

几种蛋白质测定方法的比较

李宁

（山西农业大学 农学院，山西 太谷 030801）

**摘要：**蛋白质与生命的起源、存在和进化都密切相关。蛋白质测定涉及到生产和科研的众多领域。本试验用凯氏定氮法、等电点沉淀法、紫外吸收法、双缩脲法、考马斯亮蓝染色法分别对牛奶、鸡蛋、酸奶、豆浆、杏仁露进行蛋白质含量的测定。依此分析比较各种测氮方法，总结出各方法的特点及适用条件。凯氏定氮法是适用范围最广测定结果最准确的方法，比色法则是操作最为简捷快速的方法，适用于结果要求不很精确的实验。  
**关键词：**凯氏定氮；等电点沉淀；紫外吸收；双缩脲；考马斯亮蓝染色；蛋白质；测定  
**中图分类号：**Q503      **文献标识码：**A

The Comparison on Various Methods for Determing Different Proteins

LI Ning

(College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801, China)

**Abstract:** The life origin, the existence and the evolution all makes closer connection with the proteins. The protein determination has relation to the production and the scientific research. This experiment tests the concentrion of proteins of the milk, the egg, the yogurt, the soybean milk, and the almond dew by the methods of Kjeldahl, i. e. UV spectrophotometric method, Isoelectric focusing, Biuret Reaction, Coom assie brilliant blue. According to the analysis of this experiment, we can compare each method and summarize the traits and the suitable conditions of various methods. The method of Kjeldahl is the most accurate method. The method of photometer is the most simple method, and is suitable for the experiment required less precision.

**Key words:** Kjeldahl; Isoelectric focusing; UV spectrophoto metric; Biuret; Coomassie brilliant blue; Protein; Determining

蛋白质是构成生物体细胞组织的重要成分。食物中的蛋白质是人体中氮的唯一来源。具有糖类和脂肪不可替代的作用<sup>[1]</sup>。蛋白质与营养代谢、细胞结构、酶、激素、病毒、免疫、物质运转、遗传等密切相关，其分离与定性、定量分析是生物化学和其它生物学科、食品检验、临床检验、诊断疾病、生物药物分离提纯和质量检验中最重要的工作。目前测定蛋白质含量的方法有多种，如凯氏定氮法<sup>[2]</sup>、等电点沉淀法、紫外吸收法、双缩脲法、考马斯亮蓝染色法<sup>[3]</sup>等几种方法，但就方法的准确性和精密度以及应用程度而言，国际经典测定方法——凯氏定氮法为首选，该法也是相关专业人员必须掌握的经典测试方法之一。现在尽管有很多先进的自动或半自动凯氏定氮仪，但这些仪器不仅价格昂贵，且需专门试剂，目前尚难普及<sup>[4]</sup>。本实验分别用以上五种方法对牛奶、鸡蛋、酸奶、豆浆、杏仁露进行蛋白质浓度的测定，通过对实验的过程和结果的分析来总结这几种方法的适用范围及实用性。通过分析表明，针对不同的待测样品以及对测定结果准确性的要求不同，我们可以采用不同的方法来测定样品中蛋白质的含量。

1 材料与方法

1.1 材料仪器

消毒牛奶，鸡蛋，酸奶，豆浆，杏仁露，0.2 mol · L<sup>-1</sup>

pH4.7 醋酸—醋酸钠缓冲液，乙醇—乙醚等体积混合液，浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，40%氢氧化钠，30%过氧化氢，2%硼酸溶液，0.050 mol · L<sup>-1</sup> 标准盐酸溶液，硫酸钾—硫酸铜接触剂，混合指示剂，标准蛋白溶液，双缩脲试剂，考马斯亮蓝 G—250 试剂，离心机，布氏漏斗，抽滤泵，凯氏定氮仪，紫外分光光度计，可见光分光光度计。

1.2 方 法

1.2.1 利用凯氏定氮法测定蛋白质含量

将待测样品加入凯氏烧瓶中，加入硫酸钾—硫酸铜接触剂、浓硫酸和 30%过氧化氢，放入消化炉消化至溶液澄清。然后取消化好的样品在凯氏定氮仪上蒸馏定氮，滴定，记录。测定样品含氮量。每个样品做三次重复，取平均值。

1.2.2 利用等电点沉淀法测定蛋白质含量

取待测样品 3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心去脂肪后加醋酸—醋酸钠缓冲液，产生大量絮状物后再次离心，得蛋白粗品。蒸馏水洗沉淀三次，离心弃上清。转移沉淀至布氏漏斗抽滤，抽干后的制品用乙醇—乙醚等体积混合液洗涤二次，再用无水乙醚洗二次，抽干。将沉淀放在表面皿上风干，得蛋白制品。称量、记录。每个样品做三次重复，取平均值。

1.2.3 利用紫外吸收法测定蛋白质含量

取待测样品制成蛋白浓度大约在 0.1~1.0 mg · mL<sup>-1</sup> 的

蛋白质溶液，用紫外分光光度计进行比色，对照标准曲线得出样品含氮量。

取 7 支试管，编号后按表 1 依次加入标准蛋白溶液和氢氧化钠溶液。

1. 2. 3. 1 标准曲线的制作

表 1 紫外吸收法测定蛋白质含量的标准曲线溶剂配加表

管号 The number of tube	0	1	2	3	4	5	6
标准蛋白溶液 (mL) The standard protein solution (mL)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0.1 mol · L <sup>-1</sup> 氢氧化钠 (mL) 0.1 mol · L <sup>-1</sup> NaOH (mL)	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0

以 0 管为空白，在 280 nm 下测定各管中液体的吸光度值，以各管标准蛋白毫克数为横坐标，对应得 A280 值为纵坐标，做标准曲线图。

1. 2. 3. 2 样品测定

取适量待测液用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> NaOH 稀释 10 倍后装入石英比色皿中，测 A280，对照标准曲线求得蛋白质含量 (mg · mL<sup>-1</sup>)。每个样品重复三次，取平均值。

1. 2. 4 利用双缩脲法测定蛋白质含量

取待测样品制成蛋白浓度大约在 1~10 mg · mL<sup>-1</sup> 的蛋白质溶液，加双缩脲试剂染色 30 min，用可见光分光光度计进行比色，对照标准曲线得出样品蛋白质含量。

1. 2. 4. 1 标准曲线的制作

取 6 支试管，编号后按表 2 依次加入标准蛋白溶液、蒸馏水和双缩脲试剂。

表 2 双缩脲法测定蛋白质含量的标准曲线溶剂配加表

管号 The number of tube	0	1	2	3	4	5
标准蛋白溶液 (mL) The standard protein solution (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 (mL) Distilled water (mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
双缩脲试剂 (mL) Biuret reagent (mL)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0

以 0 管为空白，在 540 nm 下测定各管中液体的吸光度值，以各管标准蛋白毫克数为横坐标，对应得 A540 值为纵坐标，做标准曲线图。

1. 2. 4. 2 样品测定

取适量样品，测定方法与绘制标准曲线 5 号管过程相同，仅用被测样品代替标准蛋白溶液，根据被测样品的 A540 值，在标准曲线上查其对应的蛋白毫克数，即为所测蛋白溶液的含量 (mg · mL<sup>-1</sup>)。每个样品重复三次，取平均

值。

1. 2. 5 利用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量

取待测样品加入考马斯亮蓝 G—250 试剂放置 5 min 后，用可见光分光光度计比色，对照标准曲线得出样品蛋白质含量。

1. 2. 5. 1 标准曲线的制作

取 6 支试管，编号后按表 3 依次加入各试剂。

表 3 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量的标准曲线溶剂配加表

管号 The number of tube	0	1	2	3	4	5
标准蛋白溶液 (mL) The standard protein solution (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 (mL) Distilled water (mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
考马斯亮蓝液 (mL) Coomassie brilliant blue reagent (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

以 0 管为空白，在 595 nm 波长下比色测定并记录 A595。以各管对应标准蛋白质含量为横坐标、A595 为纵坐标，绘制标准曲线。

1. 2. 5. 2 样品测定  
万方数据

取适量样品，加入 5 mL 考马斯亮蓝 G—250 试剂并摇匀，放置 5 min 后，在 595 nm 波长下比色记录 A595。根据所测 A595 从标准曲线上查得蛋白质含量。每个样品重复三次，取平均值。

2 结果与分析

2.1 测定结果

样品蛋白质含量测定结果见表 4。

2.2 测定结果分析

2.2.1 凯氏定氮法

凯氏定氮法可测出全部 5 种样品的蛋白含量，测试结果准确，只是实验所需仪器多为特制的玻璃仪器，易于破损，特别是蒸馏与吸收装置复杂，不便于操作，实验过程所需时间较长，操作复杂。需在通风橱中进行消化，实验过程会产生毒气，并且样品与浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  共热，有一定危险。

表 4 样品蛋白质含量测定结果  
Table 4 The concentration of protein in the sample

	牛奶 Milk	豆浆 Soybean milk	酸奶 Yogurt	鸡蛋 Egg	杏仁露 Almond dew
凯氏定氮法 Kjeldahl	3.09	0.80	2.12	10.16	0.74
等电点沉淀法 Isoelectric focusing	3.73	0.87	2.41	— —	— —
紫外吸收法 UV spectrophoto metric	— —	2.87	— —	6.74	— —
双缩脲法 Biuret Reaction	3.17	0.90	2.15	10.57	0.80
考马斯亮蓝法 Coom assie brilliant blue	3.12	0.87	2.17	10.70	0.83

2.2.2 等电点沉淀法

等电点沉淀法可测出牛奶、豆浆、酸奶的蛋白含量，实验操作方法比较简单。但单独利用此方法来分离生化产品效果并不太理想，因为即使在等电点，有些两性物质仍有一定的溶解度，并不是所有的蛋白质都在等电点时都能沉淀下来，特别是同一类两性物质的等电点十分接近时。

2.2.3 紫外吸收法

紫外吸收法无法测出牛奶、酸奶、杏仁露的蛋白含量，测出的豆浆和鸡蛋的蛋白含量也与实际值相差较大，不具实际使用价值。此方法实验过程简单，只要一台紫外分光光度计，不需要其它试剂就可进行实验，适用于测试无色样品，对于有色样品，需进行预处理，排除颜色干扰后才适用于此方法。

2.2.4 双缩脲法

双缩脲法适用于被测的 5 种样品，实验操作简便迅速，但其缺点是灵敏度较低，蛋白质量须在  $1\sim 20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时测定结果较准。因此实验前要估测被测样品的蛋白含量，把样品稀释至蛋白浓度为  $1\sim 20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2.5 考马斯亮蓝染色法

考马斯亮蓝染色法可以测出被测的全部 5 种样品，此方法快速、灵敏，但只有微量蛋白的测定时结果才准确，因此在实验前应将样品稀释至蛋白浓度为  $0.1\sim 1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。而且实验必须在 1 h 内完成，不然测试结果不准确。

3 结 论

凯氏定氮法、双缩脲法和考马斯亮蓝染色法三种方法都可以测出被测的全部 5 种样品，其中凯氏定氮法是目前分析有机化合物含氮量常用的方法，是一种蛋白质测定的经典方法，适用样品广泛，测试结果准确。而双缩脲法和考马斯亮蓝染色法则测试过程简单、迅速，在可以准确配取标准蛋白溶液而准确性要求不高的测试中可以根据含氮量的不同选择这两种方法。等电点沉淀法多用于牛奶中酪蛋白的提取、测定。在实际生产中可与有机溶剂沉淀法、盐析法并用，以提高实验的准确性。紫外吸收法对有色被测样品是不适用的，在测无色样品时，由于其操作简便、迅速，不消耗样品，低浓度盐类不干扰，因此也是经常被采用的蛋白质测定方法。而怎样对样品进行预处理以达到紫外吸收法的测定条件也是我们今后需要探索的。

参 考 文 献

[1] 刘志皋. 食品营养学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991: 98-144.  
[2] 国家标准总局. 粮食、油料检验粗蛋白质测定法 [S]. GB 5511—1985.  
[3] 俞建瑛, 蒋宇, 王善利. 生物化学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 162-178.  
[4] 王雅. 蛋白质测定实验的研究 [J]. 实验室研究与探索, 2005, 24 (4): 58-59.