

生理实验——可溶性蛋白质含量测定

【实验原理】

植物组织中的可溶性蛋白质主要是参与各种代谢的酶，其含量多少能够从总体上反映植物代谢的强弱。考马斯亮蓝G-250测定蛋白质含量属于染料结合法的一种。该染料在稀酸溶液中与蛋白质的结合后变为青色，在620 nm下有最大吸收峰。在一定蛋白质浓度范围内(1~1000 μg)，蛋白质与色素结合物在620 nm波长下的吸光度与蛋白质含量成正比，故可用于蛋白质的定量测定。考马斯亮蓝G-250与蛋白质结合反应十分迅速，2 min左右即达到平衡。其结合物在室温下1 h内保持稳定。此法灵敏度高(比斐林-酚法还高4倍)，易于操作，干扰物质少，是一种比较好的定量法。其缺点是在蛋白质含量很高时线性偏低，且不同来源蛋白质与色素结合状况有一定差异。

【实验材料】

新鲜植物材料或经过冷冻保存的材料。

【仪器与用具】

天平、分光光度计、研钵、容量瓶、移液管、试管等。

【试剂】

- 1、 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 牛血清蛋白标准溶液
- 2、考马斯亮蓝G-250溶液：称取60 mg考马斯亮蓝G-250，溶于100 mL 3%高氯酸溶液中，滤去未溶解的染料，贮于棕色瓶中。常温下可保存一个月。

【方法与步骤】

1、标准曲线的绘制

取6支具塞试管，按上表加入试剂，混合均匀后，向各管中加入3 mL考马斯亮蓝G-250溶液，摇匀，并放置10 min左右，用1 cm光径比色皿在620 nm下比色测定吸光度。以蛋白质浓度为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制标准曲线。 $OD_{620}=0.0007C$

表 1 各试管加入试剂量

试剂	试管编号					
	0	1	2	3	4	5
100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准蛋白质溶液(mL)	0	0.6	1.2	1.8	2.4	3.0
蒸馏水(mL)	3.0	2.4	1.8	1.2	0.6	0
考马斯亮蓝 G250(mL)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
蛋白质浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0	20	40	60	80	100

2、样品测定

(1) 样品的提取：称取鲜样**1 g**左右，剪碎，加少量石英砂和蒸馏水或缓冲液适量，迅速研磨成匀浆后，转移至**100 mL**容量瓶，清洗研具多次一并转入，准确定容，摇匀后取**10 mL**，**4000 r/min**离心**10 min**，即得待测液。

(2) 蛋白质含量测定：取经过适当稀释的上清液 (根据蛋白质浓度高低稀释不同倍数，如**0.5 mL**上清液加水**2.5 mL**；或**1 mL**上清液加水**2 mL**等，总体积为**3 mL**即可)于试管中然后加入**3 mL**考马斯亮蓝**G250**染色液，摇匀，观察有无絮状或颗粒状沉淀，如果有则需要重新稀释更大倍数，若为澄清透明的蓝色液体，**5min**后即可比色，以空白管（**0号**试管）调零，测定**620 nm**吸光度。根据吸光度查标准曲线求出样品中的蛋白质浓度**CBSA**($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)，代入公式计算样品中可溶性蛋白质含量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。

【结果与计算】

样品中可溶性蛋白质的含量 = $C_{BSA} \times V \times n / W$

式中： C_{BSA} —标准方程求得蛋白质浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

V —提取液总体积 (mL)

n —稀释倍数

W —组织重量 (g)

【注意事项】

- 1、蛋白质浓度过高时需要稀释至合适的浓度，以不出现浑浊为宜。
- 2、显色反应与比色时间最好间隔一致，1小时内完成比色。

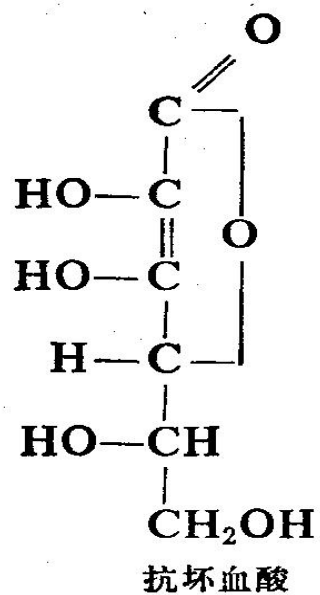
【分析讨论】

生化实验——维生素C的定量测定

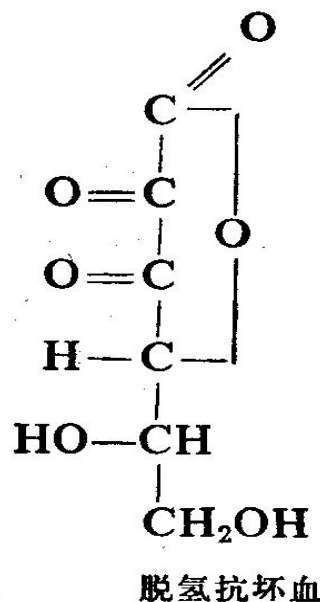
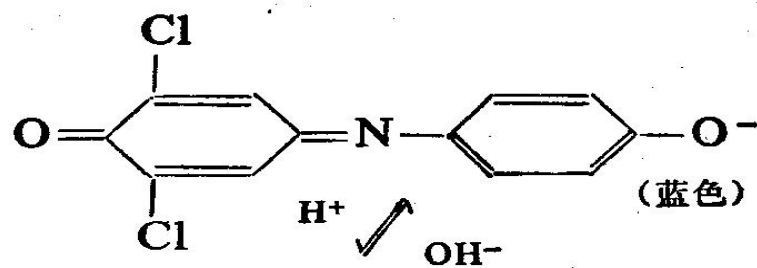
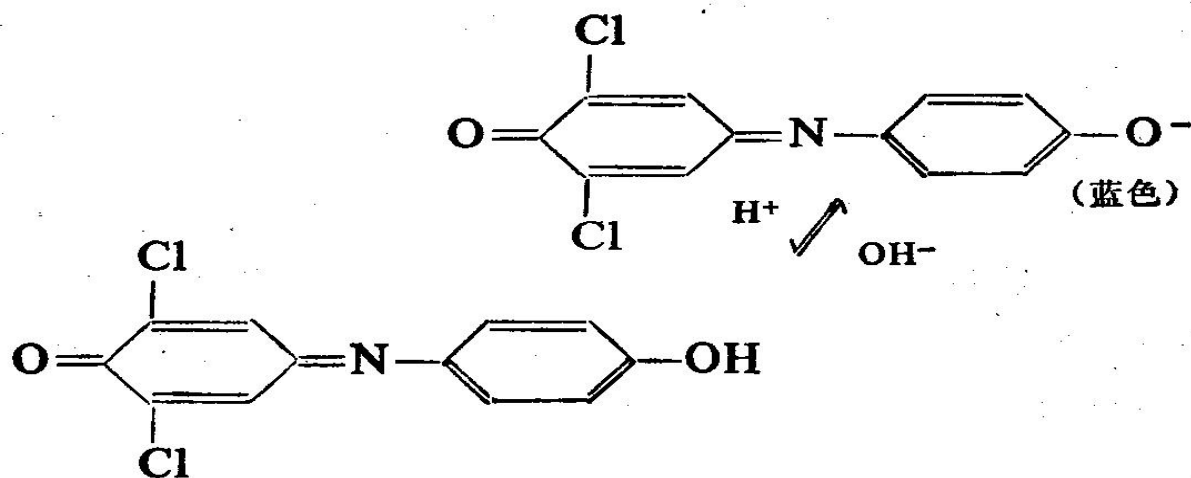
（2，6-二氯酚靛酚滴定法）

【实验原理】

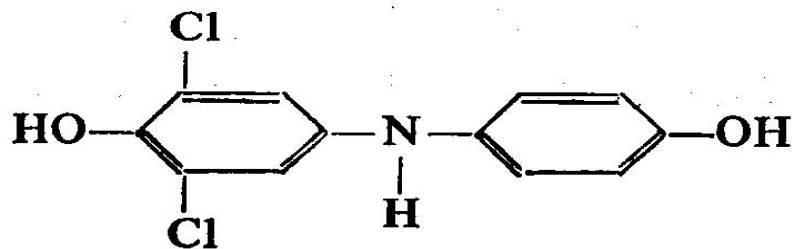
- 维生素C又称为抗坏血酸，其还原型能还原染料2，6-二氯酚靛酚钠盐，本身则氧化成脱氢抗坏血酸。
- 在酸性溶液中，2，6-二氯酚靛酚成红色，被还原后变为无色。
- 因此可用2，6-二氯酚靛酚滴定样品中含有的维生素C，当样品中的维生素C被完全还原后，在滴加过量的2，6-二氯酚靛酚，溶液变为淡红色，即为终点。
- 如无其他杂质干扰，则样品液所还原的2，6-二氯酚靛酚的量与样品中所含有维生素C的量成正比。



+



+



吉祥如意

【实验仪器】

- 新鲜水果
- 吸管
- 容量瓶
- 滴定装置
- 锥形瓶
- 研钵
- 漏斗



【实验试剂】

- 1、2%草酸溶液：草酸2g，溶于100ml蒸馏水。
- 2、1%草酸溶液：草酸1g，溶于100ml蒸馏水。
- 3、标准维生素C液：准确称取10.0mg维生素C，溶于1%草酸溶液，并稀释至100ml，贮于棕色瓶中，冷藏，最好临用时配制。此溶液浓度0.1mg/ml。
- 4、0.1%2，6-二氯靛酚溶液：称取500mg2，6-二氯靛酚溶于300ml含有104mg碳酸氢钠的热水中，冷却，加蒸馏水并稀释至500ml，滤去不溶物，贮于棕色瓶中，冷藏。

【实验步骤】

■ 1.样品中抗坏血酸的提取:

- 称取果肉10.0g，加2%草酸试剂10ml置研钵中研磨成匀浆。
- 通过漏斗将匀浆转入100ml容量瓶中，残渣用2%草酸溶液冲洗2-3次，并全部转入100ml容量瓶中（2%草酸溶液总用量70ml），静止10分钟，然后用1%草酸溶液定容，混匀，过滤，滤液备用。

■ 2.样品提取液的滴定

- 准确吸取滤液3份，每份10ml，分别放入3个100ml锥形瓶中，用2，6-二氯酚靛酚滴定至淡红色。滴定终点要保持15秒钟。记录所用2，6-二氯酚靛酚的体积V1。

■ 3.空白样滴定

- 空白液配置：取一只100ml容量瓶，加入2%草酸溶液70ml，然后用1%草酸溶液定容，混匀备用。滴定方法同上。记录所用2，6-二氯酚靛酚的体积V2。

【结果计算】

样品中Vc含量(mg/100g): $(V1-V2)*K*V/W/V3 *100$

- K: 每毫升染料氧化抗坏血酸质量(mg) 0.05
- V: 样品提取液提交
- V1: 滴定样品所用染料毫升数
- V2: 滴定空白所用染料毫升数
- V3: 样品测定时吸取的毫升数
- W: 样品质量