

凝胶层析法测定蛋白含量的方法

王娜娜¹, 姚秀清¹, 谢小莉¹, 张全²

(1. 辽宁石油化工大学 环境与生物工程学院, 辽宁 抚顺 113001; 2. 抚顺石油化工研究院, 辽宁 抚顺 113001)

摘要: 利用蛋白纯化仪建立一种凝胶层析测定蛋白含量的方法, 采用 HiTrap™ Desalting 5 × 5 mL 色谱柱, 流动相为超纯水, 以蛋白浓度为横坐标, 以蛋白出峰面积为纵坐标, 建立标准曲线。与 BCA 试剂盒法比较, BCA 试剂盒法相对误差范围为 9.13% ~ 144.00%, 此法的相对误差范围为 0.78% ~ 44.72%, 可见凝胶层析法测定结果准确性高, 操作简单, 快速, 是一种可行的测蛋白含量的方法。

关键词: 蛋白测定; 蛋白纯化仪; 凝胶层析; BCA 法

中图分类号: Q 512

文献标识码: A

文章编号: 1671-3206(2011)05-0906-03

A method for protein concentration determination by gel chromatography method

WANG Na-na¹, YAO Xiu-qing¹, XIE Xiao-li¹, ZHANG Quan²

(1. School of Environment and Bioengineering, Liaoning Shihua University, Fushun 113001, China;

2. Fushun Research Institute of Petroleum and Petrochemicals, Fushun 113001, China)

Abstract: Protein was purified by protein purification device to establish a method for determination of protein content. By HiTrap™ Desalting 5 × 5 mL column, mobile phase was ultra-pure water with protein concentration as abscissa and peak area of protein as the vertical axis, the standard curve was established. Compared with BCA kit method, the relative error range of BCA kit method was 9.13% ~ 144.00%, the range of relative error of protein content was 0.78% ~ 44.72%. Measured by protein purification device, the method is high accuracy, simple and fast. It is a feasible method of measuring protein content.

Key words: measuring protein contents; protein purification device; gel chromatography; BCA kit method

测定蛋白质的含量是生物化学研究中最常用、最基本的分析方法之一。目前测定蛋白质含量的方法有: 凯氏定氮法^[1]、双缩脲法、等电点沉淀法、Folin-酚试剂法^[2]、紫外吸收法、考马斯亮蓝染色法^[3]等。从方法的准确性和精密度以及应用程度来说, 经典的测定方法为凯氏定氮法, 但实际上测的不是蛋白质含量, 而是通过测氮含量来推算蛋白质的含量。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^[4], 且实验所需仪器多为特制的玻璃仪器, 易于破损, 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, 实验过程会产生毒气, 有一定危险^[5]。

本实验使用凝胶层析法测定蛋白浓度, 利用蛋白浓度与峰面积成正比, 绘制出蛋白浓度的标准曲线, 建立一种新的蛋白质含量测定方法。此方法操

作简单, 准确性高。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

标准牛血清白蛋白溶液(BSA) 2 mg/mL, 自制; 超纯水; 4,4-二羧基-2,2-二喹啉(BCA) 蛋白质检测试剂盒。凝胶层析色谱条件: 色谱柱 HiTrap™ Desalting 5 × 5 mL, 流动相为超纯水, 流速 1.0 mL/min, 柱温为室温, 紫外检测器, 215 nm 检测。

AKTApurifier 100 型蛋白纯化仪; Lambda 45 UV/Vis Spectrometer 型可见紫外分光光度计。

1.2 溶液配制

1.2.1 BSA 溶液配制 取 17 个 10 mL 离心管, 分两组编号 A ~ I 号和 1 ~ 8 号, 分别按表 1 和表 2 将标准 BSA 溶液(2 mg/mL) 稀释成两组不同浓度的 BSA 溶液 5 mL, 见表 1、表 2。

收稿日期: 2011-03-08 修改稿日期: 2011-03-20

作者简介: 王娜娜(1985-), 女, 山东菏泽人, 辽宁石油化工大学在读硕士研究生, 师从杨翔华教授, 从事微生物资源开发与生物化工方面的研究。电话: 13942395221, E-mail: momey@126.com

表 1 A~I 号 BSA 浓度配制表
Table 1 Preparation of BSA solution with different protein concentrations (A~I[#])

编号	BSA(2 mg/mL) /mL	水/mL	BSA 浓度 /($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
A	5.000	0.000	2.00
B	4.000	1.000	1.60
C	3.000	2.000	1.20
D	2.000	3.000	0.80
E	1.000	4.000	0.40
F	0.500	4.500	0.20
G	0.250	4.750	0.10
H	0.125	4.875	0.05
I	0.000	5.000	0.00

表 2 1~8 号 BSA 浓度配制表
Table 2 Preparation of BSA solution with different protein concentrations (1~8[#])

编号	BSA(2 mg/mL) /mL	水/mL	BSA 浓度 /($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	3.750 0	1.250 0	1.500
2	2.500 0	2.500 0	1.000
3	1.875 0	3.125 0	0.750
4	1.250 0	3.750 0	0.500
5	0.625 0	4.375 0	0.250
6	0.312 5	4.687 5	0.125
7	0.062 5	4.937 5	0.025
8	0.000 0	5.000 0	0.000

1.2.2 工作液的准备 分别取 BCA 试剂盒中工作试剂 A 50 mL 和工作试剂 B 1 mL 混合均匀,待用。

1.3 实验原理

1.3.1 二喹啉甲酸(BCA)法测蛋白原理 在碱性环境下蛋白质分子中的肽键结构能与 Cu^{2+} 络合生成络合物,同时将 Cu^{2+} 还原成 Cu^{+} ,BCA 试剂可敏感特异的与 Cu^{+} 结合,形成稳定的有颜色的复合物,在 562 nm 处有较高的吸光度,吸光度的大小与蛋白质浓度成正比,可根据吸光度的大小来计算蛋白质的含量^[8]。

1.3.2 凝胶层析法测蛋白的原理 凝胶层析用凝胶填料主要有交联葡聚糖、琼脂糖、聚丙烯酰胺凝胶、具有一定网眼的细玻璃珠和这些凝胶的衍生物,

基本原理是利用凝胶分子筛中孔径的分布特点,将物质按分子大小分开,达到分离的方法。本文中使用的 HiTrapTM Desalting 凝胶层析柱中填充的是交联葡聚糖,含有蛋白的溶液通过 HiTrapTM Desalting 柱时,大分子的蛋白呈正态分布连续首先流出,会形成一个蛋白峰,不同浓度的蛋白溶液进样蛋白纯化仪后,蛋白的浓度大小与出峰面积成正比。

1.4 实验方法

1.4.1 BCA 标准曲线的测定方法 将不同浓度的 BSA 溶液 A~I 号和 1~8 号各取 0.1 mL 加入 5 mL 试管中,加入工作液 2 mL,在 37 ℃ 水浴下放置 30 min。以 I 号和 8 号作对照,在可见光 562 nm 下测其吸光度。以 A~I 号的 BSA 浓度为横坐标,其吸光度值为纵坐标,做回归曲线,以 1~7 号的不同浓度的 BSA 溶液检验回归曲线的准确性。

1.4.2 凝胶层析法标准曲线的测定方法 将上述不同浓度的 BSA 溶液 A~I 号和 1~7 号进样 500 μL 到蛋白纯化仪,测定不同 BSA 浓度下的峰面积,以 A~I 号的 BSA 浓度为横坐标,其峰面积为纵坐标做回归曲线,以 1~7 号的不同浓度的 BSA 溶液检验回归曲线的准确性。

2 结果与讨论

2.1 BCA 法测蛋白标准曲线的绘制

以 A~H 的不同 BSA 浓度为横坐标,对应 OD 值为纵坐标回归曲线,见图 1。

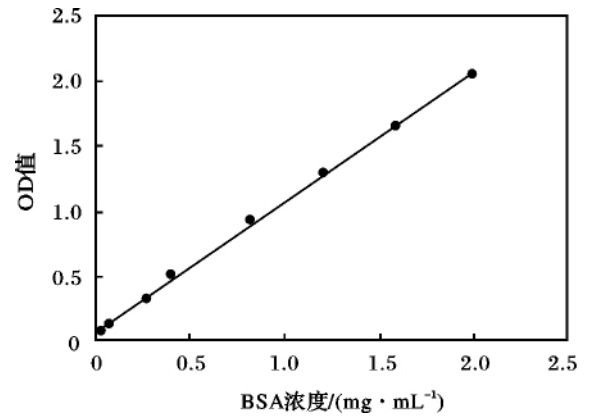


图 1 BCA 法测蛋白标准曲线

Fig.1 Standard curve of BCA method

得到回归方程 $y = 1.001\ 7x + 0.080\ 7$ ($R^2 = 0.995\ 2$)。根据方程和 1~7 号不同 BSA 浓度的吸收值计算 1~7 号不同 BSA 的理论浓度,以检验回归曲线的准确度,见表 3。

表 3 BCA 法 1~7 号不同 BSA 浓度的分析

Table 3 Determination of BSA solution concentration by BCA method (1~7#)			
编号	BSA 标准浓度 /(mg·mL ⁻¹)	测定值 /(mg·mL ⁻¹)	相对误差 /%
1	1.500	1.637	9.13
2	1.000	1.150	15.00
3	0.750	0.868	15.73
4	0.500	0.593	19.20
5	0.250	0.232	7.20
6	0.125	0.092	26.40
7	0.025	0.061	144.00

2.2 凝胶层析法测蛋白标准曲线的绘制

以 A~H 号的不同 BSA 浓度为横坐标,对应凝胶层析法测蛋白的峰面积为纵坐标做回归曲线,结果见图 2。

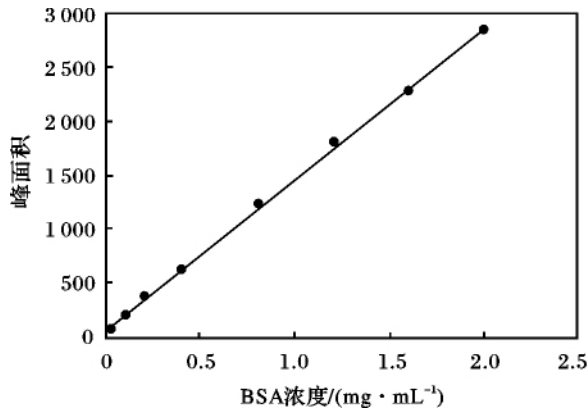


图 2 凝胶层析法测蛋白标准曲线

Fig.2 Standard curve of gel chromatography method

由图 2 可知,得到回归方程: $y = 1\,386.7x + 79.82$ ($R^2 = 0.997\,1$)。根据方程和 1~7 号不同 BSA 浓度的峰面积计算 1~7 号不同 BSA 的理论浓度,以检验回归曲线的准确度,见表 4。

标准曲线的回归方程相关系数 > 0.995 时,结果视为正确^[7],BCA 法标准曲线的相关系数为 0.995 2,凝胶层析法测得的标准曲线的相关系数为 0.997 1,相关系数都大于 0.995,结果视为正确,且凝胶层析法的相关系数大于 BCA 试剂法的相关系数,凝胶层析法测得的结果更准确。

表 4 凝胶层析法 1~7 号不同 BSA 浓度的分析

Table 4 Determination of BSA solution concentration by gel chromatography method (1~7#)				
编号	BSA 标准浓度 /(mg·mL ⁻¹)	峰面积	测定值 /(mg·mL ⁻¹)	相对误差 /%
1	1.50	2 143.62	1.488 3	0.78
2	1.00	1 503.85	1.026 9	2.69
3	0.75	1 101.61	0.736 8	1.76
4	0.50	736.40	0.473 5	5.30
5	0.25	389.62	0.223 4	10.64
6	0.125	175.61	0.069 1	44.72
7	0.025	32.41	0.034 2	36.80

1~7 号不同浓度的 BSA 溶液根据 BCA 法和凝胶层析法测得的标准曲线求出 BSA 测定浓度,见表 3 和表 4,利用凝胶层析法测蛋白含量的相对误差范围为 0.78%~44.72%,BCA 试剂盒法相对误差范围为 9.13%~144.00%,凝胶层析法测蛋白含量的相对误差范围较小。

3 结论

利用蛋白纯化仪建立一种凝胶层析测定蛋白含量的方法,该方法测蛋白含量的相对误差范围为 0.78%~44.72%,结果准确性高,操作简单,快速,是一种可行的测蛋白含量的方法。

参考文献:

[1] 国家标准总局. GB 5511—1985 粮食、油料检验粗蛋白质测定法 [J]. 北京: 中国标准出版社,1985.

[2] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社,1997.

[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.

[5] 李宁. 几种蛋白质测定方法的比较 [J]. 山西农业大学学报,2006,26(2): 132-134.

[6] Smithpk, Krohnpi, Hermansongt, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid [J]. Anal Biochem, 1985,150: 76-85.

[7] 袁燕,段玲燕,郭丽红. BCA 法测定新的植物毒素 蒜头果蛋白质量浓度 [J]. 昆明学院学报,2009,31 (3): 60-61.