

果蔬组织中蛋白质含量的测定

一、实验目的

- 1、掌握考马斯亮蓝G250染色法测定果蔬组织中蛋白质含量的方法。
- 2、了解果蔬组织中蛋白质含量水平。
- 3、了解分光光度计的原理，掌握分光光度计的使用方法。

二、实验原理

考马斯亮兰G250染料，在酸性溶液中与蛋白质结合，显蓝色，在595nm处有最大吸收峰，通过测定595 nm处吸光值可知与其结合蛋白质的量（即吸光度与蛋白含量呈正比）。



三、实验材料及设备

- 1、果蔬组织若干（苹果、梨、甜椒、萝卜等），每组选一种测定，设置三个重复。
- 2、722型分光光度计、研钵、移液管、天平、10ml离心管、滤纸、水果刀等
- 3、标准蛋白溶液（牛血清蛋白）、考马斯亮蓝G250溶液（现配现用）、蒸馏水。

四、实验步骤

1、制作标准曲线，为什么？

取6支10ml具塞试管，按下表加入试剂。混合均匀后，向各管中加入5ml考马斯亮蓝G250溶液，摇匀，并放置5min左右，在595nm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。

管号	1	2	3	4	5	6
标准蛋白质 (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水量 (ml)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
蛋白质含量 (μg)	0	20	40	60	80	100

曲线的方程为： $Y=ax+b$ （ a ， b 值在Excel中添加趋势线后得知，衡量曲线的优劣为 R^2 ）

2、样品测定

- (1) 称取组织**0.2~0.5g**，放入研钵中研磨。
- (2) 在研钵中加入**5ml**蒸馏水，滤纸过滤。
- (3) 取滤液**1ml**于**10ml**离心管中加入**5ml**考马斯亮蓝**G250**溶液，摇匀后放置**5min**。
- (4) 以蒸馏水为对照，在**595nm**下进行比色，获得吸光值。

五、结果计算和讨论

结果计算：（单位mg/g）

$$\text{样品中蛋白质含量} = (C \cdot V_T) / (1000 \cdot V_S \cdot M_F)$$

式中：C—查的标准曲线值（ μg ）

V_T —提取液总体积（ml）

M_F —样品鲜重（g）

V_S —测定时加样量（ml）

讨论:

1、果蔬组织中蛋白含量有何差异？

2、该方法有何优缺点？

考马斯亮蓝G250与蛋白质结合反应十分迅速，2min左右即达到平衡。其结合物在室温下1h内保持稳定。此法灵敏度高，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。