100 有很大影响，受 pH 影响，不受低盐的影响，特别适合蛋白质纯化时监测蛋白浓度，是一种非破坏性测定蛋白质含量的方法。核酸对该法的影响很大，百分之几的核酸比例就会造成很大的误差。

(3) 不同蛋白质的紫外吸收不同，有时甚至有很大的差别 (0.32~8.37)，如 1mg/ml 的血清白蛋白在 280nm 的消光系数为 0.66，γ-球蛋白为 1.35，卵白蛋白为 0.75，而溶菌酶高达 2.7。一般光吸收范围在 0~4 (大多数在 0.5~1.5 之间)，可通过采用合适的标准蛋白，使换算系数更准确，以提高测定的准确度。

(4) 所有比色分析必须保证溶液澄清，如果混浊，可利用离心或用 0.2 μm 膜过滤后再比色。另外也可用 A₃₁₀ 值消除 (蛋白质溶液在该波长不吸收)。

1.2.3 Folin-酚法 Folin-酚法 (Folin-ciocalteu)，常称 Lowry 法，是经典的蛋白质定量方法，历史悠久。其原理基于双缩脲试验 (biuret test)，即含两个或两个以上肽键的化合物 (如蛋白质) 与碱性硫酸铜作用产生紫色。这与 Cu 原子和 4 个 N 原子作用有关。最大光吸收为 540nm，灵敏度低，需要 1~20mg 蛋白质，目前已经较少使用。

Lowry 法的原理与双缩脲法是相同的, Lowry (1951) 对双缩脲法进行了改进, 先在样品中加入碱性铜试剂, 再与酚试剂反应, 提高了灵敏度。在碱性条件下, 蛋白质中的肽键与铜结合生成复合物; Folin-酚试剂中的磷钼酸盐-磷钨酸盐被蛋白质中的酪氨酸和苯丙氨酸残基还原, 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比。该法具有简单、精密、准确的特点, 在生物化学领域得到广泛的应用, 为首选的经典方法, 但易受还原性物质的干扰。此方法灵敏性和准确性都较高, 能方便地检测到 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白, 最适合检测 $0.01\sim 1.0\text{mg}/\text{ml}$ 蛋白溶液, 成本低廉。去污剂对该方法有干扰。这是最灵敏的蛋白质浓度测定法之一。过去此法应用最广泛, 由于其试剂乙的配制较为繁琐 (现已商品化), 近年来逐渐被考马斯亮蓝法所取代。Lowry 法可用多种波长进行比色, 检测的蛋白浓度范围有差别。如 750nm 比色, 范围为 $0.03\sim 0.3\text{mg}/\text{ml}$ 蛋白; 500nm 比色, 范围为 $0.05\sim 0.5\text{mg}/\text{ml}$ 蛋白。

该法的优点是灵敏度较高 (最低测定值为 $1\mu\text{g}$), 比双缩脲法灵敏得多; 缺点是费时, 要精确控制操作时间, 标准曲线也不是严格的直线形式, 且专一性较差, 干扰物质较多。对双缩脲反应发生干扰的离子, 同样容易干扰 Lowry 反应, 而且对后者的影响还要大得多。酚类、柠檬酸、硫酸铵、Tris 缓冲液、甘氨酸、糖类、甘油等均有干扰作用。浓度较低的尿素 (0.5%)、硫酸钠 (1%)、硝酸钠 (1%)、三氯乙酸 (0.5%)、乙醇 (5%)、乙醚 (5%)、丙酮 (0.5%) 等溶液对显色无影响, 但这些物质浓度高时必须作校正曲线。

方法介绍: Lowry 法测定蛋白质含量

(1) 试剂

试剂甲: 溶液 A 中含 $10\text{g Na}_2\text{CO}_3$ 、 2g NaOH 和 0.25g 酒石酸钾钠 ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)。溶解于 500ml 蒸馏水中; 溶液 B 中含 0.5g 硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶解于 100ml 蒸馏水中, 每次使用前, 将 50 份 A 与 1 份 B 混合, 即为试剂甲。

试剂乙: 在 2L 磨口回流瓶中, 加入 100g 钨酸钠 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、 25g 钼酸钠 ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 及 700ml 蒸馏水, 再加入 50ml 85% 磷酸、 100ml 浓盐酸, 充分混合, 接上回流管, 以小火回流 10h , 回流结束时, 加入 150g 硫酸锂、 50ml 蒸馏水及数滴溴水, 开口继续沸腾 15min , 以便驱除过量的溴。冷却后溶液呈黄色 (如仍呈绿色, 需再重复滴加液体溴的步骤)。稀释至 1L , 过滤至棕色试剂瓶中保存。使用时用标准 NaOH 滴定, 酚酞作指示剂, 然后适当稀释, 约加 1 倍的水, 使最终的酸浓度为 $1\text{mol}/\text{L}$ 左右。

标准蛋白质溶液: 精确称取 BSA 或免疫球蛋白, 溶于蒸馏水, 浓度为

250mg/ml 左右。BSA 溶于水后如果混浊，可改用 0.9%NaCl 溶液溶解。

(2) 方法 标准曲线的制作：试管分成两组，分别加入 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml 标准蛋白质溶液（浓度为 250mg/ml）。用水补足到 1.0ml，然后每支试管加入 5ml 试剂甲，在旋涡混合器上迅速混合，于室温（20~25℃）放置 10min。再逐管加入 0.5ml 试剂乙（Folin-酚试剂），同样立即混匀，混合速度要快，否则会使显色程度减弱。然后在室温下放置 30min，以未加蛋白质溶液的第一支试管作为空白对照，测定各管中溶液的 A700nm，以蛋白质的量为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。蛋白样品稀释到标准曲线范围内，同上进行测定。

说明：

(1) 因 Lowry 反应的显色随着时间不断加深，因此各项操作必须精确控制时间。全部试管加完试剂甲后若已超过 10min，则第 1 支试管可立即加入 0.5ml 试剂乙；待最后一支试管加完试剂后，再放置 30min，然后开始测定光吸收值。每分钟测一个样品。

(2) 进行测定时，加 Folin-酚试剂时要特别小心，因为该试剂仅在酸性 pH 条件下稳定，但上述还原反应只在 pH10 的情况下发生，故当 Folin-酚试剂加到碱性的铜-蛋白质溶液中时，必须立即混匀，以便在磷钼酸-磷钨酸试剂被破坏之前，还原反应即能发生。

(3) 此法也适用于酪氨酸和色氨酸的定量测定。此法可检测的最低蛋白质量达 5mg，通常测定范围是 20~250mg。另外，该方法所需的试剂已有商品化供应。

方法介绍：改良的简易 Folin-酚试剂法

(1) 试剂

试剂甲：碱性铜试剂溶液中，含 0.5mol/L NaOH、10% Na₂CO₃、0.1% 酒石酸钾和 0.05% 硫酸铜，配制时注意硫酸铜用少量蒸馏水溶解后，最后加入。

试剂乙：与前面的基本法相同，使用前加蒸馏水稀释 8 倍。

标准蛋白质溶液：同基本法。

(2) 方法 测定标准曲线、样品溶液的操作方法与基本法相同。只是试剂甲改为 1ml，室温放置 10min 后，加入 4ml 试剂乙，在 55℃ 恒温水浴中保温 5min。用流动水冷却后，在 660nm 下测定其吸光度值。改良的快速简易法，可获得与 Folin-酚试剂法（即 Lowry 基本法）相接近的结果。

1.2.4 二喹林甲酸法 (bicinchoninic acid assay, BCA) 原理与 Lowry