

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 μ g/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°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 μ l 考马斯亮蓝试剂与 200 μ 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 μ l 考马斯亮蓝试剂与 25 μ 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 μ 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 $y=0.0008x + 0.0522$, $R^2=0.9937$ 。

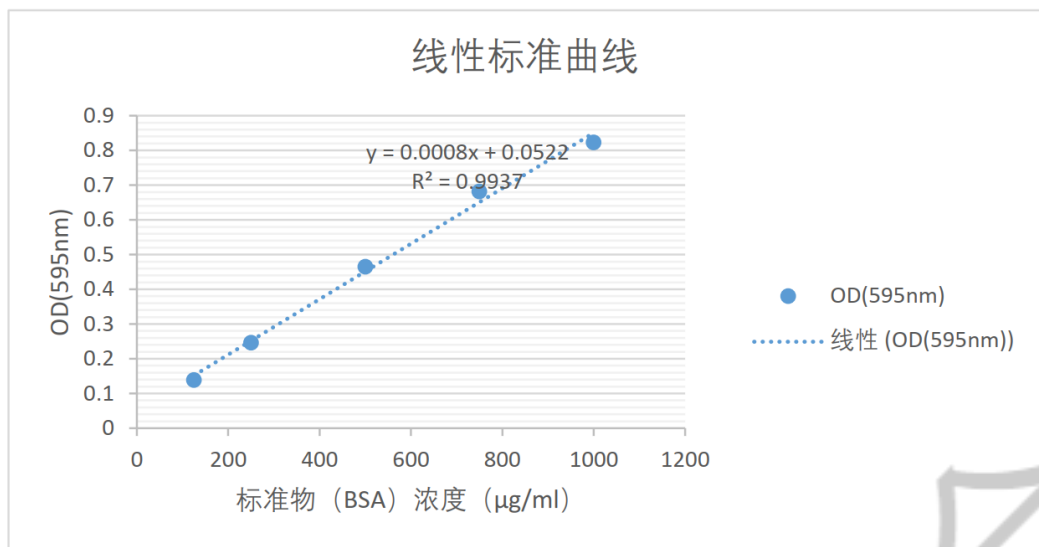


图 1 常规浓度标准曲线

4.2 测定并计算蛋白浓度

经过分析检测，标准品和样品与亮蓝 G-250 试剂反应后 OD 595nm 吸收峰为如下：

表 1 标准曲线测定

标准物（BSA） 浓度（μg/ml）	0	25	125	250	500	750	1000	1500	2000	样品 (5mg/ml)
OD(595nm)	0.348	0.339	0.466	0.546	0.737	1.014	1.160	1.265	1.399	0.341
	0.327	0.345	0.466	0.589	0.822	0.992	1.107	1.257	1.406	0.350
	0.309	0.347	0.471	0.589	0.821	1.024	1.187	1.255	1.433	0.354
平均值	0.328	0.343667	0.467667	0.574667	0.793333	1.01	1.151333	1.259	1.412667	0.348333
扣除 blank		0.015667	0.139667	0.246667	0.465333	0.682	0.823333	0.931	1.084667	

带入标准曲线由此计算可得样品中蛋白含量过低，超出标准曲线范围。因此采用微量浓度测定方法。

4.3 绘制微量蛋白浓度标准曲线

根据 3~30 μg/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 $y=0.0166x+0.0845$ ， $R^2=0.9906$ 。

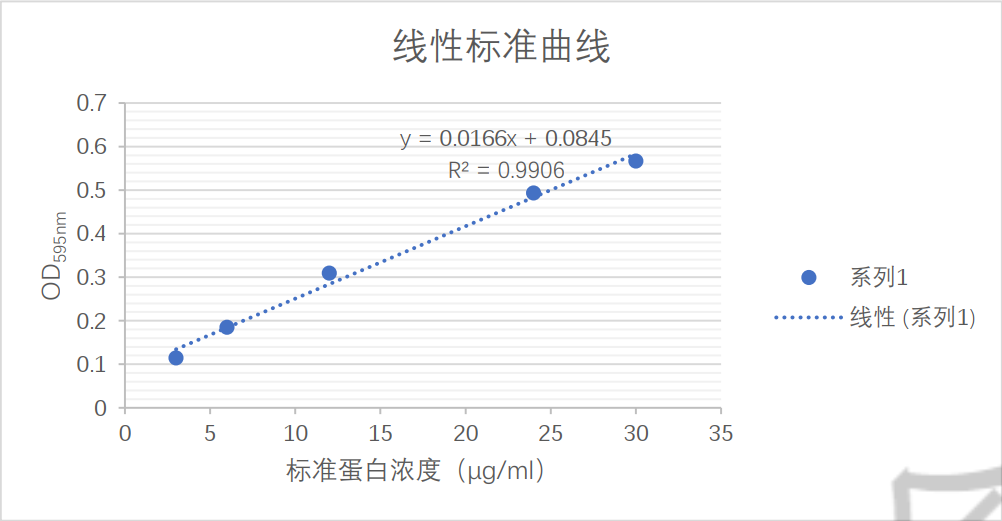


图 2 微量浓度标准曲线

4.4 测定并计算蛋白浓度

由此计算可得样品中蛋白浓度为 11.05 μg/ml，蛋白含量为 0.221%。

表 2 微量蛋白浓度标准曲线测定

标准物（BSA） 浓度（μg/ml）	0	3	6	12	24	30	样品 （5mg/ml）
OD(595nm)	0.256	0.365	0.43	0.561	0.744	0.828	0.521
	0.245	0.371	0.44	0.557	0.744	0.811	0.526
	0.253	0.361	0.44	0.564	0.747	0.816	0.511
平均值	0.251333	0.365667	0.436667	0.560667	0.745	0.818333	0.519333
扣除blank		0.114334	0.185334	0.309334	0.493667	0.567	0.268

5 结论

经实验测定，该玉米秸秆样品经处理加工后，蛋白质含量约为 0.221%，远低于正常玉米秸秆蛋白浓度 3%~5%，证明该加工方法可有效消除玉米秸秆中蛋白质。