

香葱中蒜氨酸酶的分离纯化及其酶学性质

付一帆, 周 宇, 李星鑫, 刘 莹, 王鲁峰, 潘思轶*

(华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 对香葱中蒜氨酸酶进行分离纯化并研究其酶学性质。通过均浆、离心、硫酸铵分级沉淀、透析、DEAE-52 离子交换层析和 Sephadex G200 凝胶过滤层析技术分离纯化得到纯度较高的蒜氨酸酶, 并利用 SDS-PAGE 电泳对其纯度进行鉴定。结果表明, 经分离纯化可得纯化倍数为 19.6 倍的蒜氨酸酶, 酶比活力为 11.44U/mg, 酶活回收率为 32.1%, 达到电泳纯, 其亚基的分子质量约为 54.5ku。纯酶的最适反应温度为 45℃, 最适 pH7.0, 以 S- 甲基 - L- 半胱氨酸亚砷为底物, 蒜氨酸酶的 K_m 为 45.31mmol/L, V_{max} 为 40.32 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。

关键词: 香葱; 蒜氨酸酶; 分离纯化; 酶学性质

Purification and Enzymatic Properties of Alliinase from Chive (*Allium schoenoprasum* L.)

FU Yi-fan, ZHOU Yu, LI Xing-xin, LIU Ying, WANG Lu-feng, PAN Si-yi*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Alliinase (EC 4.4.1.4) was isolated from stalks of chive (*Allium schoenoprasum* L.), and its enzymatic properties were investigated. The enzyme was purified to apparent homogeneity using various steps, including homogenizing, centrifuging, ammonium sulfate precipitating, dialyzing, DEAE-52 ion exchange chromatography and Sephadex G200 gel filtration chromatography. SDS-PAGE electrophoresis was used to analyze the purity of alliinase. The results showed that the purity of alliinase was high and reached up to electrophoresis purity. The molecular weight of the subunit was 54.5 ku. The specific activity of the pure alliinase was 11.44 U/mg, and the activity recovery rate was 32.1%, which exhibited 19.6-fold enhancement in purity. The optimal reaction temperature and pH of purified alliinase were 45 °C and 7.0, respectively. Kinetic studies showed that K_m and V_{max} of alliinase using S-methyl-L-cysteine sulfoxide as the substrate were 45.31 mmol/L and 40.32 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, respectively.

Key words: chive (*Allium schoenoprasum* L.); alliinase; isolation and purification; enzymatic properties

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)05-0129-05

香葱(*Allium schoenoprasum* L.)又称细香葱、北葱等, 属于百合科(Liliaceae)葱属(*Allium*)植物^[1-2], 其味辛、性温, 有发汗解毒, 通阳利尿、明目补中、调和脾胃及行乳安胎等诸多功效, 并具有独特、飘逸的浓郁香辛气味, 目前已成为人们必需的调味、保健蔬菜^[3-7], 其相关产品的开发和应用有较为广阔的市场前景。

香葱独特的香辛气味和许多生理功能均来源于其前体蒜氨酸(alliin)类物质与内源酶蒜氨酸酶(alliinase, EC4.4.1.4)发生酶促反应产生的, 目前国内外许多学者对该反应中起重要作用的蒜氨酸酶进行了大量研究, 主要集中在分离纯化方法、性质、结构及功能等的研究, 其中对大蒜和洋葱的研究尤为深入^[8-15]。

但是, 国内外学者对葱属植物中香葱蒜氨酸酶的研究却甚少, 尽管不同葱蒜类植物编码酶的基因具有较高的同源性, 但不同的蒜氨酸酶之间在酶学性质上仍存在一定差异^[16-17]。国外研究中, Landshuter 等^[18]利用疏水交互作用层析、离子交换层析及凝胶渗透层析技术对熊葱中蒜氨酸酶进行了分离纯化, 得到纯化倍数为 52 倍的酶并对其酶学性质进行了研究; Manabe 等^[19]对韭葱嫩芽中的蒜氨酸酶分离纯化, 达到电泳纯, 再利用 DNA 杂交技术, 从韭葱的 cDNA 文库中, 杂交筛选出编码其蒜氨酸酶的 cDNA 克隆, 并证明了其与大蒜、洋葱等的同源性。而国内相关的研究尚未见报道。因此, 本实验以新鲜香葱葱白为原料, 对其蒜氨酸酶进行分离纯

收稿日期: 2011-05-19

作者简介: 付一帆(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: fuyifan@webmail.hzau.edu.cn

* 通信作者: 潘思轶(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: pansiyi@mail.hzau.edu.cn

化并研究其酶学性质,旨在为香葱的理论研究和产品开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜香葱产于湖北孝感,取葱白部分。

S-甲基-L-半胱氨酸亚砷 上海共价化学科技有限公司;DEAE-52、5'-磷酸吡哆醛(PLP) 上海源叶生物科技有限公司;Sephadex G200 美国 Pharmacia 公司;其他试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 仪器与设备

HR2094 型搅拌机 珠海飞利浦家电有限公司;Avanti J-E 型高速冷冻离心机 美国 Beckman Coulter 公司;752 型紫外-可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;HD-5 型电脑紫外检测仪 上海青浦沪西仪器厂;DYCZ-24DN 型电泳仪 北京市六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 蒜氨酸酶活性测定

采用丙酮酸法^[12]测定。取 1mL 底物与 1mL 酶液在 25℃ 条件下反应 5min,立即加入 10g/100mL 三氯乙酸 2mL 终止酶促反应,加入 0.1g/100mL 2,4-二硝基苯肼溶液 1mL 在 25℃ 显色 5min,再加入 2.5mol/L NaOH 溶液 5mL,25℃ 保温 10min 后于 420nm 波长处比色,以底物、钝化酶、2,4-二硝基苯肼和 NaOH 等反应体系为空白。以丙酮酸物质的量(x , μmol)为横坐标,其 420nm 波长处的吸光度(y , $A_{420\text{nm}}$)为纵坐标,绘制标准曲线: $y = 1.949x + 0.0035 (R^2 = 0.9998)$ 。

酶活力定义:在 25℃,磷酸盐缓冲液 A(50mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, 含 25 $\mu\text{mol/L}$ PLP, pH7.0)中,底物浓度为 10mmol/L S-甲基-L-半胱氨酸亚砷的条件下,每分钟反应产生 1 μmol 丙酮酸定义为 1 个酶活力单位。

1.3.2 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝 G250 法^[20]测定。以蛋白质质量(x , μg)为横坐标,其在 595nm 波长处的吸光度(y)为纵坐标,绘制标准曲线: $y = 0.0065x + 0.0018 (R^2 = 0.9997)$ 。

1.3.3 香葱中蒜氨酸酶的分离纯化

1.3.3.1 粗酶液提取

取 100g 新鲜香葱葱白,加入经 4℃ 预冷的磷酸盐缓冲液 B(50mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, 含 5g/100mL NaCl、体积分数 10% 甘油、5mmol/L EDTA- Na_2 、25 $\mu\text{mol/L}$ PLP, pH7.0)200mL,以最大速度破碎均浆 5min,均浆液经 200 目尼龙布过滤,滤液 15000 $\times g$ 冷冻离心 30min,得上清液即为蒜氨酸粗酶液。

1.3.3.2 硫酸铵盐析

取蒜氨酸粗酶液各 15mL,分别加入固体硫酸铵,使其饱和度分别为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%,搅拌充分后 4℃ 静置 4h,15000 $\times g$ 冷冻离心 30min,测定上清液的蛋白质含量和酶活力,并绘制盐析曲线以确定硫酸铵盐析最适饱和度。

1.3.3.3 透析除盐

将最适硫酸铵饱和度条件下沉淀所得的酶复溶于磷酸盐缓冲液 C(50mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, 含 1g/100mL NaCl、10g/100mL 蔗糖、25 $\mu\text{mol/L}$ PLP, pH7.0),装入截留分子量 8000~10000u 透析袋中,置于 1000mL 蒸馏水(含体积分数 10% 甘油)4℃ 透析过夜。

1.3.3.4 DEAE-52 离子交换层析

将处理好的 DEAE-52 离子交换纤维素填料装柱(1.0cm $\times$ 50cm),用洗脱液 A(20mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, 含 0.1mol/L NaCl、25 $\mu\text{mol/L}$ PLP, pH7.2)洗脱平衡。取透析后的浓缩酶液 2mL(酶液是经 30%~60% 硫酸铵分级沉淀、磷酸盐缓冲液复溶、含体积分数 10% 甘油的蒸馏水透析后浓缩所得)上样,依次用洗脱液 A 和洗脱液 B(20mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, 含 0.2mol/L NaCl、25 $\mu\text{mol/L}$ PLP, pH7.2)进行线性分步洗脱,流速为 0.5mL/min,用紫外检测仪在 280nm 波长处进行检测,分管收集,每管收集 5mL,分别测定每管洗脱液中蛋白质含量和蒜氨酸酶活力,绘制洗脱曲线,收集、合并酶比活力较高的洗脱液,经透析、浓缩后作下一步纯化。

1.3.3.5 Sephadex G200 凝胶过滤层析

将处理好的 Sephadex G200 凝胶填料装柱(1.6cm $\times$ 60cm),用洗脱液 C(50mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, 含 1g/100mL NaCl、25 $\mu\text{mol/L}$ PLP, pH7.0)洗脱平衡。取 1.3.3.4 节中的浓缩酶液 5mL 上样,用洗脱液 C 以 0.5mL/min 流速线性洗脱,用紫外检测仪在 280nm 波长处进行检测,分管收集,每管收集 3mL,分别测定每管洗脱液中蛋白质含量和蒜氨酸酶活力,绘制洗脱曲线。最终收集得到纯度较高的蒜氨酸酶。

1.3.3.6 纯度鉴定

采用 SDS-PAGE(其分离胶质量浓度为 12.5g/100mL,浓缩胶质量浓度为 5g/100mL)对最终的纯化蒜氨酸酶进行纯度鉴定并计算其亚基的分子量。

1.3.4 蒜氨酸酶的酶学性质测定

1.3.4.1 最适反应温度

在 pH 值为 7.0 时,测定不同反应温度(15~70℃)条件下蒜氨酸酶活力,确定其最适反应温度。

1.3.4.2 最适 pH 值

在温度为 45℃ 时, 测定不同 pH 值(3.0~10.0)条件下蒜氨酸酶活力, 确定其最适 pH 值。

1.3.4.3 最适底物浓度及米氏常数

在最适反应温度和 pH 值条件下, 以 *S*-甲基-L-半胱氨酸亚砷为底物, 测定不同底物浓度(1~20mmol/L)条件下蒜氨酸酶活力, 确定其最适底物浓度。采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 求出其米氏方程、米氏常数(K_m)及最大反应速度(V_{max})。

2 结果与分析

2.1 蒜氨酸酶的分离纯化

2.1.1 硫酸铵盐析曲线

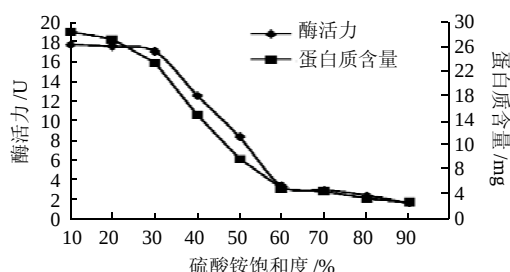


图1 硫酸铵分离蒜氨酸酶的盐析曲线

Fig.1 Ammonium sulfate precipitation curve of crude alliinase

由图1可知, 当硫酸铵饱和度为0~30%时, 随着硫酸铵饱和度增大, 上清液中蛋白质含量降低较快, 而蒜氨酸酶活力基本不变; 当硫酸铵饱和度为60%时, 大部分蒜氨酸酶已被沉淀出来, 继续增加硫酸铵饱和度, 酶活力降低不明显而蛋白质含量仍继续减少。因此, 选择饱和度为30%~60%硫酸铵来分级沉淀蒜氨酸粗酶液可除去部分杂蛋白, 实现目的蛋白的初步纯化。经实验测定, 粗酶液经硫酸铵分级沉淀后, 纯化倍数为粗酶的1.6倍, 酶活回收率达80%。

2.1.2 DEAE-52 离子交换层析曲线

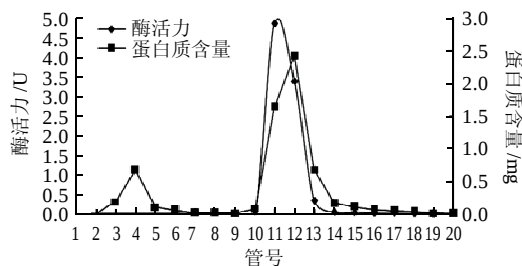


图2 DEAE-52 柱分离蒜氨酸酶洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of alliinase on DEAE-52 column

由图2可知, 当洗脱时间为0.3~1.2h时(第2~7管), 出现第1个蛋白峰, 洗脱液中含有一定质量的蛋白质, 但没有检测出蒜氨酸酶活力, 为无酶活力的杂蛋白; 当洗脱时间为1.6~3.0h时(第10~18管), 出现第2个蛋白峰, 其中第10~15管均检测出蒜氨酸酶活力, 以第11、12管酶比活力较高, 酶比活力分别为2.97、1.40U/mg, 第11管酶比活力最大, 其纯化倍数是粗酶的5.1倍。

2.1.3 Sephadex G200 凝胶过滤层析曲线

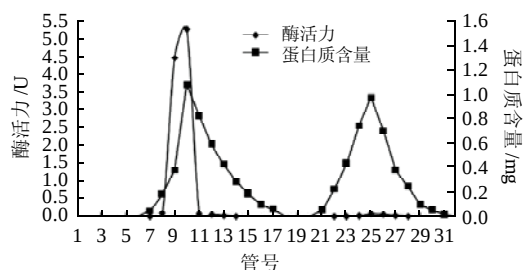


图3 Sephadex G200 柱分离蒜氨酸酶洗脱曲线

Fig.3 Elution curve of alliinase on Sephadex G200 column

由图3可知, 当洗脱时间为0.7~1.7h时(第7~17管), 出现第1个蛋白峰, 其中8~13管均检测出蒜氨酸酶活力, 以9、10管酶比活力较高, 第9管表现出最大酶比活力; 当洗脱时间为2.1~3.0h时(第21~30管), 出现第2个蛋白峰, 但无蒜氨酸酶活力, 为杂蛋白。经过以上分离纯化步骤(表1), 最终可得纯化倍数达19.6倍的蒜氨酸酶, 酶比活力为11.44U/mg, 可见香葱中蒜氨酸酶的酶比活力明显小于大蒜中的, 不同的纯化方法得到的大蒜氨酸酶的比活力一般在30~200U/mg之间^[9,11,13-15], 说明不同植物种类的蒜氨酸酶含量存在差异。收集合并 Sephadex G200 第9、10管洗脱液进行纯度鉴定及进一步的酶学性质研究。

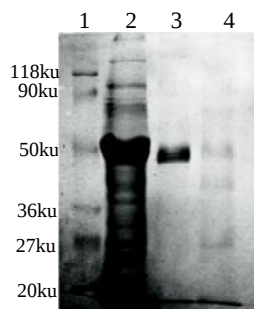
表1 蒜氨酸酶的分离纯化结果

Table 1 Isolation and purification results of alliinase

样品	总蛋白/mg	总酶活力/U	酶比活力/(U/mg)	纯化倍数	酶活回收率/%
离心后上清粗酶液	499.20	291.39	0.58	1.0	100.0
30%~60%硫酸铵沉淀复溶	251.50	233.06	0.93	1.6	80.0
透析液	236.54	228.99	0.97	1.7	78.6
DEAE-52层析	40.93	121.43	2.97	5.1	41.7
Sephadex G200层析	8.18	93.53	11.44	19.6	32.1

2.1.4 SDS-PAGE 电泳结果

蒜氨酸粗酶液、DEAE-52 第11管洗脱液及 Sephadex G200 第9管洗脱液进行 SDS-PAGE 鉴定, 结果见图4。



1. 标准分子蛋白; 2. 蒜氨酸粗酶液; 3. Sephadex G200 第9管洗脱液; 4. DEAE-52 第11管洗脱液。

图4 香葱中蒜氨酸酶 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.4 SDS-PAGE of alliinase from chive

由图4可知, 蒜氨酸酶经分离纯化步骤最终得到的酶(泳道3)在电泳图谱上显示出单一条带, 表明所得酶纯度较高, 达到电泳纯。同时由电泳图谱测得蒜氨酸酶亚基的相对迁移率 $R_m = 0.467$, 根据电泳图谱上标准蛋白质分子质量的对数值(y)与相对迁移率(x)的线性回归方程: $y = -0.9764x + 5.1928$, 可计算得出蒜氨酸酶亚基的分子质量约为 54.5ku。已有相关文献[8-9,11]报道大蒜中蒜氨酸酶是由2个分子质量均为 54ku 的亚基结合的二聚体, 而洋葱中蒜氨酸酶是含4个分子质量均为 50ku 亚基的四聚体^[12], 由此可见, 香葱中蒜氨酸酶的亚基与大蒜和洋葱中的有所不同, 并且其全酶的分子质量还有待进一步测定。

2.2 蒜氨酸酶的酶学性质

2.2.1 最适反应温度

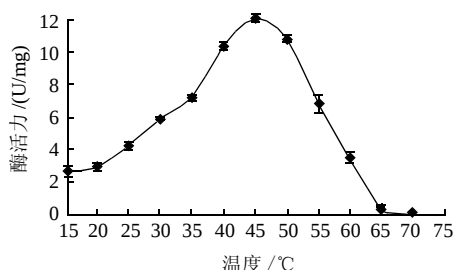


图5 温度对蒜氨酸酶活性的影响

Fig.5 Effect of temperature on alliinase activity

由图5可知, 香葱中蒜氨酸酶的最适反应温度为 45°C, 此时酶比活力达到最大值为 10.02U/mg, 在 35~55°C 温度范围内蒜氨酸酶活力较高, 当温度高于 55°C 时其酶比活力迅速降低, 达到 65°C 时其活性完全丧失。由此可见, 香葱蒜氨酸酶的最适反应温度高于大蒜蒜氨酸酶的(35°C左右)^[13-14]和洋葱蒜氨酸酶的(30°C左右)^[17]。

2.2.2 最适 pH 值

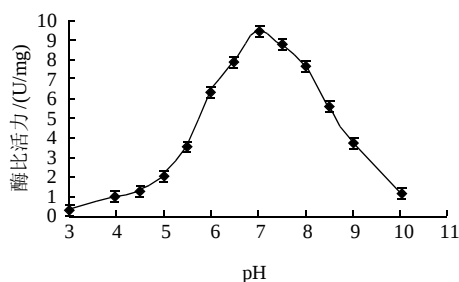


图6 pH 值对蒜氨酸酶活性的影响

Fig.6 Effect of pH on alliinase activity

由图6可知, 香葱中蒜氨酸酶的最适 pH 值为 7.0, 此时酶比活力达到最大值为 9.45U/mg, pH 值为 6.0~8.0 范围内蒜氨酸酶活力较高, 当 pH 值大于 8.5 或小于 5.5 时, 其酶活力较低。由此可见, 香葱蒜氨酸酶的最适 pH 值介于大蒜蒜氨酸酶的(pH6.5)^[13-14]和洋葱蒜氨酸酶的(pH8.5)^[17]之间。

2.2.3 最适底物浓度及米氏常数

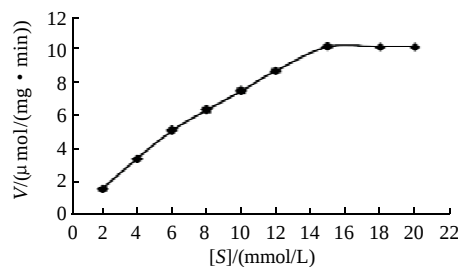


图7 底物浓度对蒜氨酸酶活性的影响

Fig.7 Effect of substrate concentration on alliinase activity

在酶质量浓度(酶比活力约 11U/mg)一定、pH7.0 及温度 45°C 条件下, 底物浓度和蒜氨酸酶反应速率的关系见图7。当底物浓度 < 15mmol/L 时, 随着底物浓度的增大, 蒜氨酸酶促反应速度呈近乎线性增大的趋势; 当底物浓度 > 15mmol/L 时, 酶促反应速度随底物浓度的增大几乎不再改变。因此, 其酶促反应的最适底物浓度为 15mmol/L。

由图7结果及利用 Lineweaver-Burk 作图法可得出蒜氨酸酶动力学的双倒数线性回归方程如图8所示: $y = 1.1237x + 0.0248 (R^2 = 0.9946)$, 由此计算得到 $K_m = 45.31 \text{ mmol/L}$, $V_m = 40.32 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。这与大蒜和洋葱蒜氨酸酶的动力学特性均存在较大差异, 与反应底物的不同及酶本身的差异性有关, 再次说明同属植物且亲缘关系相近种的蒜氨酸酶之间也具有一定的差异性。

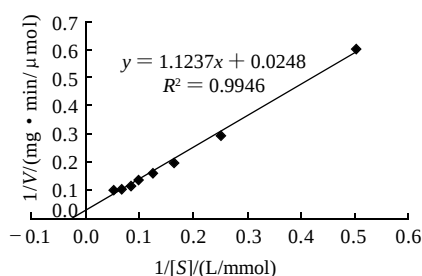


图8 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求 K_m

Fig.8 Lineweaver-Burk plot of alliinase activity

3 结 论

新鲜香葱葱白在 pH7.0 磷酸盐缓冲液中均浆、离心提取得到粗酶液, 经 30%~60% 硫酸铵分级沉淀、透析除盐、DEAE-52 离子交换层析和 Sephadex G200 凝胶过滤层析后, 可分离纯化得到纯度较高的蒜氨酸酶, 纯化倍数达 19.6 倍, 酶比活力为 11.44U/mg, 酶活回收率为 32.1%。经鉴定, 纯化得到的蒜氨酸酶达到电泳纯, 其亚基的分子质量约为 54.5ku。

对纯化的蒜氨酸酶进行酶学性质测定, 结果显示其最适反应温度为 45℃, 最适 pH 值为 7.0, 以 S- 甲基 - L- 半胱氨酸亚砷为底物, 蒜氨酸酶的 Lineweaver-Burk 双倒数线性回归方程为 $y = 1.1237x + 0.0248$ ($R^2 = 0.9946$), K_m 为 45.31mmol/L, V_m 为 40.32 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。

参考文献:

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 14 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1980: 170.
- [2] BLOCK E. The organosulfur chemistry of the genus *Allium*: implications for the organic chemistry of sulfur[J]. Angewandte Chemie International Edition in English, 1992, 31(9): 1135-1178.
- [3] FRANCA B, HAARI V. *Allium* vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer[J]. Environ Health Perspect, 2001, 109(9): 893-901.
- [4] JORGE A P, VICTOR F, CORREA M T. Volatile constituents of Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottl. ex Sprengel) and rakkyo

(*Allium chinense* G. Don)[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(3): 1328-1330.

- [5] 许真, 严永哲, 卢钢, 等. 葱属蔬菜植物风味前体物质的合成途径及调节机制[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(4): 508-512.
- [6] 刘源, 周光宏, 王锡昌, 等. 顶空固相微萃取气质联用分析香葱挥发性风味成分[J]. 中国调味品, 2007(9): 62-64.
- [7] 潘东丽, 严慧君, 周细濠, 等. 新鲜香葱油的提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(20): 101-104.
- [8] STOLL A, SEEBECK E. The enzymatic decomposition of alliinase and the properties of alliinase[J]. Helv Chim Acta, 1949, 32(3): 197-205.
- [9] KUETTNER E B, HILGENFELD R, WEISS M S. Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic[J]. Arch of Biochem and Biophys, 2002, 404(2): 192-200.
- [10] LINDA J W S, AHARON R, IRINA S, et al. Two structures of alliinase from *Allium sativum* L.: apo form and ternary complex with aminoacrylate reaction intermediate covalently bound to the PLP cofactor[J]. J Mol Biol, 2007, 366(2): 611-625.
- [11] RABINKOV A, ZHU Xiaozhu, GRAFI G, et al. Alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*)[J]. Appl Biochem Biotech, 1994, 48(3): 149-171.
- [12] NOCK L P, MAZELIS M. The C-S-lyases of higher plants: direct comparison of the physical properties of homogeneous allin lyase of garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*) [J]. Plant Physiol, 1987, 85(4): 1079-1083.
- [13] 孙灶君, 高孔荣. 蒜酶及其动力学研究[J]. 食品科学, 1995, 16(9): 13-15.
- [14] 曾哲灵, 徐仁华, 熊涛. 蒜氨酸酶的分离纯化及其酶学性质测定[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 431-434.
- [15] 李瑜, 许时婴. 大蒜中蒜氨酸酶的分离纯化及纯度测定[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 63-66.
- [16] HUGHES J, TREGOVA A, TOMSETT A B, et al. Synthesis of the flavour precursor, alliin, in garlic tissue cultures[J]. Phytochemistry, 2005, 66(2): 187-194.
- [17] 程龙军, 郭得平. 葱蒜类作物中的蒜氨酸酶[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(5): 471-474.
- [18] LANDSHUTER J, LOHMÜLLER E M, KNOBLOCH K. Purification and characterization of a C-S-lyase from ramson, the wild garlic, *Allium ursinum*[J]. Planta Med, 1994, 60(4): 343-347.
- [19] MANABE T, HASUMI A, SUGIYAMA M, et al. Alliinase [S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase] from *Allium tuberosum*(Chinese chive)[J]. Eur J Biochem, 1998, 257(1): 21-30.
- [20] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.