



生物化学实验

生物大分子定量测定技术

3.7 标准曲线制作与蛋白质浓度计算

北京大学 王青松 胡晓倩

比色分析法

- 在光谱分析的定量测定中，蛋白质、核酸、糖类等生物大分子多数采用可见光波区进行比色分析。在一定浓度范围内，溶液中溶质的含量与溶液的颜色深浅成正比，而溶液颜色又与透过该溶液的单色光成反比，与溶液吸收该单色光的强弱成正比。因此可通过测定溶液颜色变化来确定该溶液中溶质的含量。**这种分析方法称为比色分析法。**
- 根据朗伯-比尔定律，待测溶液在一定浓度范围内，吸光值的大小与浓度成正比。只要测出待测溶液的吸光值和标准溶液的吸光值，将待测溶液的吸光值与标准溶液的吸光值进行比较，即可知道待测溶液的浓度，进而推出溶液中溶质的含量。

比色分析法分类

- 生物大分子的定量分析中，大部分都使用比色法。比色溶液分为两大类：



比色分析法分类

- **本色溶液**：分子自身具有生色基团或显色离子，溶解在溶液中会自动产生颜色。如血红蛋白、铁蛋白等。
- **显色溶液**：分子中没有显色基团，要与显色剂反应产生比较稳定的颜色。如双缩脲试剂、福林-酚试剂、茚三酮等，可与蛋白质分子中某些基团反应产生稳定的颜色。
- **染色溶液**：自身没有显色基团，通过与某些染料染色后，可进行比色。染色剂有：考马斯亮蓝G-250，氨基黑10B等。
- **无色溶液**：生物大分子中含有某些特殊生色基团，可利用它们的最大吸收峰 λ_{\max} 进行比色测定。
 - 蛋白质芳香族氨基酸：280 nm处有最大吸收峰。
 - 核酸分子中含有碱基：260 nm处有最大吸收峰。

比色分析的测定方法

消光系数法

标准曲线法

回归方程法

标准管法

标准系数法

消光系数法

- 消光系数是物质的特征常数，可根据样品测得的吸光值和消光系数，计算出浓度。

$$C = \frac{A}{EL}$$

- C: 浓度
- A: 吸光值
- E: 消光系数
- L: 光程

消光系数法计算蛋白质浓度

- 已知某个蛋白质的消光系数，可在280 nm处测出该蛋白质的吸光值，就可计算出其浓度。
- 方法：将待测蛋白质稀释成一定浓度，使该溶液在280 nm处的吸光值（ $A_{280\text{ nm}}$ ）处于0.1~1.0之间，根据 $A_{280\text{ nm}}$ 和该蛋白质的消光系数，按下面公式计算其浓度。

$$\text{蛋白质浓度 (mg/mL)} = \frac{A_{280\text{ nm}} \times N}{E_{1\text{ cm}}^{1\%}} \times \frac{1000}{100} \quad (N \text{ 为稀释倍数})$$

示 例

- 已知牛血清白蛋白BSA的 $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 6.6$ ，蛋白质溶液稀释50倍，测得的 $A_{280\text{ nm}}$ 为0.27，则：

$$\text{蛋白质浓度} = \frac{0.27 \times 50}{6.6} \times \frac{1000}{100} = 20.5 \text{ mg/mL}$$

标准曲线法

- 在吸光值与浓度成线性关系的浓度范围内，配制一系列由小到大的标准溶液，在相同条件下，分别测定其吸光值，然后以吸光值（A）为纵坐标，标准液浓度（C）为横坐标，绘制A-C曲线，即为标准曲线，或称工作曲线。
- 制作标准曲线时，**最低要选5种浓度递增的标准液**，测出的数据至少要3点落在一直线上，这样标准曲线方可使用。
- 在标准溶液测定的相同条件下，测出样品的吸光值，从标准曲线上直接查出它的浓度，并计算出样品的含量。

标准曲线法的优点

- 标准曲线法是比色定量测定最常用的方法。优点：
 - 1) 在无法得知待测样品消光系数的情况下，或分析大批样品时，标准曲线法比较方便。
 - 2) 有标准溶液对照，准确度更高。
 - 3) 在固定仪器和实验条件前提下，标准曲线可供一段时间使用。
- **注意：利用标准曲线法时，待测样品的吸光值不要超出标准溶液的最大和最小吸光值。**

标准曲线制作方法

- **坐标纸作图法**

- 计算出每个标准蛋白质浓度的吸光值的平均值，扣除空白管的吸光值，以其为纵坐标，每管标准蛋白质含量 (μg) 或浓度 ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$) 为横坐标，在坐标纸上绘制标准曲线。
- 用待测样品的吸光值在标准曲线上查出其对应的蛋白质含量，根据实验中所加入待测蛋白质溶液的体积计算出其浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 mg/mL) 。

- **Excel软件作图法**

- 使用excel软件绘制标准曲线。

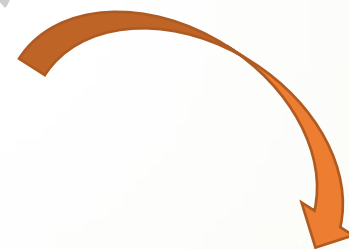
excel作图法绘制标准曲线

1. excel表中输入吸光值与标准溶液的浓度值
2. 插入：X-Y散点图
3. 添加趋势线
4. 显示公式及R平方值
5. 利用公式，计算待测样品的含量
6. 计算待测样品的浓度

1. 输入吸光值与标准溶液含量值

- 如下图，第1列为吸光度，第2列为标准品的蛋白质含量，在excel表中输入相应的数值。

孔号	1	2	3	4	5	6
蛋白质含量 (μg)	0	0.8	1.6	2.4	3.2	4.0
A _{595nm} 平均	0.374	0.488	0.614	0.738	0.814	0.897

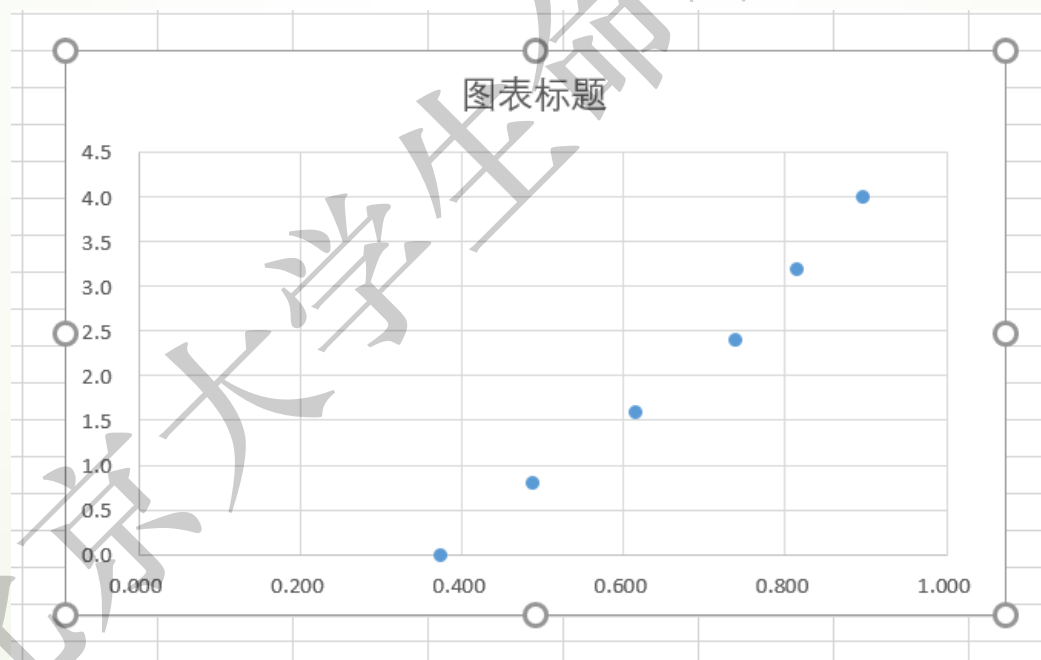


标准液的
蛋白质含量

吸光值 (A _{595 nm})	蛋白质含量 (μg)
0.374	0.0
0.488	0.8
0.614	1.6
0.738	2.4
0.814	3.2
0.897	4.0

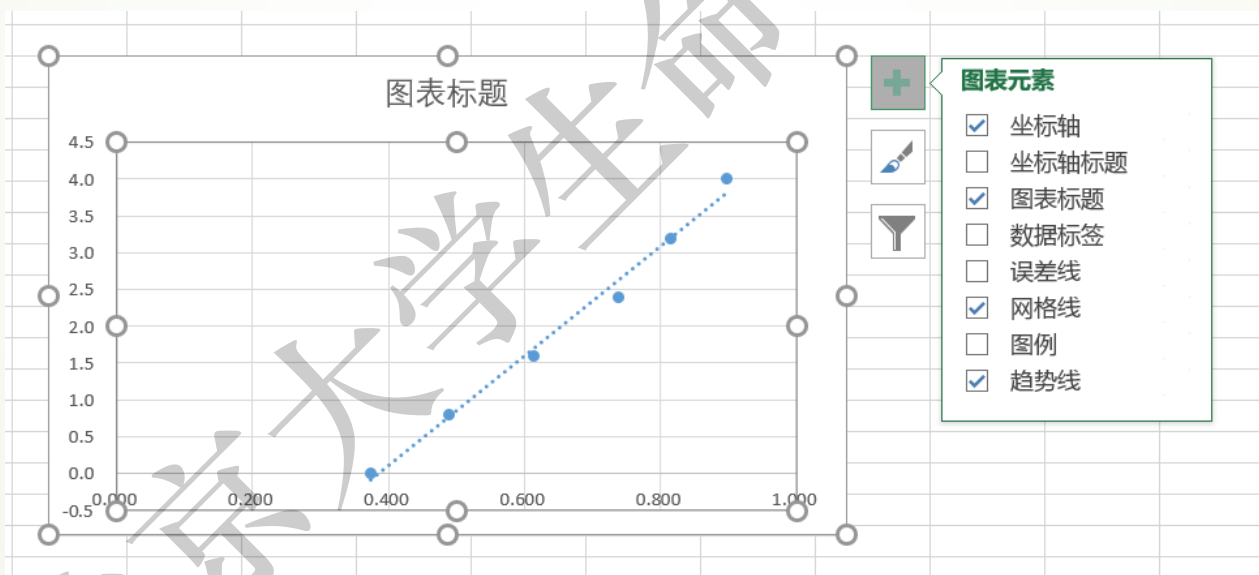
2. 插入：X-Y散点图

- 鼠标选中表格区域的2列共12个数值，excel中**点击“插入”**，创建以吸光度为横坐标（X轴）、蛋白质含量为纵坐标（Y轴）的散点图。



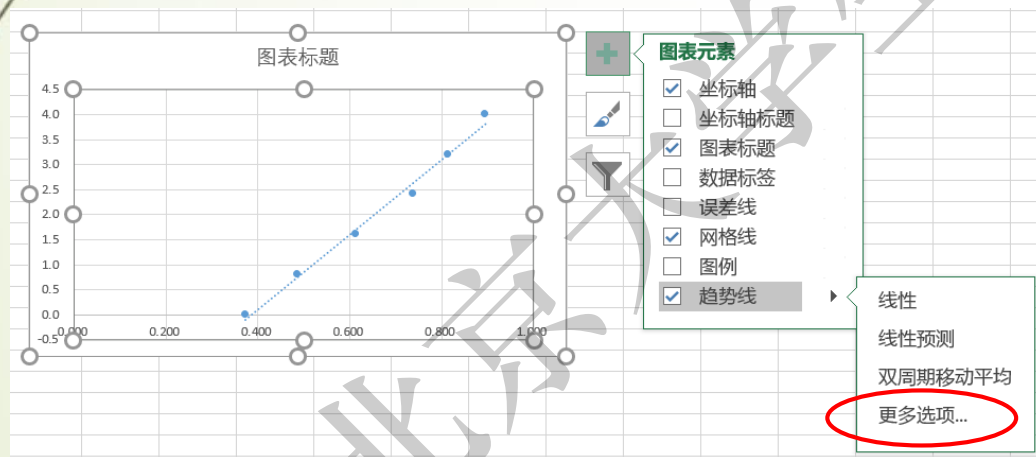
3. 添加趋势线

- 鼠标左键选中所创建的图表，**点击右上角的“+”**后，显示“图表元素”选项卡
- 用鼠标勾选“趋势线”选项。



4. 显示公式及R平方值

- 鼠标左键选中所创建的图表，点击右上角的“+”后，显示“图表元素”选项卡；
- 鼠标指针移动到“趋势线”位置，其右侧出现1个小三角；
- 鼠标左键点击进入，选择“更多选项”，显示“设置趋势线格式”；
- 选中下方方的“显示公式”和“显示R平方值(R)”。



设置趋势线格式

趋势线选项

线性(L) ☒

对数(O) ☐

多项式(P) ☐ 顺序(D) 2

幂(W) ☐

移动平均(M) ☐ 周期(E) 2

趋势线名称

自动(A) ☒

自定义(C) ☐

趋势预测

向前(F) 0.0 周期

向后(B) 0.0 周期

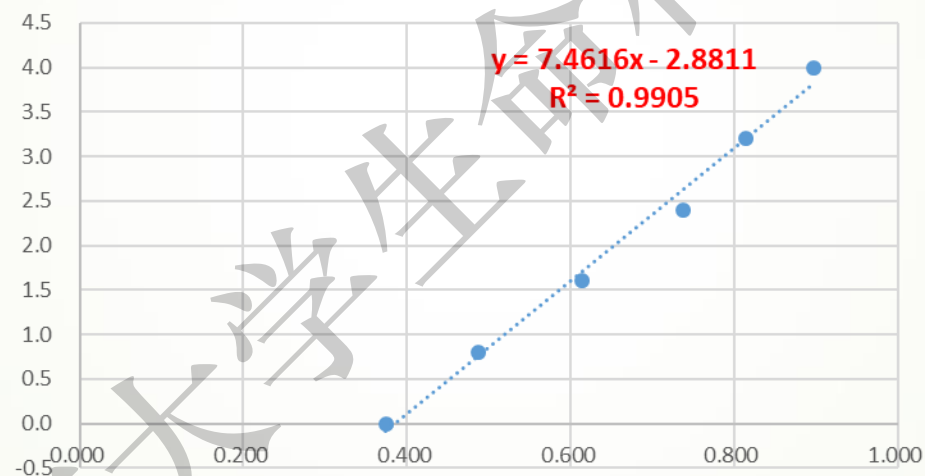
设置截距(S) ☐ 0.0

显示公式(E) ☒

显示 R 平方值(R) ☒

4. 显示公式及R平方值

- 如下红色字体标注，即为此散点图的公式及R平方值



5. 利用公式，计算待测样品的含量

- 在“吸光值”1列，单元格中输入待测样品的吸光值，如B9中输入吸光值 0.44；
- 复制粘贴公式 $y = 7.4616x - 2.8811$ ，到“蛋白质含量”一列中与待测样品的吸光值所在B9单元格对应的单元格中（C9）。
- C9单元格中的公式中的“y”删除，“x”改成“*B9”，即整个公式改成“=7.4616*B9-2.8811”；
- 回车确定，C9中自动显示该样品孔的蛋白质含量。

	A	B	C
1		吸光值 (A _{595 nm})	蛋白质含量 (μg)
2		0.374	0.000
3		0.488	0.800
4		0.614	1.600
5		0.738	2.400
6		0.814	3.200
7		0.897	4.000
8			
9	待测样品	0.440	=7.4616*B9 - 2.8811
10			
11			



	A	B	C
1		吸光值 (A _{595 nm})	蛋白质含量 (μg)
2		0.374	0.000
3		0.488	0.800
4		0.614	1.600
5		0.738	2.400
6		0.814	3.200
7		0.897	4.000
8			
9	待测样品	0.440	0.402
10			
11			

6. 计算待测样品的浓度

- 根据样品孔中所加待测样品的体积，如2 μL ，计算得到待测样品的浓度：

$$\text{待测样品的蛋白质浓度} = \frac{0.402 \mu\text{g}}{2 \mu\text{L}} = 0.201 \text{ mg/mL}$$