

# 生物化学实验讲义

刘荣建 編集

二〇〇二年四月十一日

## 实验一 蛋白质含量测定法

本实验的目的是学会各种蛋白质含量的测定方法，了解各种测定方法的基本原理和优缺点。

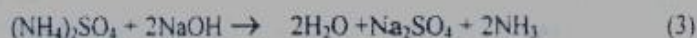
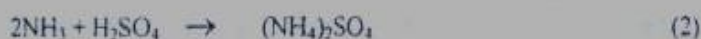
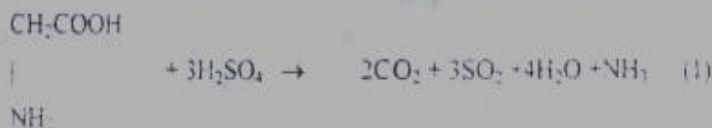
蛋白质含量测定法，是生物化学研究中最常用、最基本的分析方法之一，目前常用的有四种古老的经典方法，即定氮法，双缩尿法（Biuret法）、Folin-酚试剂法（Lowry法）和紫外吸收法。另外还有一种近十年才普遍使用起来的新的测定法，即考马斯亮蓝法（Bradford法）。其中Bradford法和Lowry法灵敏度最高，比紫外吸收法灵敏10~20倍，比Biuret法灵敏100倍以上。定氮法虽然比较复杂，但较准确，往往以定氮法测定的蛋白质作为其他方法的标准蛋白质。

值得注意的是，这后四种方法并不能在任何条件下适用于任何形式的蛋白质，因为每一种方法都有其适用范围，有适用于那一种蛋白质，每一种测定法都不是完美无缺的，都有其优缺点。在选择方法时应考虑：①实验对测定所要求的灵敏度和精确度；②蛋白质的性质；③溶液中存在的干扰物质；④测定所要花费的时间。

考马斯亮蓝法（Bradford法），由于其突出的优点，正得到越来越广泛的应用。

### 一、微量凯氏（Kjeldahl）定氮法

样品与浓硫酸共热，含氮有机物即分解产生氨（消化），氨又与硫酸作用，变成硫酸氨，经强碱碱化使之分解放出氨，借蒸汽将氨蒸至酸液中，根据此酸液被中和的程度可计算得样品之氮含量。若以甘氨酸为例，其反应式如下：



反应（1）、（2）在凯氏瓶内完成，反应（3）在凯氏蒸馏装置中进行。

为了加速消化，可以加入 $\text{CuSO}_4$ 作催化剂， $\text{K}_2\text{SO}_4$ 以提高溶液的沸点。收集氨可用硼酸溶液，滴定则用强酸。实验和计算方法这里从略。

计算所得结果为样品总氮量，如欲求得样品中蛋白含量，应将总氮量减去非蛋白