

## 细菌总蛋白含量测定方法的改进

薛爱群\* 贾 锋 齐顺章

(北京农业大学动物生化教研室, 北京 100094)

**摘要** 采用超声波破碎细菌细胞后, 用0.1mol/L NaOH处理细菌样品, 以Lowry法测定细菌总蛋白含量, 此法所测结果更接近于细菌细胞总蛋白的真实含量。

**关键词** 细菌, 总蛋白含量

1951年Lowry<sup>[1]</sup>在双缩脲法的基础上建立的微量测定蛋白质的方法已应用于各种材料的蛋白质含量的测定。1981年相田德二郎<sup>[2]</sup>等用1mol/L NaOH溶解细菌细胞后, 应用Lowry法测定细菌总蛋白含量。此后也有类似的报道<sup>[3,4]</sup>。此法的优点是材料处理比较简便, 因为用1mol/L NaOH处理可同时使细菌细胞裂解和蛋白溶解, 所以被普遍采用。然而作者自己指出, 用此法测得的细菌总蛋白含量偏低是其缺点。我们在利用此法测定基因工程菌的总蛋白时感到, 如果测得值偏低, 则由其计算出来的外源基因表达产物的量将发生偏差, 因此在样品处理方法上作了探讨, 力图使测得的量与实际含量接近。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

基因工程菌(本室构建); 小牛血清蛋白(BSA)(电泳纯, Sigma公司); NaOH(分析纯, 北京化工厂)。

### 1.2 方法

取50ml发酵菌液, 4000g离心20分钟, 收集细菌细胞, 用0.9%NaCl洗涤细胞两次, 离心条件同上。将洗涤过的细胞悬浮于蒸馏水中, 超声波破碎细胞(功率160瓦, 细菌浓度为 $2 \times 10^{11}$ /ml, 处理20—30分钟), 定容。取样品1ml, 加入0.1mol/L NaOH(按10—15mg细菌/ml NaOH), 煮沸10分钟, 再用蒸馏水定容。此时溶液澄清透明, 说明蛋白质已完全溶解。然后按文献[5]介绍的方法进行细菌总蛋白的测定。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度的氢氧化钠处理样品

用0.1、0.5和1.0mol/L NaOH分别溶解100 $\mu$ gBSA, 用Lowry法测得的蛋白含量分别为样品中实际含量的98.84%、98.80%和90.03%。由此可见, 用0.1mol/L和0.5mol/L NaOH处理样品, 测得量与样品中的实际含量很接近。

### 2.2 先裂解后溶解

采用了先裂解细菌细胞再用0.1mol/L NaOH溶解蛋白的方法, 同时还直接用1.0mol/L NaOH处理同一细菌样品(pH为14.0、对照I)并将对照I溶液的pH调至约10.5(对照II)进行测定。由表1可见, 本法测定的总蛋白含量高于对照I和对照II, 经显著性检验( $P < 0.01$ )差异极显著。

表1 同一样品不同处理, 细菌总蛋白的测定结果

方 法	测定次数	总蛋白含量 (%)	变异系数 (%)
本 法	9	16.530 $\pm$ 0.016	0.060
对照I	9	15.374 $\pm$ 0.119	0.775
对照II	9	14.837 $\pm$ 0.112	0.773

在用0.1、0.5和1.0mol/L NaOH处理同一BSA标准液(250 $\mu$ g/ml)后, 分别用Lowry法和考马斯亮蓝G<sub>250</sub><sup>[6]</sup>(CBBG<sub>250</sub>)染色法测定其蛋白含量。从表2可以看出, 采用0.1mol/L

与 0.5mol/L NaOH 处理样品后, 两种方法测定的结果都与样品中所含实际蛋白量接近, 而用 1.0mol/L NaOH 处理后测得的值则偏低。NaOH 的浓度过高时测得的蛋白含量偏低, 其原因需进一步探讨。

表2 不同浓度 NaOH 处理 BSA 后两种测定方法的结果

NaOH (mol/L)	Lowry	CBBG <sub>250</sub>
0.1	98.84±0.21	99.26±0.21
0.5	98.80±0.10	99.03±0.15
1.0	90.03±0.15	92.67±0.61

综上所述可见, 即先将细菌细胞破碎, 然后再用低浓度 (0.1mol/L) NaOH 处理细菌样

品, 以 Lowry 法测定细菌总蛋白含量, 虽然比通常采用 1.0mol/L NaOH 直接处理细菌细胞的方法麻烦些, 但测定的值更接近于真实含量。

### 参 考 文 献

- [1] Lowry O H, *et al.* J Biol Chem, 1951, 193: 265.
- [2] [日] 微生物研究法讨论会编, 程先胜等译. 微生物学实验法, 北京: 科学出版社, 1981.192.
- [3] [日] 菅原洁·副岛正美著, 张旭译. 蛋白质的定量法, 第二版. 北京: 农业出版社, 1981.108—115.
- [4] 周德庆. 微生物实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986, 352.
- [5] 张龙翔等. 生化实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1981.165—167.
- [6] Bradford M M Anal Biochem. 1976, 72: 248—254.