

实验 双缩脲法测定蛋白质浓度





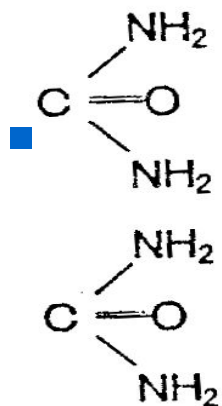
实验目的

- 1.学习分光光度法测定的原理和方法
- 2.学习蛋白质含量测定的原理和方法
- 3.掌握双缩脲法测定蛋白质含量的方法

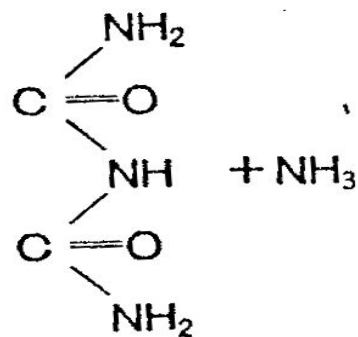


一 实验原理

(双缩脲)

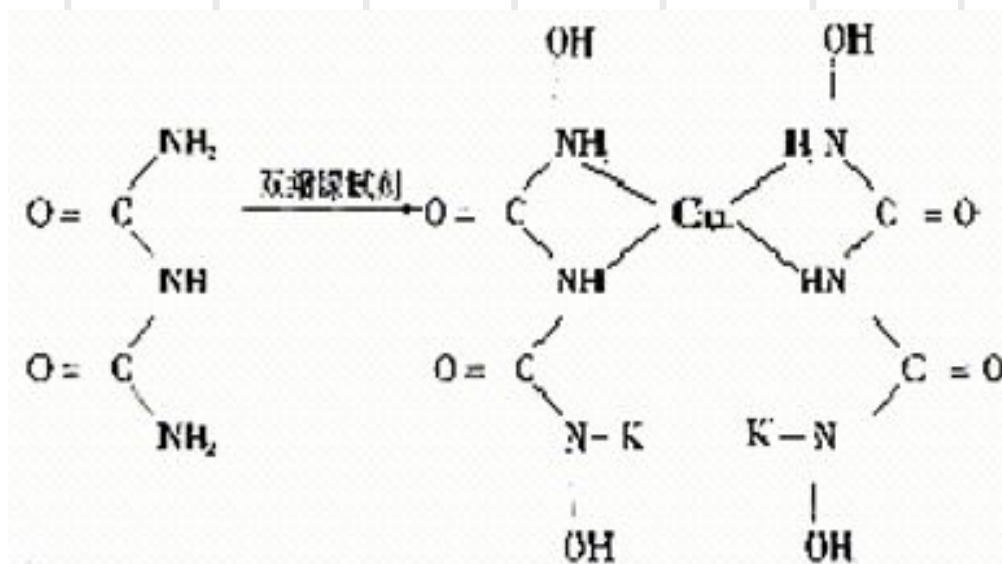


加热



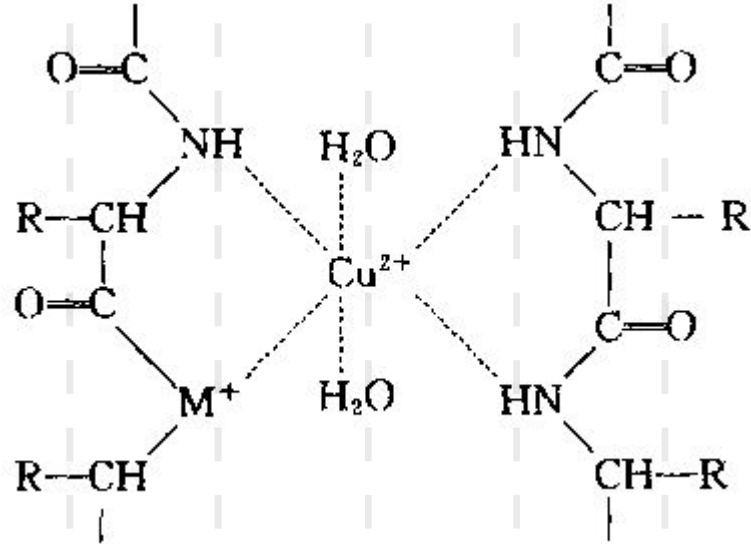
Cu^{2+}
碱性溶液

紫红色络合物



双缩脲

双缩脲铜钾配合物 (紫色)



蛋白质在碱性溶液中也能与硫酸铜发生相同反应，产生紫红色络合物。

蛋白质含有两个以上的肽键，因此，有双缩脲反应，在碱性溶液中蛋白质与 Cu^{2+} 形成紫红色络合物，其颜色的深浅与蛋白质的浓度成正比，而与蛋白质的分子量和氨基酸成份无关。

在一定的实验条件下，未知样品的溶液与标准蛋白质溶液同时反应，并于 $540\sim 560\text{nm}$ 下比色，可以通过标准曲线法或对照法求出未知样品的蛋白质浓度。

干扰物质：

Tris 缓冲液和某些氨基酸，凡含有— CONH_2 —，— CH_2 — NH_2 ，— CS — NH_2 等基团的物质都会产生干扰。

缺点：

灵敏度低1-20mg

优点：

快速（20-30min）

不同蛋白质产生颜色的深浅相近

此法常用于需要快速，但并不需要十分精确的蛋白质测定。

二 实验操作

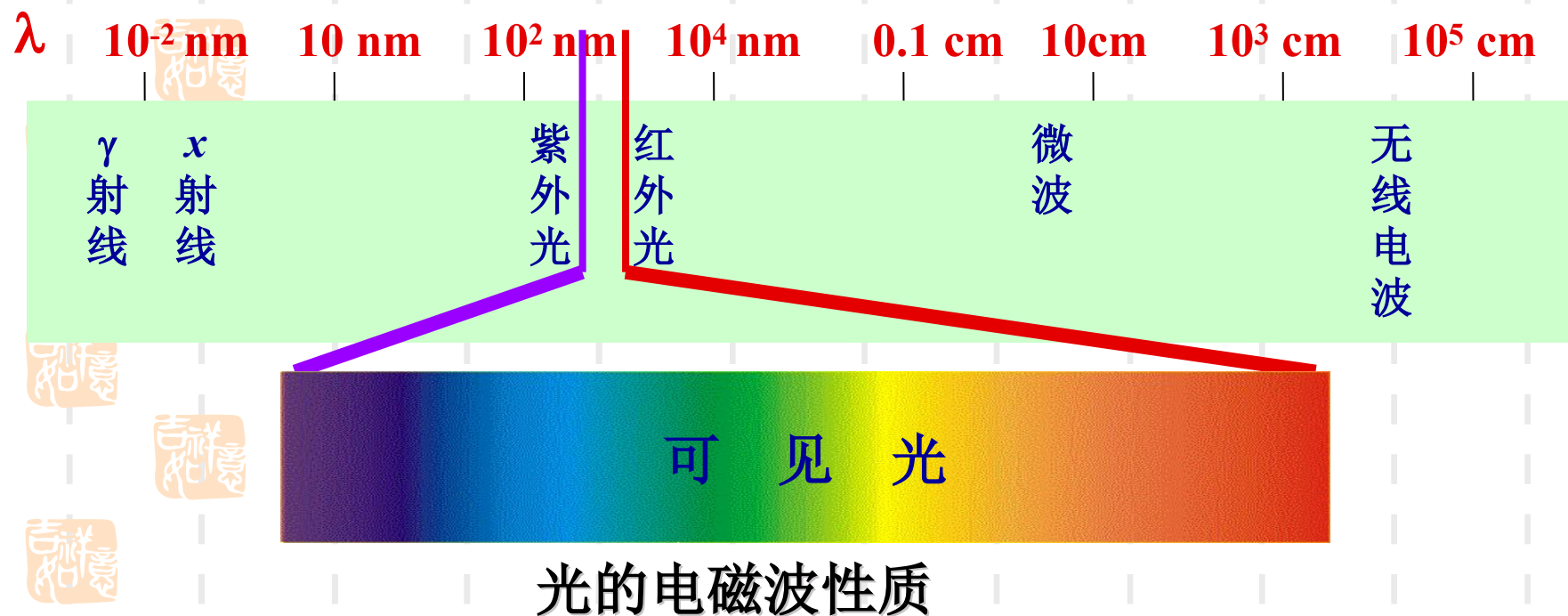
试管编号	1	2	3
标准蛋白 (ml)	—	1.0	—
样品 (ml)	—	—	1.0
H ₂ O(ml)	2.0	1.0	1.0
双缩脲试剂 (ml)	4.0	4.0	4.0
室温放置30分钟，于540nm处比色			

实验注意事项

- 1、试管要洗干净
- 2、取样要准确
- 3、加样顺序不可颠倒
- 4、各管试剂加完后要立即混匀
- 5、显色后放置时间不可太短或过长
- 6、仪器在使用前要预热和校准

三 分光光度法

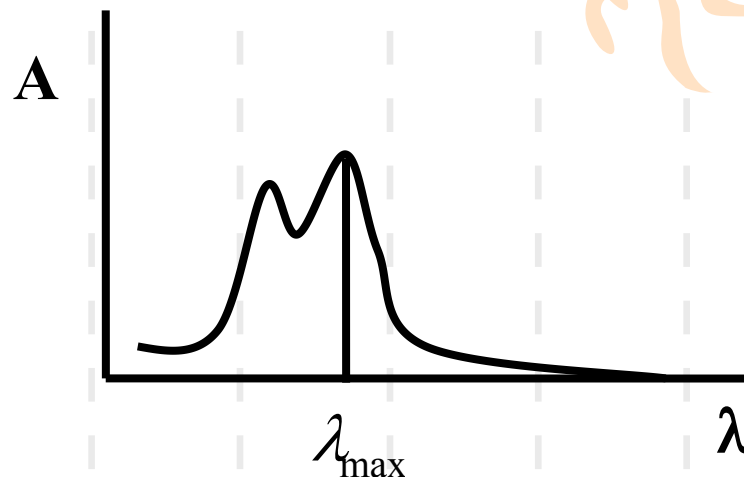
原理： 物质的**电子结构**不同，所能吸收光的波长也不同，这就构成了物质对光的选择吸收基础。根据物质对光的**吸收特征和吸收强度**，对物质进行**定性**和**定量**的分析方法，常用紫外—可见分光光度法。



定性分析与定量分析的基础

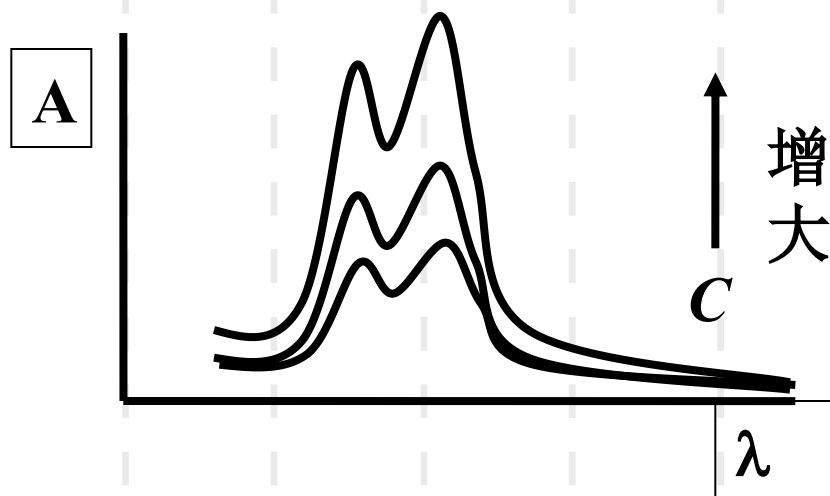
定性分析基础

物质对光的选择吸收

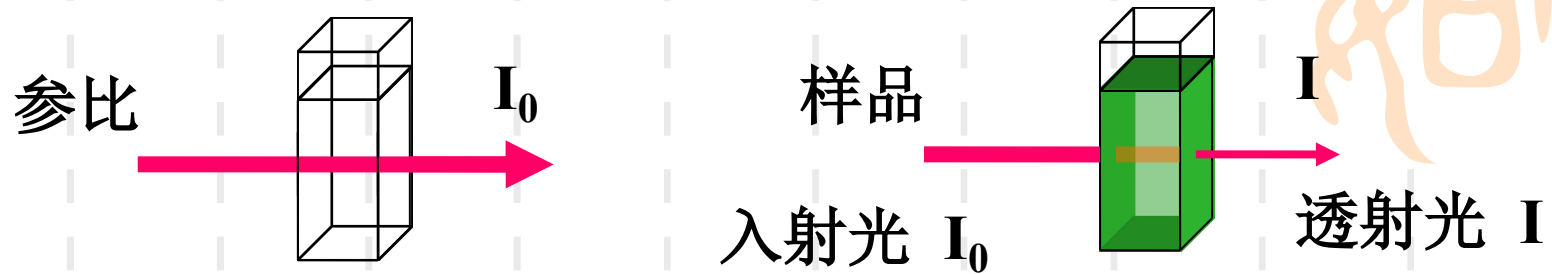


定量分析基础

在一定的实验条件下，
物质对光的吸收与物质的
浓度成正比。



Lambert—Beer定律



$$T \text{ (透射比)} = I/I_0 = 10^{-\epsilon CL} \longrightarrow \lg(1/T) = \epsilon CL$$

$$A = \epsilon CL$$

A 为吸光度； ϵ 为吸收系数； C 为溶液浓度； L 为溶液光程的厚度

□ 一束单色光通过溶液介质后，光能被吸收一部分，吸收多少与溶液的浓度和厚度成正比。

□ 在一定的实验条件下，物质对光的吸收与物质的浓度成正比。

应用

(1) 比较吸收光谱曲线

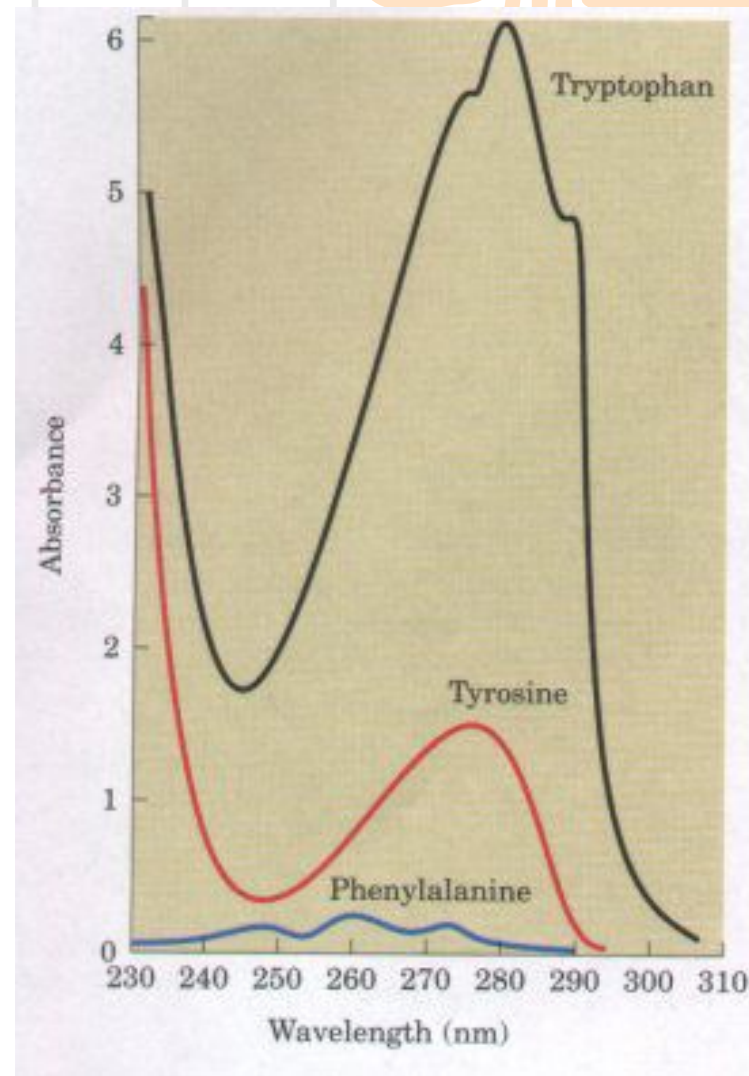
(2) 比较最大吸收波长

蛋白质的最大吸收波长为280nm，
核酸的最大吸收波长为260nm。

(3) 比较吸光度的比值

纯DNA

$$\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}} = 1.8$$



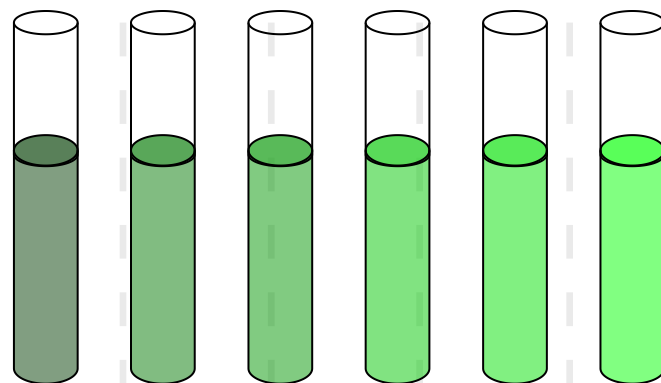
常用方法

1. 标准曲线法

□ 配制一系列不同浓度的标准溶液（至少5个）按测定管同样方法处理显色，在选定的波长分别测定各管的吸光度（ A ），以吸光度为纵坐标，标准溶液的浓度（ C ）为横坐标，制作标准曲线。

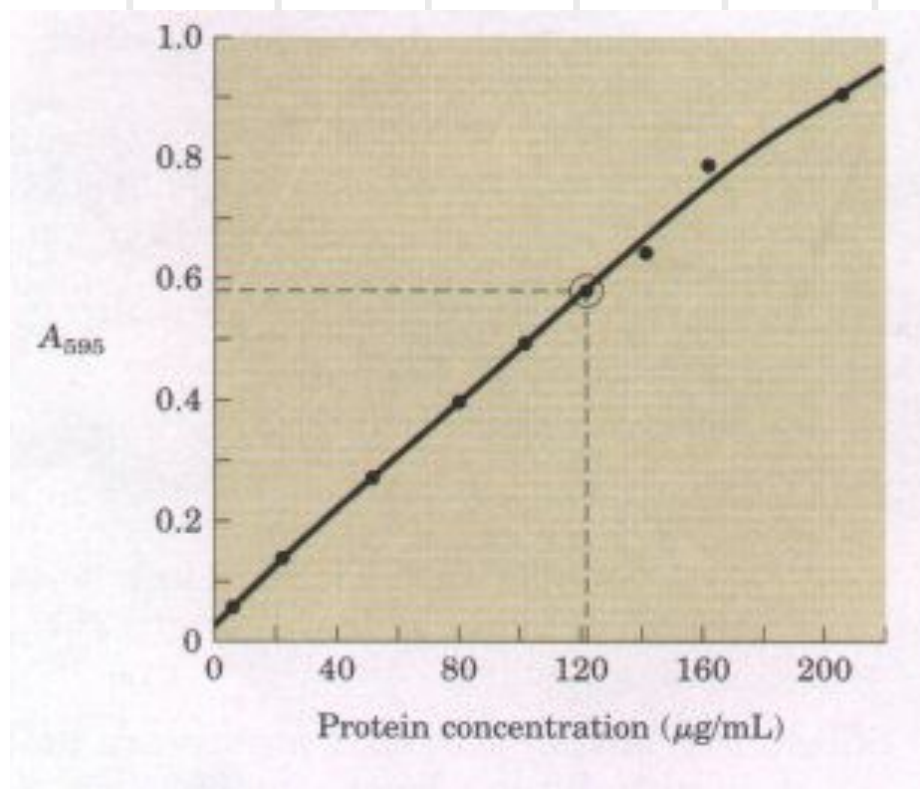
□ 根据样品的 A_{λ} 从标准曲线上查得样品含量，再计算出样品的浓度。

标准系列



未知样品





标准曲线与样品的测定条件必须一致。
待测样品的浓度必须在标准曲线范围内。

2. 标准管法

$C_X/A_X = C_S/A_S$, 已知 C_S , 测定 A_S 、 A_X , 可求得 C_X 。

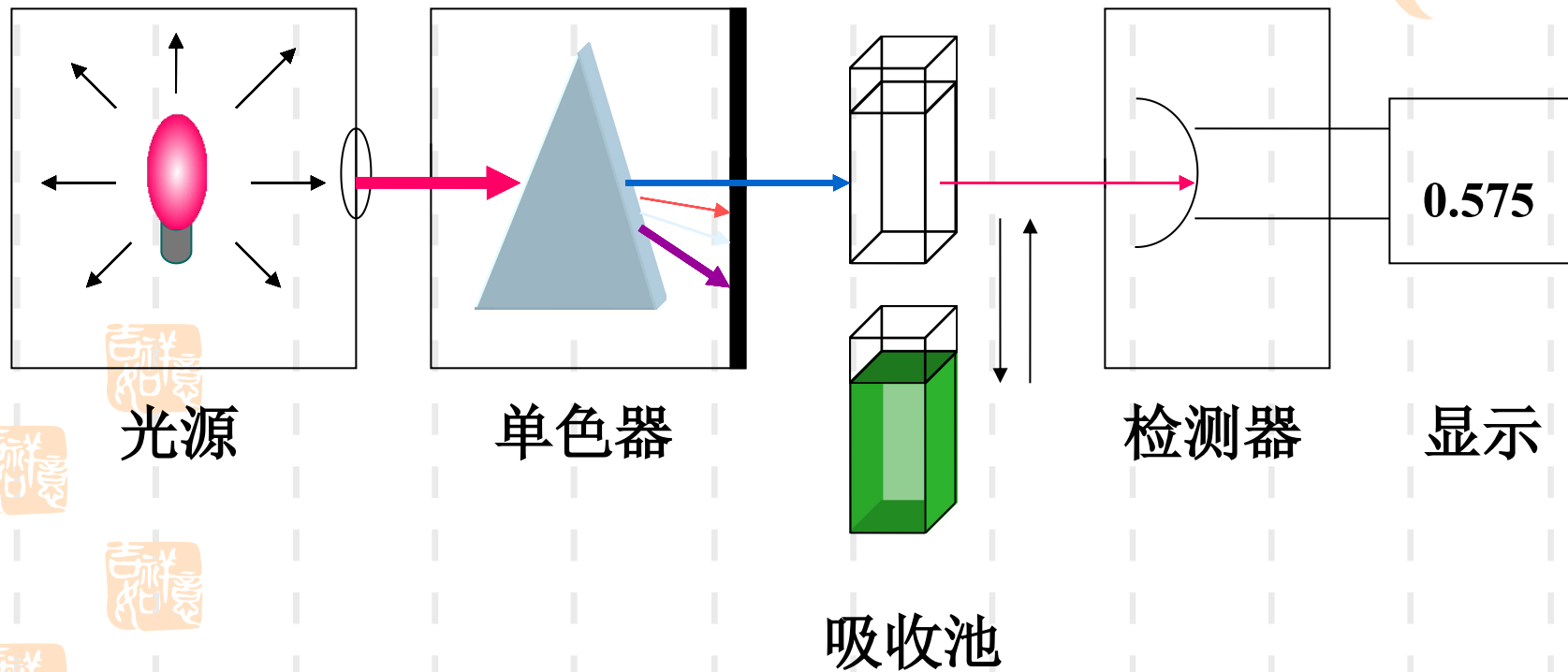
3. 摩尔吸光系数法

$C = A/\varepsilon$ (ε 为 $L=1\text{cm}$, C 为 1 mol/L 时的吸光系数, 也称为摩尔吸光系数。)

四 分光光度计的使用



紫外-可见分光光度计



单波长单光束分光光度计

1. 722型分光光度计的外形



2. 仪器操作键介绍

“方式设定”键（**MODE**）：用于设置测试方式

“**100%T/0ABS**”键：用于自动调整
100.0%T(100.0透射比)或0ABS(零吸光度)

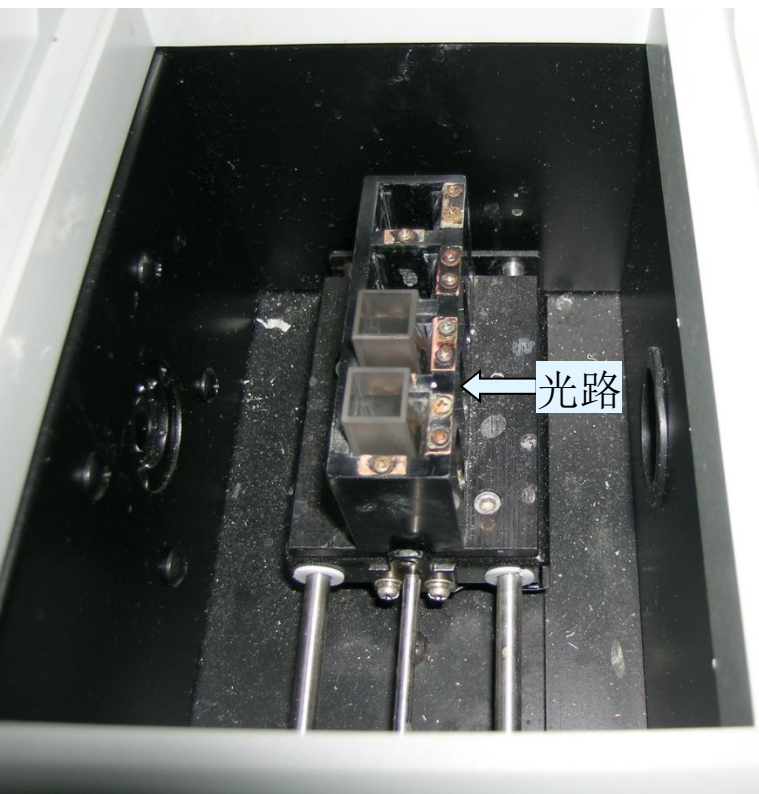
“**0%T**”键：用于自动调整零透射比

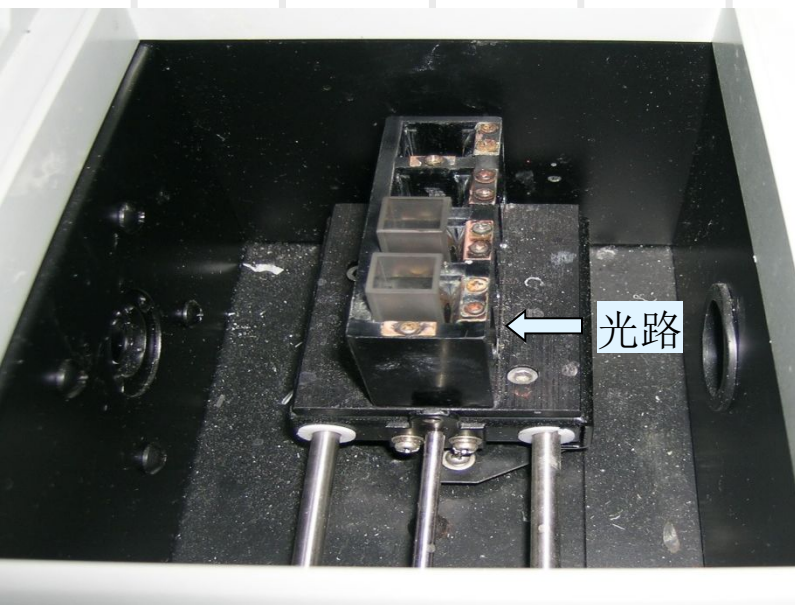
“**波长设置**”旋钮：用于设置分析波长

3.样品测试操作

- ① 打开电源开关，使仪器预热**20分钟**
- ② 用“波长设置”按钮将波长设置在您将要使用的分析波长位置上
- ③ 打开样品室盖，将参比溶液倒入比色皿中放入比色皿架靠近测定者一端位置，并将样品溶液倒入比色皿中放入比色皿架的其它位置，盖好样品室盖。
- ④ 拉动比色皿架拉杆一小格使比色皿架挡住光路，按“0%T”键调透射比为零
- ⑤ 推入比色皿架使参比溶液位于光路中，盖好样品室盖，按“100%T”调100%透射比
- ⑥ 按“方式键”（**MODE**）将测试方式设置为吸光度方式**A**，此时应显示为0，如果不是则按“100%T”再调**A**零
- ⑦ 将被测溶液拉入光路中，此时，显示器上所显示是被测样品的吸光度参数
- ⑧ 实验完成后，关闭电源，**洗净比色皿**，并盖好盖布。在签名本上签名。









比色皿的使用

1. 由于紫外光不能透过玻璃比色皿，紫外光区测量时要用石英比色皿。
2. 同组使用的比色皿必须配套（规格、新旧程度一致）。
3. 比色皿2光面与2毛面，光学表面对准光路，不能有任何污损，否则会引起光吸收的增加。
4. 比色皿中所盛溶液不能太少，也不能太多，一般所盛液体约占全部容积的 $\frac{2}{3}$ 。
5. 腐蚀性溶液不得长期盛放在比色皿中。
6. 每次使用后，应立即倒空，然后用水冲洗比色皿。

空白管的作用

测量过程中，因比色皿本身和溶剂也会产生一定的光吸收，故设置一个空白管，即其中除了待测溶质以外，其它的成分完全相同。

测量时，首先以空白管对准光路对仪器调零，既消除比色皿本身对光的吸收，又消除了非待测物对光的吸收，所测值即为待测物造成的光吸收。

吉祥如意

谢谢

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意