

经验交流

考马斯亮蓝显色液组分对蛋白质测定的影响

郭敏亮 姜涌明

(江苏农学院基础部, 扬州 225009)

摘要 考马斯亮蓝 (CBB) 显色法测定蛋白质含量的主要缺点之一是线性关系差。通过研究显色液组分对线性关系的影响, 发现显色液 H^+ 浓度是影响线性关系的主要因素, 并提出了一个新的显色液配方来改善考马斯亮蓝蛋白质测定法的线性关系。

关键词 蛋白质测定, 考马斯亮蓝, 线性关系

各种生物样品蛋白质含量的测定是许多生物学实验室经常遇到的问题。数十年来, Lowry 蛋白质测定法一直是最广泛采用的方法^[1,2], 我们实验室也一直采用该方法^[3,4]。近年来, 越来越多的人开始使用 Bradford 法 (也称考马斯亮蓝法)^[5] 来测定蛋白质含量。因为与 Lowry 法相比, Bradford 法具有下列优点: a. 方法简单, 只需一种显色液; b. 反应迅速, 只需一步反应, 显色可在 5 min 之内完成; c. 干扰少, 许多被认为对 Lowry 法有干扰的物质 (如糖、缓冲液、还原剂和络合剂)^[2,5-7] 不影响 Bradford 法。尽管 Bradford 法具有如此多的优点, 但在实际使用中也遇到了不少问题, 其中最主要的问题之一就是线性关系比较差^[5]。关于考马斯亮蓝显色法的线性关系问题有过一些理论分析和解释^[5,8,9], 但实验证据不足, 理论分析和解释也缺少说服力。本文研究了显色液各组分对线性关系的影响, 并提出了改善线性关系的新配方。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白 (BSA), 上海长阳生化制药厂产品, 电泳单点纯。考马斯亮蓝 G-250,

Fluka 产品。其他试剂均为分析纯试剂。吸光度用棱光 752C 紫外可见分光光度计测定。

1.2 测定程序

向 4 ml 具有不同组分的显色液中分别加入 1 ml 不同浓度的牛血清白蛋白溶液。然后以结果中所指示的参比液调光度计的零点, 读取吸光度。所有试验数据均为三次重复的平均值。

2 结果与讨论

2.1 考马斯亮蓝的影响

Bradford 最早提出的考马斯亮蓝 (CBB) 显色液的配方是由考马斯亮蓝、磷酸及少量乙醇组成, 乙醇是用作考马斯亮蓝的溶剂, 因此认为对显色影响不大。这里主要考虑 CBB 和磷酸对显色的影响。图 1 表示的是三种不同 CBB 浓度下所获得的标准曲线。从结果可以看出 CBB 浓度增大时, 灵敏度显著增大, 但标准曲线的线性关系受 CBB 浓度的影响很小。因此在实际使用时应根据被测样品中蛋白质浓度的范围来调整显色液中 CBB 的浓度, 以获得最佳灵敏度。

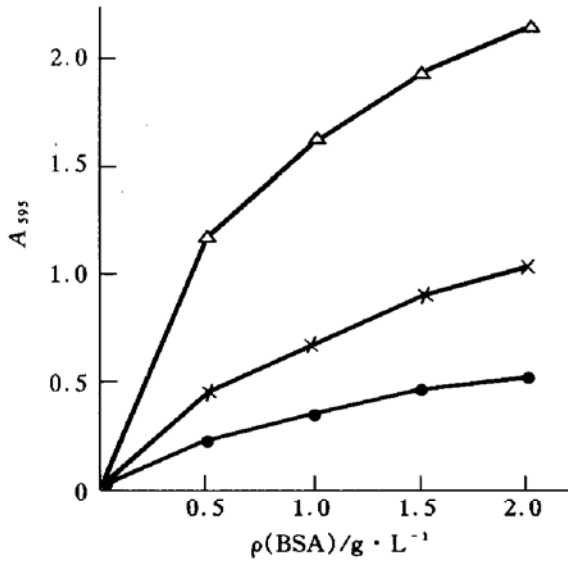


图1 CBB 浓度对显色的影响

测定条件: CBB 终浓度为 $\triangle$ — $\triangle$: 200 mg/L; $\times$ — $\times$: 100 mg/L; $\bullet$ — $\bullet$: 50 mg/L; 其他两种组分的浓度为每毫升含 0.16 ml 85% H_3PO_4 , 0.08 ml 95% 乙醇. 以相应的显色液加相应量的蒸馏水为参比.

2.2 磷酸的影响

以前的一些研究者^[10]已经观察到, 酸浓度增加时, 显色液由蓝色转变为棕色, 表现为 A_{465}/A_{595} 增加. 因此我们详细测定了磷酸浓度对 CBB 在 465 nm 和 595 nm 处吸光度的影响, 结果表明 (图 2), 随着显色液中磷酸浓度

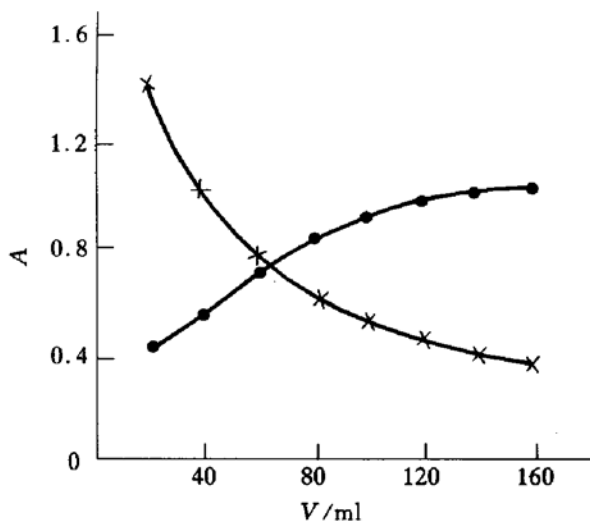


图2 H_3PO_4 浓度对游离 CBB 在 465 nm 和 595 nm 处吸光度的影响

$\bullet$ — $\bullet$: A_{465} ; $\times$ — $\times$: A_{595} ; V: 每升中含 85% 磷酸的体积. 测定液中各成分的终浓度为每毫升含 100 μg CBB, 0.08 ml 95% 乙醇, 以每毫升含 0.08 ml 95% 乙醇的溶液为参比.

的增加, 显色液在 595 nm 处的吸光度下降, 在 465 nm 的吸光度增加, 而用该法来测定蛋白质时使用的波长就是 595 nm. 为此我们进一步研究了显色液中磷酸浓度对标准曲线的影响. 结果显示 (图 3), 磷酸浓度严重影响着标准曲线的线性关系及灵敏度, 酸浓度降低, 灵敏度有增大的趋势, 但酸浓度低至一定程度后灵敏度即开始下降, 而线性关系随酸浓度的降低明显地变差, 为了兼顾灵敏度, 显色液的磷酸浓度一般都选在每升含 120 ml 85% 磷酸左右. 因为磷酸浓度高, 尽管表现出较好的线性关系, 但灵敏度太低, 即使是在 BSA 浓度为 100 mg/L 的情况下, 吸光度也仅有 0.124, 再增加 BSA 浓度就会出现复合物沉淀, 吸光度反而下降.

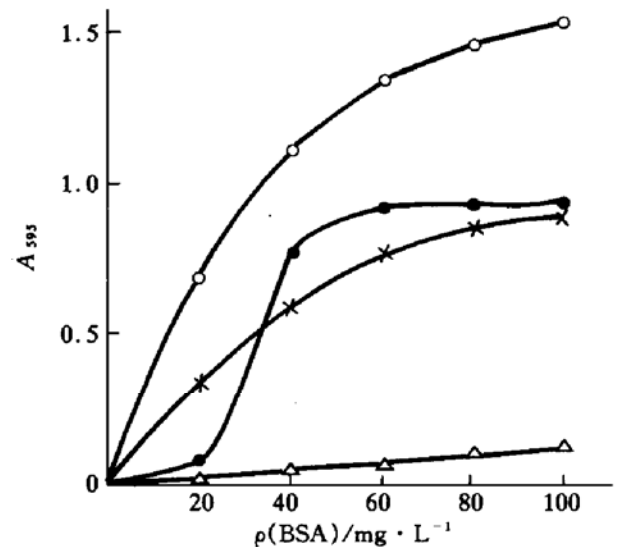


图3 H_3PO_4 浓度对显色的影响

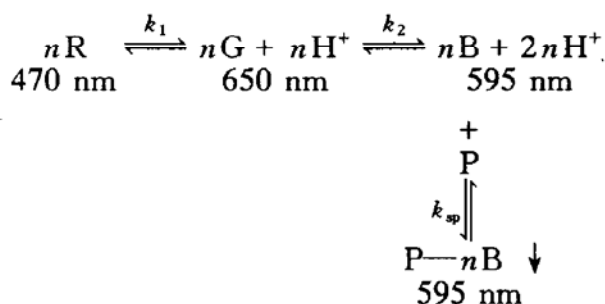
测定液中各组分的终浓度为每毫升含 100 μg CBB; 0.08 ml 95% 乙醇. $\bullet$ — $\bullet$: 每毫升含 0.02 ml 85% H_3PO_4 ; $\circ$ — $\circ$: 每毫升含 0.08 ml 85% H_3PO_4 ; $\times$ — $\times$: 每毫升含 0.126 ml 85% H_3PO_4 ; $\triangle$ — $\triangle$: 每毫升含 0.16 ml 85% H_3PO_4 .

以相应的显色液加相应量的蒸馏水为参比.

2.3 理论分析

Compton 和 Jones^[11]认为 CBB 在显色液中至少存在三种形式 (即阴离子 B、中性离子 G 和阳离子 R), 而且只有阴离子型的 CBB 才能与蛋白质结合. Marchall 和 Willons^[12]已经观

察到 CBB 与蛋白质结合之后是以一种不溶的复合物形式分散在溶液中, 我们在实验中也观察到, 当 BSA 浓度增加到一定程度后, 会出现肉眼可见的蓝色颗粒. 因此我们认为染料 CBB 与蛋白质的结合存在下列平衡方程式 (式中 R: CBB 的阳离子形式; B: CBB 的阴离子形式; G: CBB 的中性形式; P: 蛋白质; n : 每一蛋白质分子可结合 CBB 的分子数; $k_1 = \frac{[G][H^+]}{[R]}$; $k_2 = \frac{[B][H^+]}{[G]}$; $k_{sp} = [P][B]^n$).



在空白显色液中, 其 495 nm 的吸光度主要由 CBB 的阴离子形式决定, 而 B 的浓度受显色液中 pH (图 2) 和 CBB 总浓度的影响. 当蛋白质加入显色液中, 上述平衡被打破而朝右方向移动, 当新的平衡建立之后, 混合液中有两种成分即 B 和 $P-nB$ 都在 595 nm 处有强烈光吸收, 这时被测液 595 nm 的吸光度就取决于 B 和 $P-nB$ 总浓度, 而 B 和 $P-nB$ 的总浓度是受 H^+ 浓度、CBB 总浓度、蛋白质浓度、蛋白质—CBB 复合物的溶度积常数以及每一蛋白质分子可结合的 CBB 分子数等因素影响. 对于我们需要测定的某种特定蛋白质来说, k_{sp} 和 n 可以认为是不受蛋白质浓度影响的常数, CBB 的总浓度可以在显色液配制时控制. 因此如果我们能控制好显色液的 H^+ 浓度就能使被测液 595 nm 的吸光度与蛋白质浓度之间保持较好的线性关系. 显色液 H^+ 浓度的控制包括两方面的内容. 其一是选择一个合适的 H^+ 浓度, 使 R、G 和 B 三种存在形式的比例有利于显色反应. 图 3 结果就说明了这个问题, 当磷酸浓度过高时, B 的浓度太低, 蛋白质不能充分与 B 结合即灵敏度很低, 当磷酸浓度过低时, B 浓度太高, 少量蛋白质的加入不足以引起上述平衡明显地朝右移动, 不会

引起 R 向 B 的明显转变, 因此标准曲线表现为 S 形. 其二是要保持显色前后 H^+ 浓度的恒定. 图 2 结果已经清楚表明, 即使向显色液中加少量不含蛋白质的空白液, 只要能引起显色液 pH 的改变, 就可观察到 A_{595} 的变化.

2.4 一种新配方

从上面的实验结果及理论分析可以知道, 在显色液的配方成分中, H^+ 浓度是影响标准曲线线性关系的主要因素. 要获得线性关系较好的标准曲线, 适当控制显色液中的 H^+ 浓度以及使显色前后 H^+ 浓度保持恒定是至关重要的. 现在的配方中^[1,5,9], 显色液的酸度都是靠磷酸来调节, 由于单一的磷酸不能形成缓冲对, 不能很好地稳定显色前后的 H^+ 浓度. 因此我们比较了以 HCl-NaCl 缓冲液代替磷酸的显色液配方, 图 4 结果表明用 HCl-NaCl 缓冲

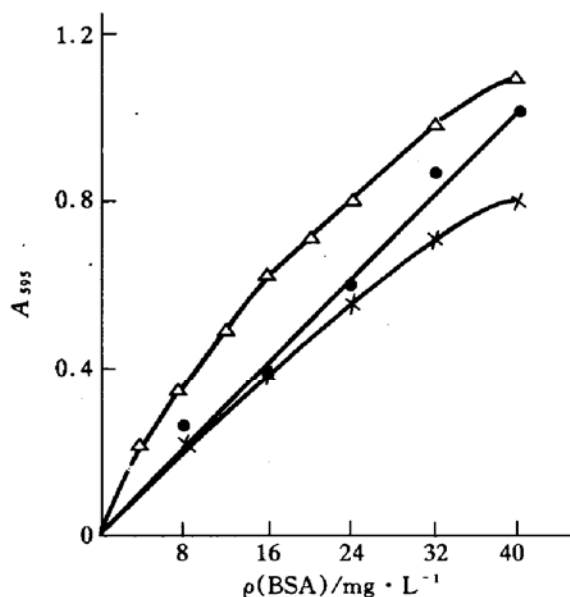


图 4 三种不同显色液配方所得到的标准曲线
●—●: 配方一各成分的终浓度为: 100 mg/L CBB, 每毫升含 0.0125 ml 37% HCl, 4.05 mg NaCl, 0.08 ml 95% 乙醇; ×—×: 配方二, 100 mg/L CBB, 每毫升含 0.025 ml 37% HCl, 0.08 ml 95% 乙醇, 8.1 g/L NaCl; △—△: 配方三, 100 mg/L CBB, 每毫升含 0.08 ml 85% H_3PO_4 , 0.08 ml 95% 乙醇.

液代替磷酸确实能改善标准曲线的线性关系. 该显色液的配制方法是: 125 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶解在 100 ml 95% 的乙醇中, 另取 15 ml 37% 的 HCl 和 5.06 g NaCl 溶解在适量

水中后, 与考马斯亮蓝乙醇液混合并定容至 1000 ml, 即为显色液. 测定时, 取 4 ml 显色液与 1 ml 蛋白质浓度适中的样品混合即可比色测定.

参 考 文 献

- 1 Peterson G L. Anal Biochem, 1979; **100**: 201
- 2 Peterson G L. Methods in Enzymology, 1983; **91**: 95
- 3 郭敏亮, 姜涌明等. 食品科学, 1993; (7): 10
- 4 Guo M L, Jiang Y M. Food Chem, 1996; **55**: 373
- 5 Bradford M M. Anal Biochem, 1976; **72**: 248
- 6 Kirazov L P, Venkov L G, Kirazov E P. Anal Biochem, 1993; **208**: 44
- 7 Pande S V, Murthy M S R. Anal Biochem, 1994; **220**: 424
- 8 Bozimowski D, Artiss J D, Zak B. J Clin Chem Clin Biochem, 1985; **23**: 683
- 9 Splittgerber A G, Sohl J. Anal Biochem, 1989; **179**: 198
- 10 Read S M, Northcote D H. Anal Biochem, 1981; **116**: 53
- 11 Compton S J, Jones C G. Anal Biochem, 1985; **151**: 369
- 12 Marshall T, Williams K M. Anal Biochem, 1992; **204**: 107

Effect of Ingredients of Coomassie Brilliant Blue Color-developing Reagent on Protein Assay. Guo Minliang, Jiang Yongming (*Basic Science Division, Jiangsu Agricultural College, Yangzhou 225009, China*).

Abstract The coomassie brilliant blue (CBB) protein assay first developed by Bradford became an alternative for an ever-increasing number of researchers because of its simplicity, rapidity and being free from interference by some common laboratory reagents which have been shown to affect the lowry assay. Despite all its advantages, many problems have been encountered by researchers in using this procedure. One of the main drawbacks of this procedure is the nonlinearity which has been noted since Bradford developed the CBB-protein assay. The effect of ingredients in color-developing reagent on the absorbances at 465 nm and 595 nm, of free CBB and protein-binding CBB mixture was tested respectively. The results showed that the main factor which affects the linearity of calibration curve is H^+ concentration. A new color-developing reagent formula which consists of CBB, HCl and NaCl, may improve the nonlinearity.

Key words coomassie brilliant blue, protein assay, linearity

鼠肝抽提液中磷酸酶活性终止方法的改进

梁智群 李湘萍 杨胜远

(广西大学工业实验中心, 南宁 530004)

摘要 改进了一种分析磷酸酶活性的终止酶反应方法. 该方法通过在酶反应进行到一定程度时, 在反应混合物中加入酶反应终止液 (1 mol/L NaOH-0.2 mol/L EDTA), 从而使测定更简捷、精确.

关键词 磷酸酶, 酶活性测定, 酶反应终止液

蛋白磷酸酶是细胞内信息传递的关联物质, 生物体细胞内信息的传递是通过蛋白质的磷酸化和脱磷酸化来完成的, 而蛋白磷酸酶催化蛋白质的脱磷酸化^[1,2]. 另外, 碱性磷酸酶作为抗体标记物质, 灵敏度要比辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase) 高 10 倍以上, 已广泛用于免疫细胞组织化学和酶免疫测定, 在

抗肿瘤研究和食品工业中也有应用.

磷酸酶的活性测定常用两种方法^[3]: 一是选择适当的磷酸激酶, 由 [^{32}P] 标记 ATP 制得 ^{32}P 标记磷酸化蛋白质, 让磷酸酶作用于该种磷酸化蛋白, 测定 ^{32}P 磷酸的游离量