



生物化学实验

生物大分子定量测定技术

3.1 概述

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- 生物大分子分离纯化过程中，经常需要测定生物大分子的含量。生物大分子的定量测定主要是根据它们的物理化学性质，采用物理、化学、染色、荧光激发等方法进行测定。
 - 1) 物理方法：折射率、比重、**紫外吸收**
 - 2) 化学方法：凯氏定氮法、双缩脲法、Folin-酚法、**BCA法**
 - 3) 染色法：**考马斯亮蓝法 (Bradford法)**

生物大分子定量测定

1. 蛋白质的定量测定

2. 核酸的定量测定

3. 糖类的定量测定

1. 蛋白质定量测定方法



1.1 凯氏定氮法

1.2 双缩脲法

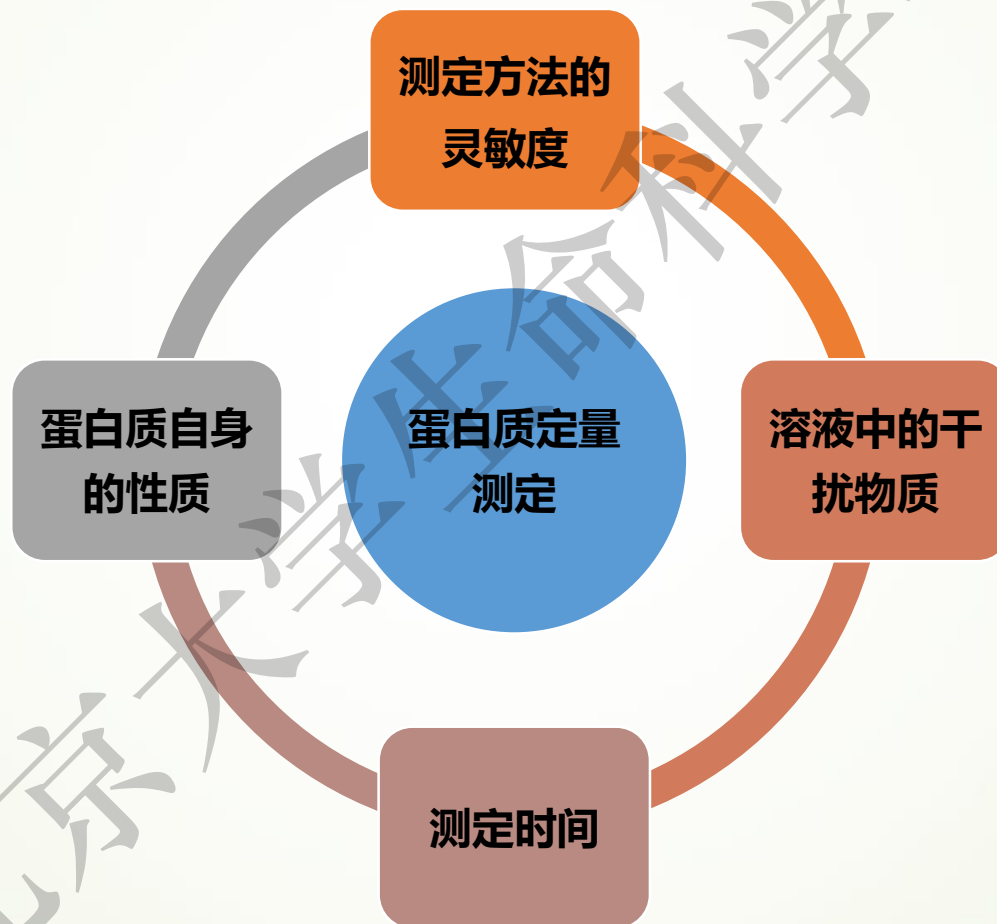
1.3 紫外吸收法

1.4 Folin-酚法

1.5 BCA法

1.6 考马斯亮蓝法 (Bradford法)

蛋白质定量测定的考虑因素



1.1 蛋白质定量测定：凯氏定氮法

- 原理：蛋白质是含氮的有机化合物，蛋白质样品与硫酸和催化剂一起加热消化，使蛋白质分解，分解产生的氨与硫酸结合生成硫酸铵。然后在碱性条件下将铵盐转化为氨，并蒸馏使氨游离，用硼酸吸收后再以盐酸标准溶液滴定，根据酸的消耗量乘以换算系数，由于蛋白质含氮量比较恒定，可由其氮量计算蛋白质含量。
- 凯氏定氮法是测定化合物样品中含氮量的常用方法，是食品中蛋白质含量的现行国家标准。
凯氏定氮法操作复杂费时，在生物化学实验和科研中很少使用。

蛋白质平均含氮量为16%，因此： $\text{含氮量} \times 6.25 = \text{蛋白含量}$

1.2 蛋白质定量测定：双缩脲法

- **原理：**双缩脲 ($\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2$) 在碱性溶液中与硫酸铜反应生成紫红色化合物的反应，称为双缩脲反应。蛋白质分子中的许多肽键 ($-\text{CONH}-$) 在碱性溶液中能与 Cu^{2+} 反应产生紫色化合物。双缩脲反应产生的紫色络合物在 540 nm 处具有最大光吸收，且颜色的深浅与蛋白质浓度成正比，而与蛋白质相对分子质量及氨基酸成分无关，故可用比色法来测定蛋白质含量。

双缩脲法的特点

- 所需时间: 30 min
- 优点: 双缩脲法试剂简单, 操作简便迅速, 干扰相对较少
- 缺点:
 - 1) 灵敏度较差;
 - 2) Tris、氨基酸、甘油等干扰此反应。
- 灵敏度: 常规测定范围为1~10 mg/mL, 微量方法测定范围为0.1~1.0 mg/mL

1.3 蛋白质定量测定：紫外吸收法

- 蛋白质分子中酪氨酸 (Tyr)、色氨酸 (Trp) 和苯丙氨酸 (Phe) 的芳香环结构中含有共轭双键，因此蛋白质具有吸收紫外线的性质，吸收峰最大值在280 nm波长处，蛋白质溶液在该波长的吸光值 ($A_{280\text{ nm}}$) 与其蛋白质浓度呈正比关系，因此紫外吸收法可以用作定量测定蛋白质含量的方法。

紫外吸收法的特点

- 所需时间：约5 min
- 优点：简便、灵敏、快速，对蛋白质无破坏性
- 缺点：
 - 准确度较差，专一性差：由于不同蛋白质中酪氨酸和色氨酸的含量不同，所处的微环境也不同，所以不同蛋白质溶液在280nm的光吸收值也不同。
 - 干扰物质多：样品中如有嘌呤、嘧啶、核酸等能吸收紫外光的物质，会有较大干扰。
- 灵敏度：测定范围在0.1~1.0 mg/mL。

1.4 蛋白质定量测定：Folin-酚法

- 原理：Folin-酚法，也叫Lowry法，测定分2步反应进行：
 - 第1步反应：即双缩脲反应，形成蛋白质- Cu^{2+} 的复合物；
 - 第2步反应：即酚试剂的反应，蛋白质- 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，生成蓝色化合物，其颜色深浅与蛋白质含量成正比。

Folin-酚法的特点

- 所需时间：40 min（反应时间）
- 优点：操作简便，灵敏度较高
- 缺点：干扰物质多，试剂配制较繁琐，反应时间较长
- 灵敏度：Folin-酚法将双缩脲反应与酚试剂反应结合，使反应灵敏度比单独使用酚试剂时提高了3~5倍。测定范围为25~250 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.5 蛋白质定量测定：BCA法

- 原理：BCA法是在碱性条件下，蛋白质将二价铜 Cu^{2+} 还原为一价铜 Cu^{+} ， Cu^{+} 与BCA试剂【Bicinchoninic acid, 2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠，也叫双辛丹宁（金鸡宁）】形成紫色复合物，在562nm处具有最大光吸收。在一定浓度范围内，复合物的光吸收强度与蛋白质含量呈线性关系。通过与标准曲线对比，即可计算待测蛋白的浓度。

BCA法的特点

- 所需时间：30 min（反应时间）
 - 优点：测定快速简便，抗干扰物质能力强，所用试剂单一，且稳定性好。
 - 缺点：反应时间相对较长
 - 灵敏度：BCA法准确灵敏（10~1200 $\mu\text{g/ml}$ ），微量BCA法可检测到0.5 ~ 10 $\mu\text{g/ml}$ 的蛋白质。
- **BCA法是近年来最广泛使用的蛋白质定量测定方法。**

1.6 蛋白质定量测定：Bradford法

- **原理：**Bradford法，也叫考马斯亮蓝法，考马斯亮蓝G-250存在着红色和蓝色两种颜色形式，在游离状态下呈现红色，最大光吸收值在465 nm，当它与蛋白质通过范德华力结合生成蛋白质-CBBG结合物后，颜色由红色转变成蓝色，最大吸收峰由465 nm变成595 nm。在一定蛋白质浓度范围内，蛋白质-CBBG结合物的吸光值与蛋白质含量成正比，通过测定595 nm处吸光值的增加量可以得到与其结合的蛋白质的量，因此可用于蛋白质的定量测定。

Bradford法的特点

- 所需时间：5~10 min（反应时间仅需3 min）
- 优点：灵敏度高，操作快速简便，干扰因素少，线性关系好，试剂配制简单。
- 缺点：由于各种蛋白质中的精氨酸和芳香族氨基酸含量不同，用于不同蛋白质测定时有较大的偏差。
- 灵敏度：蛋白质-CBBG结合物具有很高的消光系数，使得在测定蛋白质浓度时灵敏度很高，常规测定范围为10~100 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白质，微量测定法测定范围是1~10 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白质。

Bradford法是目前最广泛使用的蛋白质定量测定方法。

2. 核酸定量测定方法



2.1 紫外吸收法

2.2 定磷法

2.3 二苯胺法测定DNA含量

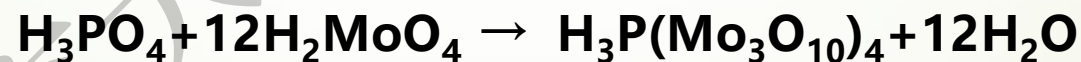
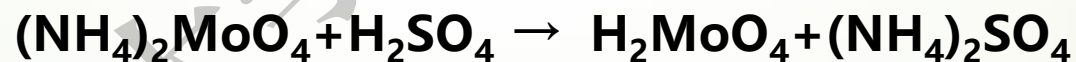
2.4 地衣酚法测定RNA含量

2.1 核酸定量测定：紫外吸收法

- DNA和RNA中嘌呤环和嘧啶环的共轭双键具有吸收紫外光的性质，所以核酸也表现出强烈的紫外吸收特性，最大吸收峰在波长260 nm处。
- 紫外吸收法测定核酸含量**操作简便、快速、灵敏、用量少、不消耗样品**，常应用于核酸的分离纯化过程中的检测。
- 注意：该方法对核酸纯品测定准确度高，若核酸样品中混有较大量的蛋白质或核苷酸等具有紫外吸收特性的物质时对测定干扰较大，应设法除去干扰物质的影响。

2.2 核酸定量测定：定磷法

- 核酸经消化生成无机磷，在酸性条件下与定磷试剂中的钼酸铵反应生成磷钼酸，在还原剂抗坏血酸的作用下，磷钼酸可转变成蓝色的产物钼蓝，在660 nm波长处有最大吸收值。在无机磷含量在1~25 μg范围内生成蓝色的深浅与无机磷的含量成正比，通过测定A660nm，可得到无机磷的含量即样品中的总磷量，总磷量减去样品未经消化而测得的无机磷量即得核酸的含磷量，由此可计算出核酸的含量。
- 此方法准确性强，灵敏度高，最低可测到5 μg/mL的核酸。



2.3 二苯胺法测定DNA含量

- DNA分子中的脱氧核糖基，在酸性溶液中变成 ω -羟基- γ -酮基戊醛，与二苯胺试剂作用生成蓝色化合物，在595nm处有最大光吸收，采用比色法可测定其吸收值。常用来定性或定量测定DNA的含量。
- 此方法测定DNA含量灵敏度不高，每毫升含DNA 20~400微克范围内，光密度与DNA的浓度成正比。在反应液中加入少量乙醛，可以提高反应的灵敏度。

2.4 地衣酚法测定RNA含量

- 地衣酚法利用地衣酚（也叫苔黑酚，3,5-二羟甲苯）进行测定。将含有核糖的RNA与浓盐酸共热时，即发生降解，形成的核糖继而转变成糠醛，糠醛与3, 5—二羟基甲苯反应，在 Fe^{3+} 或 Cu^{2+} 催化下，生成绿色产物。反应产物在670nm处有最大吸收，RNA浓度在10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内，光吸收与RNA浓度成正比。
- 地衣酚法特异性差，凡戊糖均有此反应。

3. 糖类定量测定方法



菲林试剂法

蒽酮法

旋光法

3, 5-二硝基水杨酸法

氨基己糖的测定 (Elson-Morgan法)

己糖醛酸的测定

总硫酸基测定 (联苯胺法)