

对 Folin-酚法测定藻类蛋白质的改进

钱凯先

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州)

王澍生

(北京蔬菜研究中心)

在实验室中用以测定藻类蛋白质的方法很多, 其中, Folin-酚法是应用最广泛的一种微量测定方法^[1]。该法综合了 Folin 和双缩脲法的优点, 其所显的颜色比酚试剂单独使用时增加 3—15 倍, 而灵敏度比双缩脲法增加近 100 倍。但是, Folin-酚法在测定藻类蛋白质时存在着样品的蛋白质提取问题, 藻类细胞一般具有坚厚的细胞壁, 有的在壁外包裹着丰富的胶质, 由于细胞壁和胶质的遮盖, 细胞中的蛋白质难以完全溶出而导致测定数据偏低。本文之目的系研究用稀碱溶液提取藻类细胞蛋白质时所长期存在的提取不完全问题, 以期改进 Folin-酚法的测定效果。

一、材料和方法

1. 藻类材料

- (1) 二角多甲藻 (*Peridinium bipes*), 单细胞, 水生, 具厚而坚硬的纤维素细胞壁。
- (2) 串珠藻 (*Batrachospermum moniliforme*), 系淡水红藻, 分枝状原植体, 藻体具丰富胶质和纤维素细胞壁。
- (3) 普通念珠藻 (*Nostoc commune*), 为胶质蓝藻, 呈团块状胶质群体, 细胞壁为粘肽。生于潮湿土表。
- (4) 发菜 (*Nostoc flagelliforme*), 丝状胶质群体之蓝藻, 胶质厚而坚实, 细胞壁为粘肽。生于我国西北荒漠草原, 旱生。
- (5) 水绵 (*Spirogyra* sp.), 为单列细胞之丝状绿藻, 具纤维素细胞壁, 外被胶质。水生。

以上各种实验材料均取自新鲜藻体, 用蒸馏水洗涤 2—3 次, 置于 40℃ 恒温箱中干燥数日后备用。

2. 试剂

- (1) Folin-酚试剂 A。在 50ml 2% Na_2CO_3 溶液中加入 1ml 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 混匀(必须在使用前临时混合配置)。
- (2) Folin-酚试剂 B。市售 Folin Phenol Reagent (Sigma Chemical Company), 若

无市售试剂,即按文献[1]第 93 页所列方法配置。

(3) 1mol/L NaOH 溶液。

(4) 玻璃砂。把盖玻片置于研钵中磨碎即得。

3. 主要器材

721 型光电分光光度计; 800 型离心机; 玻璃匀浆器; 分析天平, 感量为 0.1mg; 自动微量移液器 (Eppendorf Digital Pipette, Brinkman Instruments Inc.), 10—100 μ l 和 100—1000 μ l 各一只。

4. Folin-酚法常规分析程序

称取 5mg 藻类样品(干重)置于 10ml 试管中, 加入 1mol/L NaOH 溶液 2ml, 放在 40 $^{\circ}$ C 恒温中提取 30min 以上; 离心, 用自动微量移液器吸取上清液 0.1ml 置入 5ml 小指管中, 加入 1ml Folin-酚试剂 A, 混匀, 放置 10min; 加入 0.1ml Folin-酚试剂 B, 混匀, 于 30 $^{\circ}$ C 放置 30min, 使呈稳定蓝色。立即以 0.5cm 比色皿在 660nm 读取光密度 (OD) 值。

5. 藻类细胞破碎方法

取 5mg 藻类样品(干重)置于匀浆器中, 加入 1mol/L NaOH 溶液 2ml 和大约 15mg 玻璃砂进行匀浆, 直至显微镜镜检细胞全部破碎为止。

离心后取上清液测定蛋白质。

6. 标准曲线的绘制

称取 5mg 牛血清蛋白溶于 5 ml 1mol/L NaOH 溶液中, 配成浓度为 1mg/ml 的标准溶液。分别吸取标准溶液 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 和 100 μ l 于各指管中, 并依次加入蒸馏水, 使总体积均为 100 μ l。按 Folin-酚法依次加入 1ml 试剂 A 及 0.1ml 试剂 B, 测 OD 值, 并绘制标准曲线(图 1)。

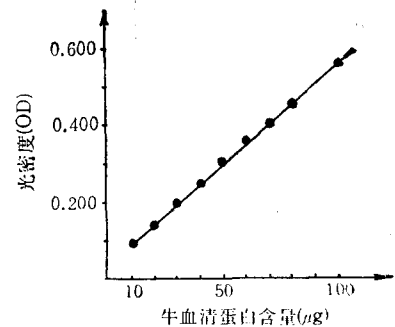


图 1 牛血清蛋白含量的标准曲线

Fig. 1 Standard curve for bovine serum protein content

二、试验结果

1. 细胞破碎与否以及不同的细胞破碎方法对提取藻类蛋白质的影响

我们把各种藻类的整体细胞提取液与用各种不同方法把细胞破碎后的提取液分别进行了比较, 结果表明, 大部分藻类在细胞被破碎后的蛋白质测定总量都有不同程度的提高。藻类细胞经过匀浆破碎后, 细胞膜、各种细胞器和细胞质均直接与碱溶液接触而使细胞蛋白质被充分提取, 从而使 Folin-酚法测定藻类蛋白质的准确度得到提高, 比整体细胞法一般高出 0.3—11.9% (图 2)。

由试验得知, 藻类纤维素的细胞壁对细胞内蛋白质的提取有影响, 如二角多甲藻在细胞匀浆破碎后所测定的蛋白质含量提高 0.3%。对于蛋白质提取影响更大的是细胞壁外的胶质, 在本文研究的五种藻类中, 发菜的胶质最厚实, 匀浆后所测得的蛋白质含量比整体细胞增多, 高达 11.9%, 普通念珠藻次之(8.9%), 然后是串珠藻(5.1%)、水绵(2.9%), 而二角多甲藻增加最少, 仅为 0.3%。从各种藻类细胞匀浆后所测定的蛋白质含量的增高数

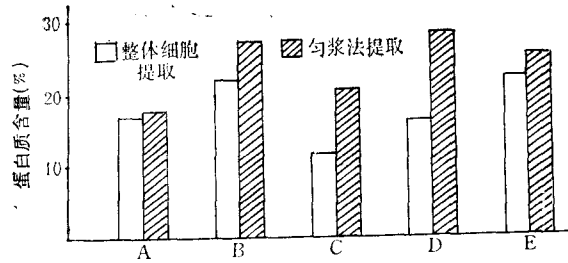


图2 分别用整体细胞和匀浆提取细胞所获藻类的蛋白质含量比较

Fig. 2 Comparison of algal protein contents extracted from intact cells and broken homogenant cells

A为二角多甲藻; B为串珠藻; C为普通念珠藻; D为发菜; E为水绵。

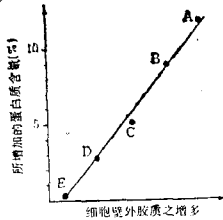


图3 藻类细胞壁外的胶质对蛋白质提取的影响

Fig. 3 The effect of algal extracellular gelatinous sheath on extraction of protein from algal cells

A为发菜; B为普通念珠藻; C为串珠藻; D为水绵; E为二角多甲藻。

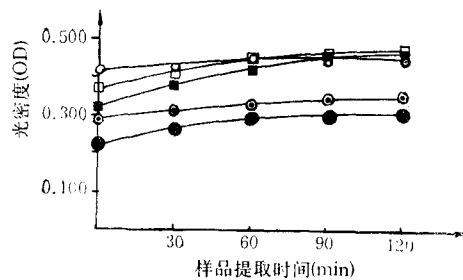


图4 时间对藻类蛋白质提取效果的影响

Fig. 4 The effect of time on extraction of protein from algal cells

○为发菜; □为串珠藻; ■为水绵; ◇为普通念珠藻; ●为二角多甲藻。

量来看,它是随着各种藻类细胞外所具胶质之增加而递增的(图3)。

2. 时间对提取藻类细胞蛋白质的影响

用匀浆法破碎的各种藻类细胞以 1mol/L NaOH 溶液在 40℃ 下分别提取 30, 60, 90 和 120min, 所测得的蛋白质含量结果见图4。

图4表明,藻类细胞蛋白质在 1mol/L NaOH 溶液中提取 30min 是不足的,其测定

的含量明显偏低,这是由于少部分蛋白质的溶解因其结构上或内膜阻隔等原因而需要一定的时间。可以看出,蛋白质的提取量随着提取时间的增加而增加,在 60min 以内,这种变化非常明显,但在 60min 以上时,这种变化的幅度随之减小而逐渐稳定。因此,为提高藻类蛋白质提取效果,宜将提取时间从 30min 增加至 120min,这样,蛋白质的提取更为完全。

3. 几种藻类蛋白质含量的测定结果

根据以上试验结果,在用 Folin-酚法测定藻类蛋白质时,其提取程序需加修改,即取 5mg 藻类样品(干重),加入 1mol/L NaOH 溶液 2ml 和大约 15mg 玻璃砂进行匀浆,直至细胞全部破碎,然后置于 40℃ 提取 2h,离心,取上清液按常规方法测定。用以上程序测定了五种藻类的蛋白质含量,其结果见表 1。

表 1 几种藻类的蛋白质含量
Tab. 1 The protein content of several algae

藻 名	OD 值			从标准曲线中查得 100 μ l 所含蛋白质 的重量 (μ g)	蛋白质含量* (%)
	第一次	第二次	平均值		
二角多甲藻	0.295	0.294	0.295	48.5	19.4
串珠藻	0.445	0.446	0.446	77.2	30.8
普通念珠藻	0.311	0.326	0.319	50.1	20.0
发菜	0.440	0.445	0.443	76.5	30.6
水绵	0.410	0.415	0.413	71.0	28.4

* 藻类蛋白质含量的计算:

$$\text{藻类蛋白质含量} = \frac{\text{提取液体积}}{\text{测定体积}} \times \frac{\text{所测体积中蛋白质重量}}{\text{样品干重}} \times 100\%$$

三、讨 论

在许多生化测定中都存在样品制备问题,在蛋白质的 Folin-酚测定方法应用中同样需要完善细胞蛋白质的提取程序,以提高方法效果。本试验考虑的是机械破碎藻类细胞,此外,也可分别用溶菌酶和纤维素酶来降解破碎蓝藻和其它藻类的细胞壁^[2]。但是,酶是蛋白质,会使测定程序变得复杂,故不可取。

本文以匀浆法破碎藻类细胞,其与整体藻类相比较,不同藻类的细胞蛋白质提取率增加 0.3—11.9% 不等,这至少可以说明两点:一是不同藻类之细胞结构差异对蛋白质提取的遮盖程度不同;二是在用 Folin-酚法测定藻类蛋白质时,必须进行样品的制备处理,否则,将导致蛋白质含量测定数据偏低。

本试验之对照是藻类整体细胞,虽然匀浆提取藻类细胞蛋白质之效果明显,改进了 Folin-酚测定藻类蛋白质的方法,但是未作凯氏定氮试验加以对照,同时未予考虑细胞破碎后其它还原物质(如-SH 化合物等)的可能干扰,故尚难以完全说明藻类细胞蛋白质之提取和处理已达完善,这将有待今后进一步研究来解决。

主 要 参 考 文 献

- [1] 蔡武城、袁厚积主编, 1982。生物物质常用化学分析法。科学出版社, 93 页。
- [2] Adamich, M., 1980. Protoplast and spheroplast production. Handbook of Phycological Methods, Developmental and Cytological Methods, Ed. by E. Gantt. Cambridge University Press, pp. 153—170.
- [3] Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265—275.

AN IMPROVEMENT ON DETERMINATION OF ALGAL PROTEIN BY FOLIN-PHENOL METHOD

Qian Kaixian

(Department of Bio-Science and technique, Zhejiang University, Hangzhou)

Wang Shusheng

(Vegetable Research Center of Beijing)

ABSTRACT

The method of Folin-Phenol is a better technique for determining the content of algal protein. But the extraction of protein from algal cells are hindered partly by both the thick cell wall and the extracellular gelatinous sheath. In this paper, the procedure for breaking the algal cell walls by means of homogenation to extract fully the protein from cells are established by us as follows: First, take 5 mg algal sample (dry weight) with about 15 mg glass powder to homogenizer, then add 2 ml 1mol/L sodium hydroxide into it and homogenate the whole mixture until all cells are broken. Finally, the algal segments were extracted by alkaloid solution for 120 min at 40°C. As a result, the protein extracted from algal homogenant were 0.3—11.9% more than that extracted from algal intact cells of various species. It was found that the algal extracellular gelatinous sheaths are stronger than cell walls. Therefore, full homogenation of the broken algal cells and longer extraction time at 40°C are very important for a better result of Folin-Phenol method.