

第 3 章 蛋白质实验

实验 1 蛋白质含量的测定

蛋白质种类繁多,结构各不相同,因此蛋白质含量测定没有特定的方法,目前常用的有凯氏定氮法(Kjeldahl determination)、紫外吸收法、双缩脲法(Biuret法)、Folin-酚法(Lowry法)和考马斯亮蓝法(Bradford法)以及BCA法(bicinchoninic acid method, BCA method)等。每种测定法各有优缺点(表 3-1),并不能在任何条件下适用于任何形式的蛋白质,所以在选择方法时应考虑多种因素,如实验所要求的灵敏度和精确度,蛋白质的性质,溶液中是否存在干扰物质,测定所要花费的时间等。

表 3-1 蛋白质含量测定的不同方法比较

方 法	灵敏度高低 及适用范围	测定时 间/min	最大吸收 波长/nm	优缺点
凯氏定氮法	低 (0.2~1.0mg)	480~600		干扰少,但操作复杂,费时太长,用于蛋白质含量的 准确测定
紫外吸 收法	高 (50~100mg)	5~10	280	简便、灵敏、快速,但此法准确度较差,若样品中含 有嘌呤、嘧啶等物质,会出现较大的干扰,适用于与 标准蛋白质氨基酸组成相似的蛋白质的测定
双缩脲法 (Biuret法)	低 (1~20mg)	20~30	540	快速、干扰物质少,但灵敏度低,常用于快速但不需 十分精确的蛋白质含量测定
Folin-酚法 (Lowry法)	高 (20~250mg)	40~60	650	操作简单,不需要特殊设备,灵敏度高,但耗时长, 操作要严格计时,受酚类、柠檬酸等多种试剂干扰
考马斯亮蓝法 (Bradford法)	高 (0~5mg)	5~15	595	操作简单,灵敏度高,反应时间短,抗干扰性强,适 合与标准蛋白质氨基酸组成相近的蛋白质的测定
BCA法	高 (20~2 000 μ g)	45	562	快速、低廉,可大大节约样品和试剂用量,不受样品 中去污剂的影响,但蔗糖、尿素、 NH_4^+ 和EDTA影 响测定结果



【实验目的】

- (1) 掌握测定蛋白质含量的基本方法。
- (2) 理解凯氏定氮法、紫外吸收法、双缩脲法(Biuret法)、Folin-酚法(Lowry法)和考马斯亮蓝法(Bradford法)以及BCA法的测定原理。

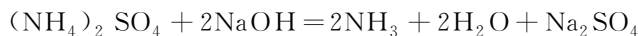
一、凯氏定氮法

【实验原理】

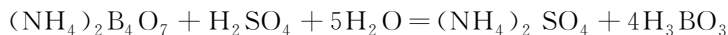
蛋白质的含氮量比较恒定,约为16%。在催化剂 CuSO_4 和 K_2SO_4 (提高溶液的沸点)作用下,样品与硫酸一同加热消化,蛋白质分解释放出的 NH_3 与硫酸结合生成硫酸铵。



然后加碱蒸馏:在消化瓶中,氢氧化钠与硫酸铵生成氢氧化铵,加热后又分解为 NH_3 从溶液中释放出来,用硼酸吸收。



最后用标准盐酸或硫酸溶液滴定,根据酸的消耗量计算出氮的含量,再乘以换算系数(含氮量 $\times 6.25 =$ 蛋白质含量),即可求出蛋白质含量。



【试剂与器材】

1. 试剂

- (1) 盐酸:0.02mol/L和0.05mol/L标准溶液(邻苯二甲酸氢钾法标定)。
- (2) 混合消化液:30% H_2O_2 、 H_2SO_4 、 H_2O 的比例依次为3:2:1,即在100mL蒸馏水中慢慢加入200mL浓 H_2SO_4 ,待冷却后,再加入30% H_2O_2 300mL,混匀,临用时配制。
- (3) 混合催化剂:将10g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和100g K_2SO_4 在研钵中研磨,混匀,过40目筛。
- (4) 质量浓度为40% NaOH 。
- (5) 质量浓度为2% H_3BO_3 。
- (6) 混合指示剂:1份0.1%甲基红乙醇溶液与5份0.1%溴甲酚绿乙醇溶液混合,临用时配制;或2份0.1%甲基红乙醇溶液和1份0.1%次甲基蓝乙醇溶液混合,临用时配制。
- (7) 硼酸指示剂混合液:取20mL2%的 H_3BO_3 溶液,滴加2~3滴混合指示剂,摇匀后溶液呈紫色即可。

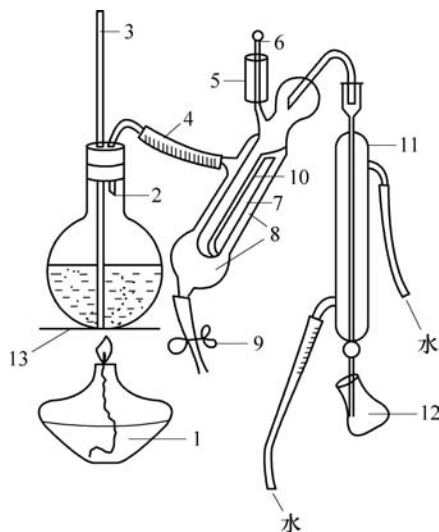
2. 器材

分析天平、消化炉、消化管、具塞三角瓶、电炉、漏斗、自动凯氏定氮仪或凯氏定氮蒸馏装置(图3-1)、吸管、酸氏滴定管、玻璃珠等。

【操作步骤】

1. 样品的处理

取经过研磨的一定量样品放入恒重的称量瓶中,置于105℃的烘箱中干燥4h,用坩埚钳



1—热源；2—烧瓶；3—玻璃管；4—橡皮管；5—玻璃杯；6—棒状玻璃塞；7—反应室；8—反应室外壳；
9—夹子；10—反应室中插管；11—冷凝管；12—锥形瓶；13—石棉网

图 3-1 凯氏定氮蒸馏装置

将称量瓶取出,放入干燥器内,待降至室温后称重,随后继续干燥样品至恒重。

2. 消化

取 5 支消化管并编号,在 1、2、3 号管中各精确加入 0.2~2.0g 固体干燥样品(注意:加样时应直接送入管底,避免沾到管口和管颈处),加入混合催化剂 5g,混合消化液 20mL,在 4、5 号管中各加入相同量的催化剂和混合消化液作为对照。摇匀后,将 5 支消化管放入消化炉内消化。

首先小火加热,使内容物全部炭化。当泡沫完全消失后,加强火力,保持瓶内液体微沸。消化 1~3h,至液体呈蓝绿色澄清透明后,再继续加热 0.5h。消化完毕,取出消化管冷却至室温。将消化液移入 100mL 容量瓶中,用少量蒸馏水冲洗并移入容量瓶中,再加水定容至刻度,混匀备用。

3. 安装凯氏定氮装置

定氮装置由蒸汽发生器、反应室、冷凝管三部分组成,按图 3-1 装好,认真检查整个装置是否漏气,保证所测结果的准确性。安装完毕后,于蒸汽发生器内装水至 2/3 处,加入甲基红指示剂数滴及数毫升硫酸,以保持水呈酸性,加入数粒玻璃珠以防暴沸,加热煮沸蒸汽发生器内的水。

4. 样品及空白的蒸馏

取 5 个 100mL 具塞三角瓶,分别加入 2% 硼酸 10mL,混合指示剂 2 滴,溶液呈紫红色,备用。

打开样品杯的棒状玻璃塞,取 10mL 样品消化液流入反应室,用 10mL 蒸馏水冲洗样品杯后,蒸馏水也流入反应室,盖上玻璃塞,并在样品杯中加约 2/3 体积的蒸馏水进行水封以防漏气。然后把装有硼酸和指示剂的锥形瓶放在冷凝管口下方,将 10mL 40% 的氢氧化钠溶液倒入小玻璃杯,提起玻璃塞使其流入反应室,立即上提锥形瓶,使冷凝管下口浸没在三

角瓶的液面下。蒸馏待反应液沸腾后,锥形瓶中的硼酸和指示剂混合液由紫红色变为绿色,自变色时开始计时,蒸馏 3~5min。移动接收瓶,使冷凝管下端离开液面,再蒸馏 1min,然后用少量水冲洗冷凝管下端外部。取下接收瓶,以已标定的硫酸或盐酸标准溶液滴定至灰色或蓝紫色为终点。排出废液及洗涤后,可进行下一个样品的蒸馏。待样品和空白消化液蒸馏完毕后,同时进行滴定。

5. 计算

$$X = \left\{ \left[(V_1 - V_2) \times c \times \frac{0.014}{m} \right] \times \frac{100}{10} \right\} \times F \times 100\%$$

式中: X 为样品中蛋白质的百分含量;

V_1 为样品消耗硫酸或盐酸标准液的体积(mL);

V_2 为试剂空白消耗硫酸或盐酸标准溶液的体积(mL);

c 为硫酸或盐酸标准溶液的摩尔浓度(mol/L);

0.014 为 1mL 0.5mol/L 硫酸或 1mol/L 盐酸标准溶液相当于氮的克数;

m 为样品的质量(g);

F 为氮换算为蛋白质的系数。蛋白质中的氮含量一般为 15%~17.6%,按 16% 计算,乘以 6.25 即为蛋白质含量,乳制品为 6.38,面粉为 5.70,玉米、高粱为 6.24,花生为 5.46,米为 5.95,大豆及其制品为 5.71,肉与肉制品为 6.25,大麦、小米、燕麦、裸麦为 5.83,芝麻、向日葵为 5.30。

【注意事项】

(1) 实验前必须仔细检查蒸馏装置的各个连接处,保证不漏气。所用橡皮管、塞子须浸在氢氧化钠(10%)中,煮沸 10min,然后水洗、水煮,再用水洗。

(2) 小心加样,切勿使样品沾在凯氏烧瓶口部和颈部。

(3) 样品消化时,不能让黑色物质上升到消化管的颈部。万一黏附,可用少量水冲下,以免被检样品消化不完全,使结果偏低。

(4) 在整个消化过程中,要保持和缓的沸腾,不能用强火,以免蛋白质附在壁上,使氮有损失。

(5) 氨是否完全蒸馏出来,可用 pH 试纸测试馏出液是否为碱性。

【思考题】

(1) 凯氏定氮法测定蛋白质含量的理论依据是什么?

(2) 进行凯氏定氮法操作时,应如何保证测定结果的准确性?

二、紫外吸收法

【实验原理】

蛋白质分子中酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸残基的苯环中含有共轭双键,使蛋白质具有吸收紫外光的特性,通过测定蛋白质在 280nm 的吸光度值可以计算出蛋白质的含量。

【试剂与器材】

1. 试剂

(1) 蛋白质标准液(1mg/mL): 精确称取 0.1000g 牛血清白蛋白,用蒸馏水溶解后定容至 100mL。

(2) 待测样品: 未知浓度的蛋白溶液, 浓度在 1.0~2.5mg/mL 范围内。

2. 器材

紫外分光光度计、天平、容量瓶、刻度吸管等。

【操作步骤】

1. 标准曲线的绘制

取 8 支试管, 按表 3-2 编号并加入试剂。

管号	0	1	2	3	4	5	6	7
蛋白质标准液	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
蒸馏水	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0

混匀后比色, 以 0 号管做空白调零, 280nm 处测定各管溶液的吸光度。以蛋白质溶液浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制出蛋白质标准曲线。

2. 蛋白质样品溶液浓度的测定

取 1.0mL 未知浓度的蛋白质溶液, 加入 3.0mL 蒸馏水中, 混匀后在 280nm 处测定吸光度值, 在标准曲线上求出蛋白质的浓度。

【注意事项】

(1) 蛋白质的最大吸收峰可因 pH 的改变而发生变化, 因此要注意溶液的 pH, 待测蛋白质溶液的 pH 要与标准蛋白质溶液一致。

(2) 测定液必须澄清, 以免造成结果误差。

(3) 测定前将比色皿用 95% 乙醇泡洗, 再用蒸馏水冲洗干净。

【思考题】

(1) 紫外吸收法测定蛋白质含量的理论依据是什么?

(2) 如何减少物质的干扰, 提高紫外吸收法测定的准确性?

三、双缩脲法 (Biuret 法)

【实验原理】

在碱性溶液中, 双缩脲($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$)与 Cu^{2+} 形成紫红色的络合物, 该反应称为双缩脲反应。蛋白质分子含有众多肽键($-\text{CO}-\text{NH}-$), 也可发生双缩脲反应, 且呈色强度在一定浓度范围内与蛋白质含量成正比, 可用比色法测定蛋白质含量。

【试剂与器材】

1. 试剂

(1) 双缩脲试剂: 取 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5g 和 $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (酒石酸钾钠) 6.0g, 用蒸馏水溶解, 再分别加入 2.5mol/L NaOH 溶液 300mL 和 KI 1.0g, 然后加水至 1000mL。棕色瓶中避光保存。长期放置后若有暗红色沉淀出现, 即不能使用。

(2) 标准蛋白质溶液(10g/L): 精确称取 1.000g 牛血清白蛋白, 用蒸馏水溶解后定容至 100mL。

(3) 待测样品: 未知浓度的蛋白溶液, 浓度在 1~10mg/mL 范围内。



2. 器材

天平、容量瓶、试管、移液管、分光光度计等。

【操作步骤】

取试管 7 支,按表 3-3 编号并加入试剂。

表 3-3 双缩脲法测定蛋白质含量加样表

单位: mL

管号	空白管	1	2	3	4	5	测定管
蛋白标准液	—	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	—
生理盐水	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	—	0.4
待测样品	—	—	—	—	—	—	0.1
双缩脲试剂	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

混匀,37℃水浴 20min,冷却至室温,用空白管调零,在 540nm 处读取各管吸光度值。以吸光度为纵坐标,以蛋白质浓度为横坐标绘制标准曲线。根据测定管的吸光度,在标准曲线上求得蛋白质浓度。

【注意事项】

(1) 双缩脲试剂中,加入的酒石酸钾钠与 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 之比应不低于 3 : 1,加入 KI 作为抗氧化试剂。

(2) 双缩脲试剂要封闭贮存,防止吸收空气中的二氧化碳。

【思考题】

双缩脲法测定蛋白质的原理是什么? 它有何优缺点?

四、Folin-酚法 (Lowry 法)

【实验原理】

在碱性条件下,蛋白质分子中的肽键与碱性硫酸铜发生双缩脲反应生成紫红色的 Cu^{2+} -蛋白质络合物。此络合物还原 Folin 试剂(磷钨酸-磷钼酸混合物),生成深蓝色的化合物,其蓝色深浅与蛋白质含量在一定范围内成正比。

【试剂与器材】

1. 试剂

(1) 碱性铜试剂

试剂甲: 称取无水 Na_2CO_3 2.0g,溶于 100mL 的 0.1mol/L NaOH 溶液中。

试剂乙: 取 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5g,溶于 100mL 的 1%酒石酸钾溶液中。临用前取试剂甲 50mL、试剂乙 1mL 进行混合,即为碱性铜试剂。此试剂最多用 1 天,故需现用现配。

(2) 标准蛋白质溶液(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

精确称取牛血清清蛋白 25mg,用蒸馏水溶解后定容至 100mL。

(3) 酚试剂

取钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)100g 和钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)25g,溶于 700mL 蒸馏水中,再加入 85%的磷酸 50mL 和浓硫酸 100mL,充分混匀,置于 1 500mL 的圆底烧瓶中,小火回流 10h,冷却后再加入硫酸锂($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)150g,蒸馏水 50mL,液体溴 3~4 滴,开口继续沸腾 15min(除去过量的溴),冷却后溶液应呈黄色(如带绿色不能使用,应继续加溴煮

沸),过滤,稀释至 1 000mL,置于棕色瓶中保存。使用前以酚酞为指示剂,用 0.1mol/L NaOH 溶液滴定(滴定终点由蓝变灰),求出酚试剂的摩尔浓度。用蒸馏水稀释至最后浓度为 1mol/L。试剂放置过久,变成绿色时,可再加液体溴数滴煮 15min,如能恢复原有的黄色仍可使用。

(4) 待测样品

未知浓度的蛋白质溶液,一般浓度应为 25~250mg/mL。

2. 器材

分光光度计、吸管、试管、容量瓶、移液管等。

【操作步骤】

取试管 7 支,0 号管为空白管,1~5 号管为标准蛋白管,6 号管为测定管。按表 3-4 编号并加入试剂。

表 3-4 Folin-酚法测定蛋白质含量加样表

单位: mL

试剂	管 号						
	0	1	2	3	4	5	6
标准蛋白	—	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	—
待测样品	—	—	—	—	—	—	1.0
蒸馏水	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	—	—
碱性铜试剂	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	混匀,室温放置 20min						
酚试剂	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

混匀,室温放置 30min 后,以 0 号管调零,在波长 650nm 比色,分别读取各管吸光度值。以蛋白质含量为横坐标,以吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。根据测定管吸光度值,对照标准曲线,求出待测样品的蛋白质含量。

【注意事项】

- (1) 酚试剂在碱性条件下不稳定,当加入酚试剂后,应迅速摇匀,否则会使显色程度减弱。
- (2) 显色后尽快完成比色测定,30min 后可能产生雾状沉淀。
- (3) 本法可受很多还原性物质的干扰,如带有-SH 的化合物(糖类、酚类等),但这些物质在低浓度范围时一般不影响测定。
- (4) 所有器材必须清洗干净,否则会影响实验结果。

【思考题】

该法测定蛋白质含量的优点有哪些?

五、考马斯亮蓝法(Bradford 法)

【实验原理】

染料考马斯亮蓝 G-250 在游离状态下呈红色,在酸性溶液中与蛋白质结合后变为蓝色。在 0.01~1.0mg 蛋白质范围内,考马斯亮蓝 G250-蛋白质复合物在 595nm 下的吸光度与蛋白质含量呈线性关系,颜色的深浅与蛋白质的浓度成正比。

【试剂与器材】

1. 试剂

- (1) 标准牛血清白蛋白溶液(0.1mg/mL): 精确称取 10mg 牛血清白蛋白,用蒸馏水溶

解后定容至 100mL。

(2) 染料溶液: 称取考马斯亮蓝 G-250 0.1g 溶于 50mL 95% 的酒精中, 加入 100mL 85% 的浓磷酸, 转移至 1 000mL 的棕色容量瓶中, 蒸馏水定容。此溶液在室温下可放置 1 个月。

(3) 待测样品: 待测蛋白质溶液浓度为 0.1~1.0mg/mL。

2. 器材

移液管、试管、棕色容量瓶、分光光度计等。

【操作步骤】

取试管 7 支, 0 号管为空白管, 1~5 号管为标准蛋白管, 6 号管为测定管。按表 3-5 编号并加入试剂。

表 3-5 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量加样表

单位: mL

试剂	管 号						
	0	1	2	3	4	5	6
标准蛋白	—	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	—
待测样品	—	—	—	—	—	—	1.0
蒸馏水	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	—	—
染料溶液	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

混匀后, 静置 5min。以 0 号管调零, 在 595nm 波长处测定各管吸光度值。以吸光度值为纵坐标, 以蛋白质浓度为横坐标, 绘制标准曲线。根据测定管的吸光度值, 对照标准曲线, 求得样品溶液的蛋白质浓度。

【注意事项】

(1) 考马斯亮蓝溶液用之前要过滤, 且应现配现用, 不能久置。

(2) Triton、SDS 等去污剂会干扰实验测定。

(3) 比色最好在 5~20min 内进行, 这段时间颜色最稳定。蛋白质与染料混合 1h 后可能发生沉淀现象。

(4) 考马斯亮蓝染色能力强, 不能使用石英比色皿, 可用玻璃比色皿。比色皿用之前要先用 95% 的乙醇泡洗, 再用蒸馏水冲洗干净, 使用后立即用少量 95% 的乙醇荡洗, 以除去染色。

【思考题】

(1) 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度的原理是什么?

(2) 比色皿在使用前为什么要置于 95% 的乙醇溶液中?

(3) 如何选择未知样品的用量, 使它的吸光值在标准曲线范围内?

六、BCA 法

【实验原理】

BCA(bicinchoninic acid)是一种稳定的水溶性复合物, 在碱性条件下, 二价铜离子可以被蛋白质还原成一价铜离子, 一价铜离子可以和 BCA 相互作用, 两分子的 BCA 螯合一个铜离子, 形成紫色的络合物。该复合物为水溶性复合物, 在 562nm 处显示强吸光性, 在一定浓度范围内, 吸光度与蛋白质含量呈良好的线性关系, 制作标准曲线, 因此可以根据待测蛋白质在 562nm 处的吸光度计算其浓度。

【试剂与器材】**1. 试剂**

(1) BCA 试剂: 含 A 液和 B 液。

A 液: BCA 碱性溶液(配方: 1% BCA 二钠盐, 0.4% NaOH, 0.16% 酒石酸钠, 2% Na_2CO_3 , 0.95% NaHCO_3 , 这些液体混合后再调 pH 至 11.25);

B 液: 4% 硫酸铜。

(2) 牛蛋白血清(BSA)。

(3) 待测的蛋白样品。

2. 器材

酶标仪、微量移液器、96 孔板、恒温箱。

【操作步骤】

(1) 配制 BCA 工作液: 将 A 液和 B 液摇晃混匀, 按照 A : B = 50 : 1 的体积比配制 BCA 工作液, 充分混匀(BCA 工作液室温下 24h 内稳定, 故现用现配)。

(2) 配制不同浓度的标准蛋白液(BSA) ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $2.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $7.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 待测蛋白样品在什么溶液中, 就用该溶液来稀释标准蛋白液(如待测样品溶于强 RIPA 裂解液, 则用强 RIPA 裂解液来稀释标准蛋白液)。

(3) 取空白组($0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ BSA)各浓度的标准蛋白液 $5\mu\text{L}$ 并加入 96 孔板中, 另取待测的蛋白样品 $5\mu\text{L}$, 加入 96 孔板。

(4) 向各孔的蛋白液中加入 $300\mu\text{L}$ 的 BCA 工作液, 混匀, 37°C 放置 30min(加样时应当动作轻柔, 防止产生气泡影响读数。温度和放置时间可以调整, 可在 60°C 放置 30min 或室温放置 2h)。

(5) 静置结束后, 冷却至室温, 用酶标仪测定 562nm 处的吸光度, 并制作标准曲线。

(6) 根据待测样品的吸光度, 比对标准曲线, 计算蛋白质浓度。

【注意事项】

(1) 用 BCA 法测定蛋白质浓度时, 吸光度可随时间的延长不断加深, 且显色反应会随温度升高而加快, 故如果浓度较低, 适合较高温度孵育或延长孵育时间。

(2) 标准蛋白液的加量应当准确, 如果加量不准确, 会导致制作出来的标准曲线出现偏差, 影响待测样品的浓度计算, 所以一方面需要用梯度稀释的方法来配制标准蛋白液, 另一方面应使用精确度高的移液器。

(3) A 液和 B 液混合可能出现浑浊, 此时应振荡混匀, 最后可见透明溶液。

(4) 为加快 BCA 法测定蛋白质浓度的速度, 可以适当用微波炉加热, 但切勿过热。

(5) 如果空白组有较高的背景, 可用 Bradford 法重新测定蛋白质浓度。

实验 2 蛋白质的两性解离及等电点的测定

【实验目的】

了解蛋白质的两性解离性质; 初步学会蛋白质等电点测定的方法。

【实验原理】

蛋白质是由氨基酸通过肽键连接形成的高分子化合物, 虽然绝大多数氨基与羧基参与

了肽键的形成,但蛋白质分子中仍存在一定数量的自由氨基与羧基,以及酚基、羟基、巯基、胍基、咪唑基等酸碱基团,因此蛋白质与氨基酸一样是两性化合物,其解离状况与环境 pH 值有关。当溶液 pH 达一定数值时,蛋白质分子正、负电荷数目相等,在电场中既不向阳极移动,也不向阴极移动,此时溶液的 pH 称为此种蛋白质的等电点。在等电点时,蛋白质的溶解度最小,溶液的混浊度最大。配制不同 pH 的缓冲液,观察蛋白质在这些缓冲液中的溶解情况即可确定蛋白质的等电点。

【试剂与器材】

1. 试剂

(1) 1mol/L 乙酸:量取浓度 99.5%、相对密度为 1.05 的乙酸 2.875mL,加水定容至 50mL。

(2) 0.1mol/L 乙酸、0.01mol/L 乙酸:用 1mol/L 乙酸稀释。

(3) 0.2mol/L 氢氧化钠:取氢氧化钠 2g,用水定容至 250mL。

(4) 0.2mol/L 盐酸:量取浓度 37.2%、相对密度 1.19 的盐酸 4.17mL,用水定容至 50mL。

(5) 0.01% 溴甲酚绿指示液:称取 0.015g 溴甲酚绿,加入 1mol/L 氢氧化钠 0.87mL,用水定容至 150mL。

(6) 0.5% 酪蛋白溶液:称取酪蛋白 0.25g,加 5mL 1mol/L 氢氧化钠液,待酪蛋白溶解后,加 5mL 1mol/L 乙酸液,加水定容至 50mL。

2. 器材

试管、刻度吸管(1mL、2mL、5mL、10mL)、皮头滴管。

【操作步骤】

1. 蛋白质的两性反应

(1) 取 1 支试管加入酪蛋白溶液 1mL,加入溴甲酚绿指示剂 4 滴,摇匀,观察此时溶液的颜色,有无沉淀,记录并说明原因。

(2) 用皮头滴管滴加 0.2mol/L 盐酸,边加边摇至有大量絮状沉淀生成,此时溶液的 pH 接近酪蛋白的等电点,观察溶液的颜色变化。

(3) 继续滴加 0.2mol/L 盐酸,沉淀会逐渐消失,观察此时溶液颜色有何变化。

(4) 滴加 0.2mol/L 氢氧化钠,观察沉淀是否又重新出现,解释其原因。继续滴加 0.2mol/L 氢氧化钠,沉淀又会消失,并观察溶液的颜色变化。

2. 蛋白质等电点的测定

取 5 支试管,按表 3-6 加入各种试剂,边加边摇,摇匀后静置 5min,观察各管的混浊度,并以—、+、++、+++符号表示沉淀的多少,根据结果指出哪一 pH 是酪蛋白的等电点。

表 3-6 各试管加样情况

单位: mL

加 样	管号				
	1	2	3	4	5
蒸馏水	8.4	8.7	8.0	5.0	7.4
0.01mol/L 乙酸	0.6	—	—	—	—
0.1mol/L 乙酸	—	0.3	1.0	4.0	—