

微量 Lowry 法测定蛋白质含量

李红兵 李宗让 王志玲 孙连云

(北京军区军医学校生物化学教研室, 石家庄 050081)

关键词 Lowry 法, 酶联免疫检测仪, 蛋白质定量测定

蛋白质浓度的测定方法有十几种, 实验室中常用的比色法有考马斯亮蓝 G250法^[1]Lowry 法^[2-4], 但它们各有优缺点. 前者虽然具有快速、便于操作等优点, 但某些含半胱氨酸及色氨酸少的蛋白质与考马斯亮蓝 G250不易着色^[5,6], 故用牛血清白蛋白 (BSA) 作标准时, 上述蛋白质与实际测定的值就会有一定的差别, 而 Lowry 法是国内外常用的测定微量蛋白质的经典方法, 但该法有测定范围窄、使用试剂多、耗时等缺点. 我们对经典的 Lowry 法进行了改进, 建立了微量 Lowry 法. 本法对 Lowry 法的试剂配制作了调整, 试验方法作了改进, 最后用酶联免疫检测仪进行测定.

1 材料与方法

1.1 试剂 考马斯亮蓝 G250, Fluka 进口分装; 牛血清白蛋白, 北京生物制品研究所出品; 福林试剂, 河北师范大学生物系提供; 其它试剂均为分析纯.

1.2 仪器 酶联免疫检测仪, 国营华东电子管厂出品; 754紫外分光光度计, 上海第三分析仪器厂出品.

1.3 方法

1.3.1 微量 Lowry 法

标准牛血清白蛋白液: 蛋白母液浓度为 1mg/ml, 使用时, 稀释之.

试剂 A: 1%CuSO₄·5H₂O.

试剂 B: 2%酒石酸钾

试剂 C: Na₂CO₃25g 加 0.25mol/L NaOH 至 500ml.

试剂 D: 使用时, 将上述试剂按 A:B:C=1:1:20 的比例配制而成.

标准曲线的绘制: 取一酶标反应板, 分别加入下列浓度的标准牛血清白蛋白各 50μl: 0.06, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0mg/ml. 空白孔加蒸馏水 50μl. 然后各加试剂 D100μl, 再加入 1mol/L 福林试剂 50μl, 充分混匀. 56℃保温 10min, 取出, 降至室温, 用酶联免疫检测仪进行测定, 波长 490nm. 以蛋白质浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线.

样品的测定: 用 0.5mg/ml 牛血清白蛋白作标准管

测定样品的浓度, 计算公式如下: $C_{\text{样}} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \times 0.5$, 单位: mg/ml.

1.3.2 考马斯亮蓝 G250法^[1]

1.3.3 Lowry 法^[4]

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

取不同浓度的标准牛血清白蛋白, 分别用微量 Lowry 法、Lowry 法及考马斯亮蓝 G250法进行测定, 将结果绘制标准曲线 (图1). 微量 Lowry 法的线性关系良好, $r=0.9984$, $a=0.0067$, $b=0.0148$. 从图1可以看出, 微量 Lowry 法的测定范围与考马斯亮蓝 G250法相同, 比 Lowry 法测定范围宽.

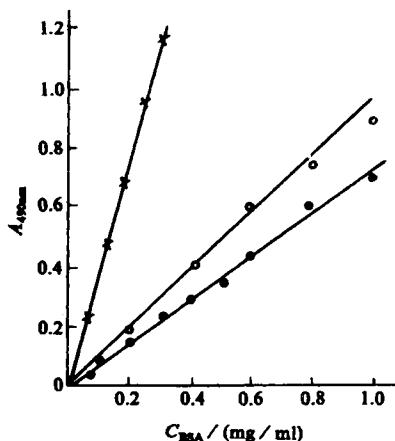


图1 3种方法测定牛血清白蛋白标准曲线

●—●: 微量 Lowry 法;
○—○: 考马斯亮蓝 G250法;
×—×: Lowry 法

2.2 重复试验

收稿日期: 1992-06-13

修回日期: 1992-09-01

取3份不同样品, 每份重复16次, 批内 $CV=1.4-5.3\%$ (表1)。

表1 批内变异系数

样品	蛋白质浓度/ (mg/ml)	CV/%
1	0.764±0.034	4.4
2	0.500±0.026	5.3
3	0.921±0.013	1.4

另取3份样品, 连续测定10d, 每天1次, $\bar{X} \pm s$ 分别为0.763±0.033, 0.494±0.019和0.869±0.051, 批间CV分别为4.4%, 3.9%和5.7%。

2.3 钙调素样品的测定

钙调素是一种小分子的蛋白质, 牛脑钙调素的分子量为16 680, 这种蛋白质不含半胱氨酸和色氨酸。我们用3种方法以牛血清白蛋白为标准分别测定了经过 phenyl-Sepharose 4B 纯化的钙调素的含量 (表2)。

表2 3种方法测定钙调素的含量 (mg/ml)

方 法	样品1	样品2	样品3
微量 Lowry 法	1.286	1.041	0.595
Lowry 法	1.340	0.971	0.544
考马斯亮蓝 G250法	0.566	0.452	0.281

结果表明, 在测定缺少半胱氨酸和色氨酸的钙调素时, 微量 Lowry 法的结果与 Lowry 法近似, 而考马

斯亮蓝 G250法结果明显偏低。这是因为, 微量 Lowry 法及 Lowry 法的测定原理是, 福林试剂主要与铜-蛋白质复合物、酪氨酸及色氨酸反应^[3], 产生深蓝色。而考马斯亮蓝 G250主要与蛋白质中半胱氨酸和色氨酸反应^[6], 钙调素中缺少这两种氨基酸, 故考马斯亮蓝 G250对牛血清白蛋白及钙调素的着色不同。所以, 微量 Lowry 法 (及 Lowry 法) 测定钙调素比考马斯亮蓝 G250法更准确。

微量 Lowry 法的测定时间短 (15min), 节省福林试剂 (仅需50μl), 测定范围比 Lowry 法宽, 方法可靠, 在酶联免疫检测仪上可迅速测定大量样品, 值得推广。

参 考 文 献

- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; **72**: 248
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol chem*, 1951; **193**: 265
- 鲁子贤. 蛋白质和酶学研究方法 (第一册). 北京: 科学出版社, 1988: 3—5
- Cooper T G. *The Tools of Biochemistry*. New york: John wiley & Sons Inc, 1977: 53—55
- Grinstein S, Furuya W. Calmodulin binding to platelet plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1982; **686**: 55
- 文允镛, 张志明, 胡蓓. 钙与钙调素. 北京: 化学工业出版社, 1989: 56
- Raz A, Meromsky L, Zvibel I *et al.* Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *Int J Cancer*, 1987; **39**: 353
- Allen H J. Binding specificity of a human leucocyte carbohydrate-binding protein. *Immun Invest*, 1986; **15**: 379
- Nowak T P, Haywood P L, Barondes S H. Developmentally regulated lectin in embryonic chick muscle and myogenic cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976; **68**: 650
- Baenziger J U, Fiete D. Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. *J Biol Chem*, 1979; **254**(3): 789

(上接第392页)