

蛋白质含量测定法

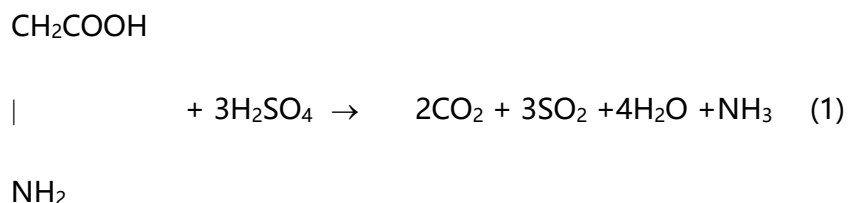
蛋白质含量测定法，是生物化学研究中最常用、最基本的分析方法之一。目前常用的有四种古老的经典方法，即定氮法，双缩尿法 (Biuret 法)、Folin - 酚试剂法 (Lowry 法) 和紫外吸收法。另外还有一种近十年才普遍使用起来的新的测定法，即考马斯亮蓝法 (Bradford 法)。其中 Bradford 法和 Lowry 法灵敏度最高，比紫外吸收法灵敏 10 ~ 20 倍，比 Biuret 法灵敏 100 倍以上。定氮法虽然比较复杂，但较准确，往往以定氮法测定的蛋白质作为其他方法的标准蛋白质。

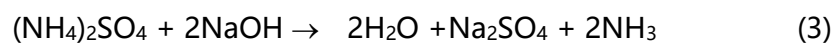
值得注意的是，这后四种方法并不能在任何条件下适用于任何形式的蛋白质，因为一种蛋白质溶液用这四种方法测定，有可能得出四种不同的结果。每种测定法都不是完美无缺的，都有其优缺点。在选择方法时应考虑：①实验对测定所要求的灵敏度和精确度；②蛋白质的性质；③溶液中存在的干扰物质；④测定所要花费的时间。

考马斯亮蓝法 (Bradford 法)，由于其突出的优点，正得到越来越广泛的应用。

一、微量凯氏 (Kjeldahl) 定氮法

样品与浓硫酸共热。含氮有机物即分解产生氨 (消化)，氨又与硫酸作用，变成硫酸氨。经强碱碱化使之分解放出氨，借蒸汽将氨蒸至酸液中，根据此酸液被中和的程度可计算得样品之氮含量。若以甘氨酸为例，其反应式如下：





反应 (1)、(2)在凯氏瓶内完成，反应 (3) 在凯氏蒸馏装置中进行。

为了加速消化，可以加入 CuSO_4 作催化剂， K_2SO_4 以提高溶液的沸点。收集氨可用硼酸溶液，滴定则用强酸。实验和计算方法这里从略。

计算所得结果为样品总氮量，如欲求得 样品中蛋白含量，应将总氮量减去非蛋白氮即得。如欲进一步求得样品中蛋白质的含量，即用样品中蛋白氮乘以 6.25 即得。

五种蛋白质测定方法比较如下：

方法	灵敏度	时间	原理	干扰物质	说明
凯氏定氮法 (Kjedahl 法)	灵敏度低， 适用于 0.2~ 1.0mg 氮，	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	用于标准蛋白 质含量的准确 测定；干扰少； 费时太长

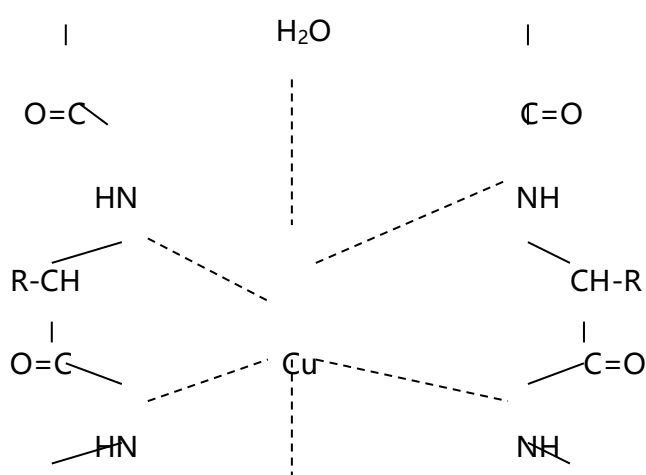
	误差为 $\pm 2\%$			离)	
双缩脲法 (Biuret 法)	灵敏度低 1 ~ 20mg	中速 20~30 分钟	多肽键 + 碱性 $\text{Cu}^{2+} \rightarrow$ 紫色络合物	硫酸铵; Tris 缓冲液; 某些氨基酸	用于快速测定, 但不太灵敏; 不同蛋白质显色相似
紫外吸收法	较为灵敏 50 ~ 100 μg	快速 5 ~ 10 分钟	蛋白质中的酪氨酸和色氨酸残基在 280nm 处的光吸收	各种嘌呤和嘧啶; 各种核苷酸	用于层析柱流出液的检测; 核酸的吸收可以校正
Folin - 酚试剂法 (Lowry 法)	灵敏度高 ~ 5 μg	慢速 40 ~ 60 分钟	双缩脲反应; 磷钼酸 - 磷钨酸试剂被 Tyr 和 Phe 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)	灵敏度最高 1 ~ 5 μg	快速 5 ~ 15 分钟	考马斯亮蓝染料与蛋白质结合时, 其 λ_{max}	强碱性缓冲液; TritonX-10	最好的方法; 干扰物质少; 颜色稳定;

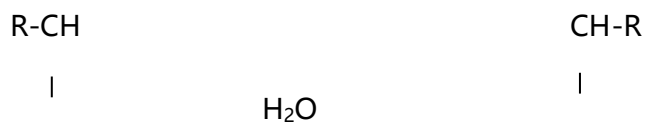
法)			由 465nm 变为 595nm	0; SDS	颜色深浅随不同蛋白质变化
----	--	--	------------------	-----------	--------------

二、双缩脲法 (Biuret 法)

(一) 实验原理

双缩脲 ($\text{NH}_3\text{CONHCONH}_3$) 是两个分子脲经 180°C 左右加热, 放出一个分子氨后得到的产物。在强碱性溶液中, 双缩脲与 CuSO_4 形成紫色络合物, 称为双缩脲反应。凡具有两个酰胺基或两个直接连接的肽键, 或能过一个中间碳原子相连的肽键, 这类化合物都有双缩脲反应。





紫色络合物

紫色络合物颜色的深浅与蛋白质浓度成正比，而与蛋白质分子量及氨基酸成分无关，故可用来测定蛋白质含量。测定范围为 1~10mg 蛋白质。干扰这一测定的物质主要有：硫酸铵、Tris 缓冲液和某些氨基酸等。

此法的优点是较快速，不同的蛋白质产生颜色的深浅相近，以及干扰物质少。主要的缺点是灵敏度差。因此双缩脲法常用于需要快速，但并不需要十分精确的蛋白质测定。

(二) 试剂与器材

1. 试剂：

(1) 标准蛋白质溶液：用标准的结晶牛血清清蛋白（BSA）或标准酪蛋白，配制成 10mg/ml 的标准蛋白溶液，可用 BSA 浓度 1mg/ml 的 A_{280} 为 0.66 来校正其纯度。如有需要，标准蛋白质还可预先用微量凯氏定氮法测定蛋白氮含量，计算出其纯度，再根据其纯度，称量配制成标准蛋白质溶液。牛血清清蛋白用 H_2O 或 0.9%NaCl 配制，酪蛋白用 0.05N NaOH 配制。

(2) 双缩脲试剂：称以 1.50 克硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 和 6.0 克酒石酸钾钠

($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 用 500 毫升水溶解, 在搅拌下加入 300 毫升 10% NaOH 溶液, 用水稀释到 1 升, 贮存于塑料瓶中 (或内壁涂以石蜡的瓶中)。此试剂可长期保存。若贮存瓶中有黑色沉淀出现, 则需要重新配制。

2. 器材:

可见光分光光度计、大试管 15 支、旋涡混合器等。

(三) 操作方法

1. 标准曲线的测定: 取 12 支试管分两组, 分别加入 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 毫升的标准蛋白质溶液, 用水补足到 1 毫升, 然后加入 4 毫升双缩脲试剂。充分摇匀后, 在室温 (20~25°C) 下放置 30 分钟, 于 540nm 处进行比色测定。用未加蛋白质溶液的第一支试管作为空白对照液。取两组测定的平均值, 以蛋白质的含量为横坐标, 光吸收值为纵坐标绘制标准曲线。

2. 样品的测定: 取 2~3 个试管, 用上述同样的方法, 测定未知样品的蛋白质浓度。注意样品浓度不要超过 10mg/ml。

三、Folin—酚试剂法 (Lowry 法)

(一) 实验原理

这种蛋白质测定法是最灵敏的方法之一。过去此法是应用最广泛的一种方法, 由于其试剂乙的配制较为困难 (现在已可以订购), 近年来逐渐被考马斯亮兰法所取代。此法的显色原理与双缩脲方法是相同的, 只是加入了第二种试剂, 即 Folin—酚试剂, 以增加显色量, 从而提高了检测蛋白质的灵敏度。这两种显色反应产生深兰色的原因是:

①在碱性条件下，蛋白质中的肽键与铜结合生成复合物。②Folin—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，产生深兰色（钼兰和钨兰的混合物）。在一定的条件下，兰色深度与蛋白的量成正比。

Folin—酚试剂法最早由 Lowry 确定了蛋白质浓度测定的基本步骤。以后在生物化学领域得到广泛的应用。这个测定法的优点是灵敏度高，比双缩脲法灵敏得多，缺点是费时间较长，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。含硫酸铵的溶液，只须加浓碳酸钠—氢氧化钠溶液，即可显色测定。若样品酸度较高，显色后会色浅，则必须提高碳酸钠—氢氧化钠溶液的浓度 1~2 倍。

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 pH=10 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。

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 5 μ g。通常测定范围是 20~250 μ g。

(二) 试剂与器材

1.试剂

(1) 试剂甲:

(A) 10 克 Na_2CO_3 , 2 克 NaOH 和 0.25 克酒石酸钾钠 ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)。

溶解于 500 毫升蒸馏水中。

(B) 0.5 克硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶解于 100 毫升蒸馏水中, 每次使用前, 将

50 份 (A) 与 1 份 (B) 混合, 即为试剂甲。

(2) 试剂乙:

在 2 升磨口回流瓶中, 加入 100 克钨酸钠 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 克钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 及 700 毫升蒸馏水, 再加 50 毫升 85%磷酸, 100 毫升浓盐酸, 充分混合, 接上回流管, 以小火回流 10 小时, 回流结束时, 加入 150 克硫酸锂 (Li_2SO_4), 50 毫升蒸馏水及数滴液体溴, 开口继续沸腾 15 分钟, 以便驱除过量的溴。冷却后溶液呈黄色 (如仍呈绿色, 须再重复滴加液体溴的步骤)。稀释至 1 升, 过滤, 滤液置于棕色试剂瓶中保存。使用时用标准 NaOH 滴定, 酚酞作指示剂, 然后适当稀释, 约加水 1 倍, 使最终的酸浓度为 1N 左右。

(3) 标准蛋白质溶液:

精确称取结晶牛血清蛋白或 γ -球蛋白, 溶于蒸馏水, 浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 左右。

牛血清蛋白溶于水若混浊, 可改用 0.9 % NaCl 溶液。

2. 器材

(1) 可见光分光光度计

(2) 旋涡混合器

(3) 秒表

(4) 试管 16 支

(三) 操作方法

1. 标准曲线的测定：取 16 支大试管，1 支作空白，3 支留作未知样品，其余试管分成两组，分别加入 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 毫升标准蛋白质溶液（浓度为 $250\mu\text{g/ml}$ ）。用水补足到 1.0 毫升，然后每支试管加入 5 毫升试剂甲，在旋涡混合器上迅速混合，于室温（ $20 \sim 25^\circ\text{C}$ ）放置 10 分钟。再逐管加入 0.5 毫升试剂乙（Folin—酚试剂），同样立即混匀。这一步混合速度要快，否则会使显色程度减弱。然后在室温下放置 30 分钟，以未加蛋白质溶液的第一支试管作为空白对照，于 700nm 处测定各管中溶液的吸光度值。以蛋白质的量为横座标，吸光度值为纵座标，绘制出标准曲线。

注意：因 Lowry 反应的显色随时间不断加深，因此各项操作必须精确控制时间，即第 1 支试管加入 5 毫升试剂甲后，开始计时，1 分钟后，第 2 支试管加入 5 毫升试剂甲，2 分钟后加第 3 支试管，余此类推。全部试管加完试剂甲后若已超过 10 分钟，则第 1 支试管可立即加入 0.5 毫升试剂乙，1 分钟后第 2 支试管加入 0.5 毫升试剂乙，2 分钟后加第 3 支试管，余此类推。待最后一支试管加完试剂后，再放置 30 分钟，然后开始测定光吸收。每分钟测一个样品。

进行多试管操作时，为了防止出错，每位学生都必须在实验记录本上预先画好下面的表格。表中是每个试管要加入的量（毫升），并按由左至右，由上至下的顺序，逐管

加入。最下面两排是计算出的每管中蛋白质的量（微克）和测得的吸光度值。

Folin—酚试剂法实验表格：

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
标准蛋白质 (250 μ g/ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0			
未知蛋白质 (约 250 μ g/ml)								0.2	0.4	0.6
蒸馏水	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0	0.8	0.6	0.4
试剂甲	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
试剂乙	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
每管中蛋白质 的量 (μ g)										
吸光度值 (A_{700})										

2. 样品的测定：取 1 毫升样品溶液（其中约含蛋白质 20~250 微克），按上述方法进行操作，取 1 毫升蒸馏水代替样品作为空白对照。通常样品的测定也可与标准曲线的

测定放在一起，同时进行。即在标准曲线测定的各试管后面，再增加 3 个试管。如上表中的 8、9、10 试管。

根据所测样品的吸光度值，在标准曲线上查出相应的蛋白质量，从而计算出样品溶液的蛋白质浓度。

注意，由于各种蛋白质含有不同量的酪氨酸和苯丙氨酸，显色的深浅往往随不同的蛋白质而变化。因而本测定法通常只适用于测定蛋白质的相对浓度（相对于标准蛋白质）。

四、改良的简易 Folin—酚试剂法

（一）试剂

1. 试剂甲：碱性铜试剂溶液中，含 0.5N 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。
2. 试剂乙：与前面的基本法相同。临用时加蒸馏水稀释 8 倍。
3. 标准蛋白质溶液：同基本法。

（二）操作步骤

测定标准曲线与样品溶液的操作方法与基本法相同。只是试剂甲改为 1 毫升，室温放置 10 分钟后，试剂乙改为 4 毫升。在 55℃恒温水浴中保温 5 分钟。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。

五、考马斯亮兰法 (Bradford 法)

(一) 实验原理

双缩脲法 (Biuret 法) 和 Folin—酚试剂法 (Lowry 法) 的明显缺点和许多限制, 促使科学家们去寻找更好的蛋白质溶液测定的方法。

1976 年由 Bradford 建立的考马斯亮兰法 (Bradford 法), 是根据蛋白质与染料相结合的原理设计的。这种蛋白质测定法具有超过其他几种方法的突出优点, 因而正在得到广泛的应用。这一方法是目前灵敏度最高的蛋白质测定法。

考马斯亮兰 G-250 染料, 在酸性溶液中与蛋白质结合, 使染料的最大吸收峰的位置 (λ_{\max}), 由 465nm 变为 595nm, 溶液的颜色也由棕黑色变为兰色。经研究认为, 染料主要是与蛋白质中的碱性氨基酸 (特别是精氨酸) 和芳香族氨基酸残基相结合。

在 595nm 下测定的吸光度值 A_{595} , 与蛋白质浓度成正比。

Bradford 法的突出优点是:

(1) 灵敏度高, 据估计比 Lowry 法约高四倍, 其最低蛋白质检测量可达 $1\mu\text{g}$ 。这是因为蛋白质与染料结合后产生的颜色变化很大, 蛋白质 - 染料复合物有更高的消光系数, 因而光吸收值随蛋白质浓度的变化比 Lowry 法要大的多。

(2) 测定快速、简便, 只需加一种试剂。完成一个样品的测定, 只需要 5 分钟左右。由于染料与蛋白质结合的过程, 大约只要 2 分钟即可完成, 其颜色可以在 1 小时内保持稳定, 且在 5 分钟至 20 分钟之间, 颜色的稳定性最好。因而完全不用像 Lowry 法那样费时和严格地控制时间。

(3) 干扰物质少。如干扰 Lowry 法的 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 离子、Tris 缓冲液、糖和蔗糖

糖、甘油、巯基乙醇、EDTA 等均不干扰此测定法。

此法的缺点是：

(1) 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 Bradford 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 γ -球蛋白为标准蛋白质，以减少这方面的偏差。

(2) 仍有一些物质干扰此法的测定，主要的干扰物质有：去污剂、Triton X-100、十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 0.1N 的 NaOH。(如同 0.1N 的酸干扰 Lowary 法一样)。

(3) 标准曲线也有轻微的非线性，因而不能用 Beer 定律进行计算，而只能用标准曲线来测定未知蛋白质的浓度。

(二) 试剂与器材

1. 试剂：

(1) 标准蛋白质溶液，用 γ -球蛋白或牛血清清蛋白(BSA)，配制成 1.0mg/ml 和 0.1mg/ml 的标准蛋白质溶液。

(2) 考马斯亮兰 G—250 染料试剂：称 100mg 考马斯亮兰 G—250，溶于 50ml 95% 的乙醇后，再加入 120ml 85% 的磷酸，用水稀释至 1 升。

2. 器材：

(1) 可见光分光光度计

(2) 旋涡混合器

(3) 试管 16 支

(三) 操作方法

1. 标准方法

(1) 取 16 支试管, 1 支作空白, 3 支留作未知样品, 其余试管分为两组按表中顺序, 分别加入样品、水和试剂, 即用 1.0mg/ml 的标准蛋白质溶液给各试管分别加入: 0、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1ml, 然后用无离子水补充到 0.1ml。最后各试管中分别加入 5.0ml 考马斯亮兰 G—250 试剂, 每加完一管, 立即在旋涡混合器上混合 (注意不要太剧烈, 以免产生大量气泡而难于消除)。未知样品的加样量见下表中的第 8、9、10 管。

(2) 加完试剂 2~5 分钟后, 即可开始用比色皿, 在分光光度计上测定各样品在 595nm 处的光吸收值 A_{595} , 空白对照为第 1 号试管, 即 0.1mlH₂O 加 5.0mlG—250 试剂。

注意: 不可使用石英比色皿 (因不易洗去染色), 可用塑料或玻璃比色皿, 使用后立即用少量 95%的乙醇荡洗, 以洗去染色。塑料比色皿决不可用乙醇或丙酮长时间浸泡。

考马斯亮兰法实验表格:

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

标准蛋白质	0	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10			
(1.0mg/ml)										
未知蛋白质								0.02	0.04	0.06
(约 1.0mg/ml)										
蒸馏水	0.1	0.09	0.08	0.06	0.04	0.02	0	0.08	0.06	
0.04										
考马斯亮蓝										
G - 250 试剂	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
5.0										
每管中的蛋										
白质量 (μg)										
光吸收值										
(A ₅₉₅)										

(3) 用标准蛋白质量 (μg) 为横座标, 用吸光度值 A₅₉₅ 为纵座标, 作图, 即得到一条标准曲线。由此标准曲线, 根据测出的未知样品的 A₅₉₅ 值, 即可查出未知样品的蛋白质含量。

0.5mg 牛血清蛋白/ml 溶液的 A₅₉₅ 约为 0.50。

2. 微量法

当样品中蛋白质浓度较稀时 (10 - 100 μ g/ml) ,可将取样量 (包括补加的水) 加大到 0.5ml 或 1.0ml, 空白对照则分别为 0.5ml 或 1.0ml H₂O, 考马斯亮蓝 G - 250 试剂仍加 5.0ml, 同时作相应的标准曲线, 测定 595nm 的光吸收值。

0.05mg 牛血清蛋白/ml 溶液的 A₅₉₅ 约为 0.29。

六、紫外吸收法

蛋白质分子中, 酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键, 使蛋白质具有吸收紫外光的性质。吸收高峰在 280nm 处, 其吸光度 (即光密度值) 与蛋白质含量成正比。此外, 蛋白质溶液在 238nm 的光吸收值与肽键含量成正比。利用一定波长下, 蛋白质溶液的光吸收值与蛋白质浓度的正比关系, 可以进行蛋白质含量的测定。

紫外吸收法简便、灵敏、快速, 不消耗样品, 测定后仍能回收使用。低浓度的盐, 例如生化制备中常用的 (NH₄)₂SO₄ 等和大多数缓冲液不干扰测定。特别适用于柱层析洗脱液的快速连续检测, 因为此时只需测定蛋白质浓度的变化, 而不需知道其绝对值。

此法的特点是测定蛋白质含量的准确度较差, 干扰物质多, 在用标准曲线法测定蛋白质含量时, 对那些与标准蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量差异大的蛋白质, 有一定的误差。故该法适于用测定与标准蛋白质氨基酸组成相似的蛋白质。若样品中含有嘌呤、嘧啶及核酸等吸收紫外光的物质, 会出现较大的干扰。核酸的干扰可以通过查校正表, 再进行计算的方法, 加以适当的校正。但是因为不同的蛋白质和核酸的紫外吸收是不相同的, 虽然经过校正, 测定的结果还是存在一定的误差。

此外, 进行紫外吸收法测定时, 由于蛋白质吸收高峰常因 pH 的改变而有变化, 因

此要注意溶液的 pH 值，测定样品时的 pH 要与测定标准曲线的 pH 相一致。

下面介绍四种紫外吸收法：

1. 280nm 的光吸收法

因蛋白质分子中的酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸在 280nm 处具有最大吸收，且各种蛋白质的这三种氨基酸的含量差别不大，因此测定蛋白质溶液在 280nm 处的吸光度值是最常用的紫外吸收法。

测定时，将待测蛋白质溶液倒入石英比色皿中，用配制蛋白质溶液的溶剂（水或缓冲液）作空白对照，在紫外分光光度计上直接读取 280nm 的吸光度值 A_{280} 。蛋白质浓度可控制在 0.1~1.0mg/ml 左右。通常用 1cm 光径的标准石英比色皿，盛有浓度为 1mg/ml 的蛋白质溶液时， A_{280} 约为 1.0 左右。由此可立即计算出蛋白质的大致浓度。

许多蛋白质在一定浓度和一定波长下的光吸收值 ($A^{1\%}_{1cm}$) 有文献数据可查，根据此光吸收值可以较准确地计算蛋白质浓度。下式列出了蛋白质浓度与 ($A^{1\%}_{1cm}$) 值（即蛋白质溶液浓度为 1%，光径为 1cm 时的光吸收值）的关系。文献值 $A^{1\%}_{1cm,\lambda}$ 称为百分吸收系数或比吸收系数。

$$\text{蛋白质浓度} = (A_{280} \times 10) / A^{1\%}_{1cm, 280nm} \text{ (mg/ml)}$$

(\because 1%浓度 \approx 10mg/ml)

例：牛血清清蛋白： $A^{1\%}_{1cm} = 6.3$ (280nm)

溶菌酶： $A_{1\text{cm}}^{1\%}=22.8$ (280nm)

若查不到待测蛋白质的 $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 值，则可选用一种与待测蛋白质的酪氨酸和色氨酸含量相近的蛋白质作为标准蛋白质，用标准曲线法进行测定。标准蛋白质溶液配制的浓度为 1.0mg/ml。常用的标准蛋白质为牛血清清蛋白（BSA）。

标准曲线的测定：取 6 支试管，按下表编号并加入试剂：

管号	1	2	3	4	5	6
BSA (1.0mg/ml)	0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
H ₂ O	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	0
A_{280}						

用第 1 管为空白对照，各管溶液混匀后在紫外分光光度计上测定吸光度 A_{280} ，以 A_{280} 为纵坐标，各管的蛋白质浓度或蛋白质量（mg）为横坐标作图，标准曲线应为直线，利用此标准曲线，根据测出的未知样品的 A_{280} 值，即可查出未知样品的蛋白质含量，也可以用 2 至 6 管 A_{280} 值与相应的试管中的蛋白质浓度计算出该蛋白质的 $A_{1\text{cm}}^{1\%}$

1cm,280nm

2. 280nm 和 260nm 的吸收差法

核酸对紫外光有很强的吸收，在 280nm 处的吸收比蛋白质强 10 倍（每克），但核酸在 260nm 处的吸收更强，其吸收高峰在 260nm 附近。核酸 260nm 处的消光系数是 280nm 处的 2 倍，而蛋白质则相反，280nm 紫外吸收值大于 260nm 的吸收值。通常：

纯蛋白质的光吸收比值： $A_{280}/A_{260} \approx 1.8$

纯核酸的光吸收比值： $A_{280}/A_{260} \approx 0.5$

含有核酸的蛋白质溶液，可分别测定其 A_{280} 和 A_{260} ，由此吸收差值，用下面的经验公式，即可算出蛋白质的浓度。

$$\text{蛋白质浓度} = 1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260} \quad (\text{mg/ml})$$

此经验公式是通过一系列已知不同浓度比例的蛋白质（酵母烯醇化酶）和核酸（酵母核酸）的混合液所测定的数据来建立的。

3. 215nm 与 225nm 的吸收差法

蛋白质的稀溶液由于含量低而不能使用 280nm 的光吸收测定时，可用 215nm 与

225nm 吸收值之差, 通过标准曲线法来测定蛋白质稀溶液的浓度。

用已知浓度的标准蛋白质, 配制成 20 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 的一系列 5.0ml 的蛋白质溶液, 分别测定 215nm 和 225nm 的吸光度值, 并计算出吸收差:

$$\text{吸收差}\Delta = A_{215} - A_{225}$$

以吸收差 Δ 为纵座标, 蛋白质浓度为横座标, 绘出标准曲线。再测出未知样品的吸收差, 即可由标准曲线上查出未知样品的蛋白质浓度。

本方法在蛋白质浓度 20~100 $\mu\text{g/ml}$ 范围内, 蛋白质浓度与吸光度成正比, NaCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 以及 0.1M 磷酸、硼酸和 Tris 等缓冲液, 都无显著干扰作用, 但是 0.1N NaOH, 0.1M 乙酸、琥珀酸、邻苯二甲酸、巴比妥等缓冲液的 215nm 光吸收值较大, 必须将其浓度降到 0.005M 以下才无显著影响。

4. 肽键测定法

蛋白质溶液在 238nm 处的光吸收的强弱, 与肽键的多少成正比。因此可以用标准蛋白质溶液配制一系列 50~500 $\mu\text{g/ml}$ 已知浓度的 5.0ml 蛋白质溶液, 测定 238nm 的光吸收值 A_{238} , 以 A_{238} 为纵座标, 蛋白质含量为横座标, 绘制出标准曲线。未知样品的浓度即可由标准曲线求得。

进行蛋白质溶液的柱层析分离时, 洗脱液也可以用 238nm 检测蛋白质的峰位。

本方法比 280nm 吸收法灵敏。但多种有机物, 如醇、酮、醛、醚、有机酸、酰胺

类和过氧化物等都有干扰作用。所以最好用无机盐，无机碱和水溶液进行测定。若含有有机溶剂，可先将样品蒸干，或用其他方法除去干扰物质，然后用水、稀酸和稀碱溶解后再作测定。