



# 蛋白质含量测定方法



# 多种测定蛋白质含量的方法

- 基于比色度/荧光性的蛋白定量方法（总蛋白质/肽含量）：
  - BCA法（测定范围：5 ~ 2000  $\mu\text{g/ml}$ ）
  - Qubit® 法（测定范围：12.5  $\mu\text{g/mL}$ ~5mg/mL）
  - 紫外吸收法（测定范围：0.1-0.5mg/ml）
- SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)
- 基于MS（质谱分析）的方法：LC-MS液质联用方法等
- 凯氏定氮法（若蛋白质的含氮量已知）
- 此外，双缩脲法（Biuret法）、Folin - 酚试剂法（Lowry法）、考马斯亮蓝法（Bradford法）等

# BCA

## 基于比色度的蛋白定量方法

### 原理

蛋白质分子中的肽键在碱性条件下能与Cu<sup>2+</sup>络合生成络合物，同时将Cu<sup>2+</sup>还原成Cu<sup>+</sup>。二喹啉甲酸及其钠盐是一种溶于水的化合物，在碱性条件下，可以和Cu<sup>+</sup>结合生成深紫色的化合物，这种稳定的化合物在562nm处具有强吸收值，并且化合物颜色的深浅与蛋白质的浓度成正比。故可用比色的方法确定蛋白质的含量。

### 操作步骤

#### 1. 绘制标准曲线

以牛血清白蛋白含量为横坐标，以吸光值为纵坐标。

#### 2. 样品测定

向样品中加入BCA试剂，摇匀，于37°C保温30min，冷却至室温后在595nm处比色。

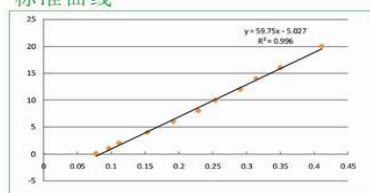
3. 根据样品的吸光值从标准曲线上查出样品的蛋白质含量。

样品测定浓度范围：在5 ~ 2000 µg/ml

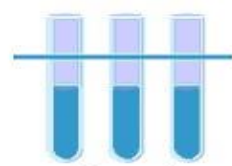
- 标准方案： 37°C，30分钟（检测范围= 20-2000µg/mL）
- 室温方案： 室温，2小时（检测范围= 20-2000µg/mL）
- 增强方案： 60°C，30分钟（检测范围= 5-250µg/mL）



标准曲线



Incubate: 30 min. at 37°C



Then cool

Spectrophotometer



Read at 562 nm

BCA蛋白浓度测定试剂盒

组成	包装 (500微孔)
BCA试剂	100ml
Cu试剂	3ml
PBS稀释液	30ml
BSA蛋白标准 (5mg/ml BSA)	1ml

保存
2-8°C
2-8°C
2-8°C
-20°C

# Qubit® 分析方法

## 基于荧光性的蛋白定量方法

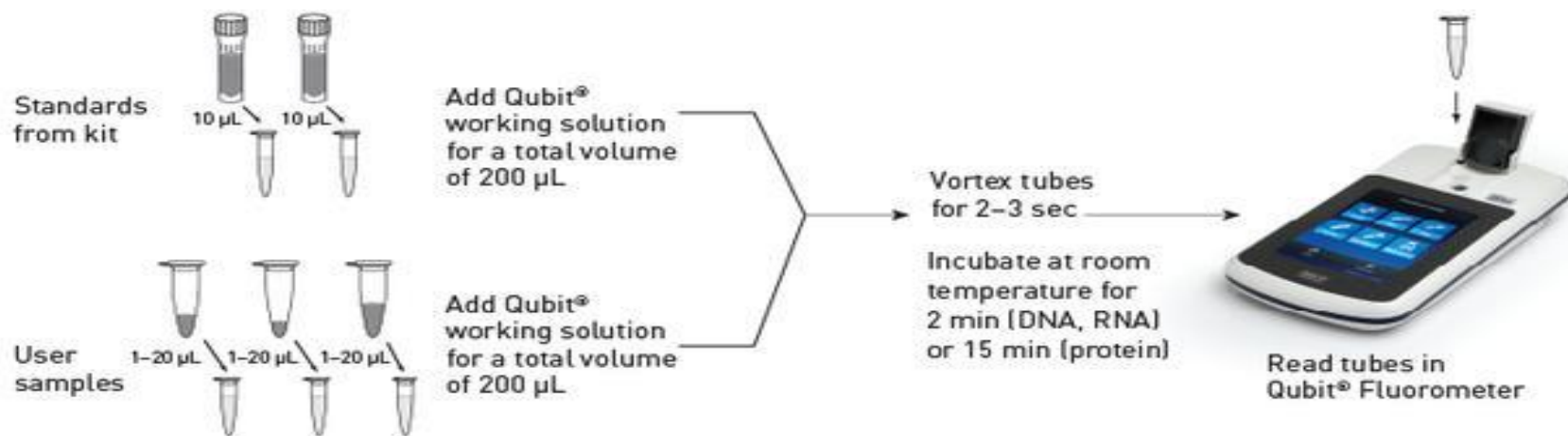
### 原理

Qubit® 分析试剂盒测定样品中的可溶性蛋白。靠荧光染料与蛋白质特意结合后发出荧光，再检测产生荧光量的多少来定量。这个方法能把蛋白质与DNA、RNA、降解核酸、游离核苷酸及其它杂质区分开采用。

### 操作流程

建立标准曲线----样品处理----读取分析数据

Qubit® 分析试剂盒，能精确定量样品初始浓度范围为：12.5 µg/mL~5mg/mL的蛋白质样本。



# SDS-PAGE ( sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 )

## 原理

根据检体中蛋白质分子量大小的不同，使其在电泳胶中分离。蛋白质的迁移率主要取决于它的相对分子质量，而与其所带电荷和分子形状无关。

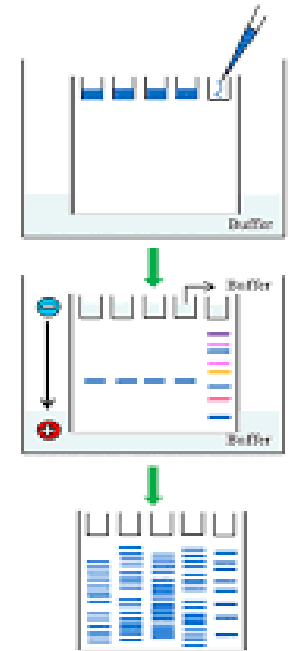
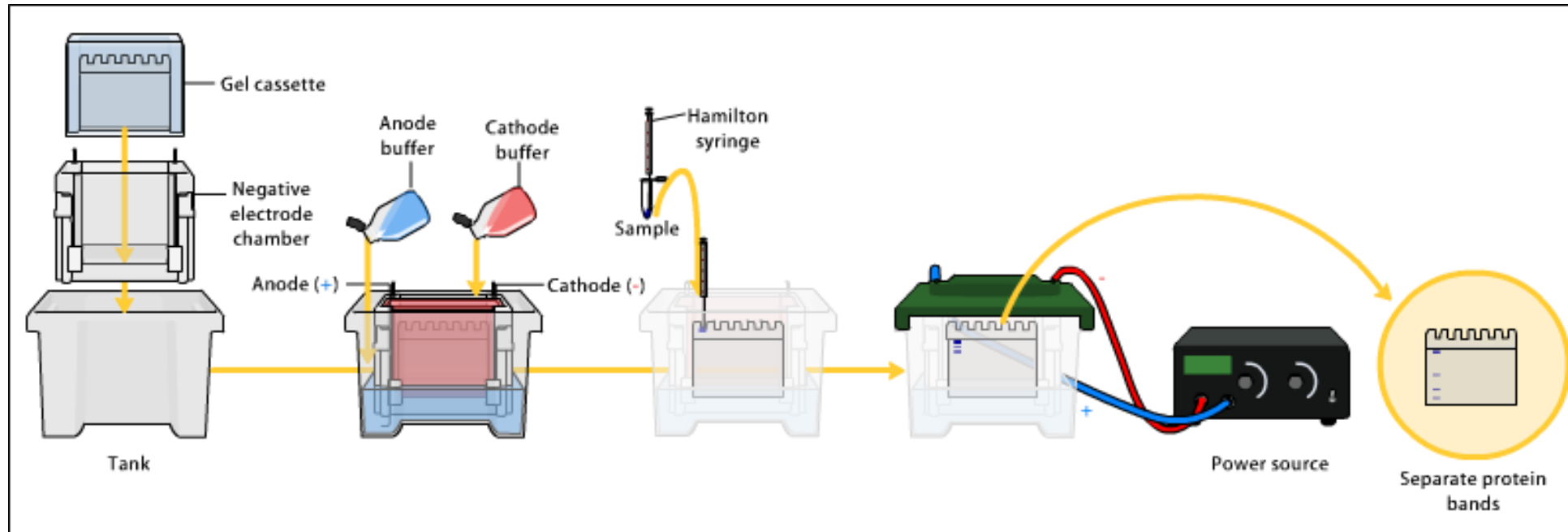
SDS-PAGE是在聚丙烯酰胺凝胶系统中加入阳离子去污剂 ( SDS ) —— SDS能断裂分子内和分子间氢键，使分子去折叠，破坏蛋白质的二级和三级结构；分子被解聚成多肽链，解聚后的氨基酸侧链和SDS结合成蛋白- SDS胶束，所带的负电荷具有相同密度，且大大超过了蛋白原有的电荷量，从而掩盖了不同种类蛋白质间原有的电荷差别。这样就消除了不同分子间的电荷差异和结构差异。多肽结合SDS的量只与其分子量成正比，而与多肽序列无关，所以SDS多肽复合物在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移率只与多肽的大小有关。

当分子量在15KD到200KD之间时，蛋白质的迁移率和分子量的对数呈线性关系，符合下式： $\log MW = k - bX$ 。式中：MW为分子量，X为迁移率，k、b均为常数，若将已知分子量的标准蛋白质的迁移率对分子量对数作图，可获得一条标准曲线，未知蛋白质在相同条件下进行电泳，根据它的电泳迁移率即可在标准曲线上求得分子量。

# SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)

## 操作步骤

1. 凝胶的制备，包括分离胶和浓缩胶（也可直接购买成品胶）
2. 电泳步骤：处理样品----上样----加入缓冲液----接通电源进行电泳----凝胶板剥离----染色----脱色----漂洗----拍照----实验结果分析



# LC-MS液质联用方法

可被用于检测低量的残余蛋白

## 原理

液质联用（HPLC-MS）又叫液相色谱-质谱联用技术，它以液相色谱作为分离系统，质谱为检测系统。样品在质谱部分和流动相分离，被离子化后，经质谱的质量分析器将离子碎片按离子的质荷比分离，然后经检测器测量各种离子谱峰的强度得到质谱图。质谱分析是先将物质离子化，而实现分析目的的一种分析方法。

应用LC/MS/MS在复杂体系中定量蛋白质的前提是质谱对相应蛋白质定性的结果准确可靠，所以要选择分离蛋白效果较好的色谱柱。

## 操作步骤

系统准备----流动相准备----样品制备----建立方法----数据的采集和处理



novozymes® 

**Rethink Tomorrow**