



# 生物化学实验

## 生物大分子定量测定技术

### 3.5 蛋白质定量测定：Folin-酚法

北京大学 王青松 胡晓倩

# 概述

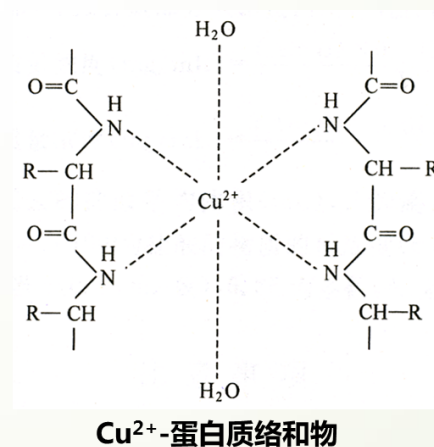
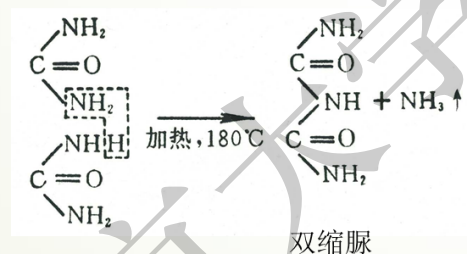
- 1921年, Folin 首先利用蛋白质分子中酪氨酸和色氨酸残基（酚基）与还原酚试剂（磷钨酸-磷钼酸）起蓝色反应。
- 1951年, Lowry对此法进行了改进, 先于样品溶液中加入碱性铜试剂, 再加入酚试剂反应, 提高了灵敏度。因此, **Folin-酚法也叫Lowry法。**
- Folin-酚法灵敏度高, 操作简便, 反应15 min后有最大显色, 并至少可稳定几小时, 是生化实验室常用的蛋白质含量测定方法之一。

# Folin-酚法实验原理

- 第1步 双缩脲反应

在碱性溶液中，双缩脲( $\text{H}_2\text{NOC} - \text{NH} - \text{CONH}_2$ )能与 $\text{Cu}^{2+}$ 作用，形成紫色或紫红色的络合物，这个反应叫做**双缩脲反应**。由于蛋白质分子中含有与双缩脲结构相似的多个肽键，因此有双缩脲反应。

- 在碱性溶液中，蛋白质分子中的肽键与碱性铜试剂中的 $\text{Cu}^{2+}$ 作用，生成紫红色的**蛋白质 -  $\text{Cu}^{2+}$ 复合物**。



# Folin-酚法实验原理

- 第2步 Folin-酚显色反应

Folin-酚试剂在碱性条件下极不稳定，其磷钼酸盐-磷钨酸盐易被酚类化合物还原而呈**蓝色反应**（钼蓝和钨蓝的混合物）。由于蛋白质中含有带酚羟基的酪氨酸（Tyr），可发生此显色反应。

- **蛋白质-  $\text{Cu}^{2+}$  复合物**中所含的酪氨酸或色氨酸残基还原酚试剂中的磷钼酸和磷钨酸，生成**蓝色的化合物**，其色泽深浅与蛋白质含量成正比。

# 实验目的


**Folin-酚法定量测定蛋白浓度的原理和实验操作**

**用标准曲线法测定样品中蛋白质的含量**

**分光光度计和微量移液器的使用方法**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



# 实验试剂器材

牛血清白蛋白标准液  
(150  $\mu\text{g/mL}$ )

待测蛋白样品溶液

Folin-酚甲试剂

Folin-酚乙试剂

试剂和器材

可见分光光度计

可调式移液器

试管及试管架

漩涡混合器

# 实验操作及加样表

- 取14支洁净干燥的试管，按照下表平行操作，每个浓度做2个平行管。  
1-6号试管用于制作标准曲线，7号试管为测定未知蛋白质溶液浓度管。

试管编号	标准曲线						未知
试剂处理	1	2	3	4	5	6	7
标准蛋白质溶液/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	-
待测蛋白质溶液/mL	-	-	-	-	-	-	x
去离子水/mL	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.5 - x
甲试剂/mL	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
每管溶液用漩涡混合器混匀，于室温放置10 min							
乙试剂/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
每管溶液用漩涡混合器迅速混匀，室温放置30 min后，以去离子水作为空白， 在波长640 nm处测定吸光值。							
$A_{640\text{nm}}$ (1)							
$A_{640\text{nm}}$ (2)							
$A_{640\text{nm}}$ 平均值							

# 操作步骤

1. 取14支14支洁净干燥的试管，按照表格加入一定体积的标准蛋白溶液和待测样品



2. 用去离子水将各试管的体积定容到0.5 mL



3. 加入5 mL的甲试剂（碱性硫酸铜溶液），漩涡混合器混匀，于室温放置10 min



4. 加入0.25 mL的乙试剂（Folin-酚试剂），漩涡混合器混匀，于室温放置30 min



5. 以去离子水作为空白，在波长640 nm处测定吸光值。



# 实验数据处理

- **绘制标准曲线**

计算出每个标准蛋白质浓度A640nm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 ( $\mu\text{g}$ ) 为横坐标，在坐标纸上绘制标准曲线。

- **计算待测蛋白质溶液的浓度**

用待测蛋白质的A640nm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 $\text{mg}/\text{mL}$ ) 。

**注：可用excel作图法绘制标准曲线并计算样品的蛋白质浓度**

**详见：3.7 标准曲线制作与蛋白质浓度计算**

# 注意事项

- 1. Folin-酚试剂加入到碱性的铜-蛋白质溶液中后，**必须立即混匀（即加一管混匀一管）**，因Folin-酚试剂**在酸性条件下较稳定**，但还原反应是在碱性条件（pH10）下发生，所以要求在磷钼酸-磷钨酸试剂被破坏之前还原反应即能发生。
- 2. 测定中加入待测蛋白质溶液的体积应使**测定值在标准曲线范围内**。
- 3. 用移液器准确移取溶液，溶液尽量加入试管底部并注意**加样顺序和平行操作**。
- 4. **实验的干扰因素较多**：干扰双缩脲反应和酚试剂反应的因素均可影响测定的结果，常见的干扰试剂有Tris、蔗糖、硫酸铵、巯基化物、酚类及柠檬酸等。在实验测定之前应除去干扰因素，或做空白对照管以排除干扰。