探究双缩脲试剂检测蛋白质的原理

李会娜 崔海娣 （河北正定中学 石家庄 050000）

摘 要 以双甘肽、缩二脲和蛋白质为实验材料对双缩脲试剂检测蛋白质的原理进行探究，同时区分双缩脲和双缩脲试剂。

关键词 双缩脲试剂 蛋白质 实验原理

1.选题分析

1.1教材分析

《检测生物组织中的糖类、脂肪和蛋白质》是人教版教材生物必修一第2章的内容，也是高中生物的第一个生物化学类实验，所以该实验是培养学生探究技能，养成良好科学探究素质的重要实验。本实验内容在整个高中生物知识体系中也占据着不容忽视的地位，在各年高考大纲中该实验的要求属于理解水平，层次较高。所以，本实验基于课本上的实验进行深入拓展研究。

1.2学情分析

授课对象为高一年级学生，初中已经掌握了基本的实验技能，但针对于高中更深层次的探究，其能力和技能还有待进一步提高。在本实验之前，学生已经进行了细胞中化合物的学习，在实验过程中，教师有意识地引导学生关注同一种物质在鉴定中存在着颜色深浅的明显差异，学生据此推测所检测材料中被鉴定物质的含量不同。

1.3目标分析

1.3.1 通过对实验结果的观察和比较分析，能用运用结构与功能观解释双缩脲试剂检测蛋白质的原理并意识到失活的蛋白质破坏了空间结构，所以失去原有的活性。（生命观念）

13.2 能够根据必修一的课本实验设计相关实验，建立科学的探究意识，掌握生化实验中定量分析的基本方法。（科学探究）

13.3 能够分析生物组织中蛋白质的大致含量，对日常均衡健康的饮食营养提出有价值的建议。（社会责任）

2.实验教学内容

2.1使用器材：

双缩脲试剂、鸡蛋清、奶粉、双甘肽、缩二脲、试管、试管架、烧杯、量筒、滴管、酒精灯、铁丝网、三脚架等

2.2实验原理：

在碱性溶液(NaOH)中，双缩脲(H2NOC—NH—CONH2)能与Cu2+作用，形成紫色或紫红色的络合物，这个反应叫做双缩脲反应。由于蛋白质分子中含有很多与双缩脲结构相似的肽键，因此，蛋白质可与双缩脲试剂发生颜色反应，双缩脲反应主要涉及肽键，受蛋白质特异性影响较小，且和蛋白质分子中所含肽键数目有一定的关系，肽键数目越多，颜色越深，因此，通过双缩脲试剂反应可以对蛋白质进行定量分析。

2.3实验改进要点：

通过比较鸡蛋清、煮熟的鸡蛋清、缩二脲、双甘肽、不同浓度的奶粉和不同稀释梯度的蛋清液进行的双缩脲试剂反应，帮助学生深入理解双缩脲试剂检测蛋白质的原理并对双缩脲和双缩脲试剂进行区分。

2.4实验主要内容：

具体实验过程如下：配置0.1g/ml的NaOH溶液，0.01g/ml的CuSO4溶液，准备各种器材。为尽可能保证各管所加入试剂反应的时间一致，把实验分三组来做：第一组，比较双甘肽、缩二脲、蛋清以及煮熟的蛋清、奶粉之间的颜色差异；第二组，配置不同浓度梯度的奶粉；第三组，比较相同稀释倍数下的奶粉溶液和蛋清溶液。每组反应的步骤一致，首先将每组的各个样品2ml依次加入洁净并标有标号的试管，然后向每支试管注入双缩脲试剂A液1ml，摇匀。再向各支试管内注入双缩脲试剂B液4滴，摇匀。观察试管中出现的颜色变化。通过观察分析各组实验结果，第一组结果中，发现除双甘肽没有出现紫色反应，其他几个试管均出现了紫色反应，但颜色深浅存在差异。验证了双缩脲试剂能够与缩二脲、有活性和灭活的蛋白质样液均可发生反应，产生紫色结果，而与双甘肽没有产生紫色反应。同样稀释倍数的煮熟与未煮熟的蛋清液结果无明显差异，煮沸失活的蛋白质虽然空间结构被破坏，肽键并没有断裂。进一步证实双缩脲试剂检测的原理本质上与蛋白质无关，而准确说更是检测肽键的有无，且能够发生双缩脲反应的化合物应该是含有两个或两个以上的肽键。第二组结果，比较不同浓度梯度的奶粉，可以看出随着奶粉稀释度的增大，颜色逐渐变浅，从而推知双缩脲试剂可以对蛋白质进行定量测定。当然，我们可以看到由于奶粉溶解后本身是乳白色非透明，所以浓度越大的奶粉显色结果不太明显。第三组结果，不同稀释梯度的奶粉溶液以及不同稀释梯度的蛋清溶液均随着稀释倍数增大逐渐出现明显的颜色递减的梯度变化。同时，可以看到相同的稀释倍数下的奶粉和蛋清液的结果比较差异还是很大的，说明不同的物质其含有的蛋白质含量存在差异。

3.实验效果评价

3.1每一种蛋白质都有特定的生物学功能，主要由其特定的结构所决定，煮沸后的蛋白质破坏了空间结构，所以永久失去原有的活性。但失活的蛋白质肽键没有受到影响，依然可以和双缩脲试剂反应生成紫色。通过比较有活性和煮沸失活的蛋白质的反应结果，可以让学生深刻理解双缩脲试剂检测蛋白质的原理，是因为铜离子与肽键反应而非与蛋白质本身反应。

3.2凯氏定氮法是测定奶粉中蛋白质含量的国家标准方法，但操作繁琐耗时，且蛋白质含量是通过测定N的含量推算出来的。有人利用凯氏定氮法的缺陷，向奶粉中添加尿素、硫酸铵、三聚氰胺等含氮化合物造成蛋白质含量虚高，导致出现问题奶粉。为了弥补上述方法的不足，可以采用双缩脲试剂直接对蛋白质定量分析。因为蛋白质与双缩脲试剂颜色反应强度在一定浓度范围内与蛋白质含量成正比，经与同样处理的蛋白标准液比较，即可求得蛋白质含量。当然，要想精确定量还需借助紫外分光光度计的比色法分析其浓度，在紫外可见光谱中的波长为540nm。

3.3 实验教学特色：通过比较相同稀释倍数的奶粉和蛋清的双缩脲反应，从而培养并影响学生的营养价值观，体现了应用技术解决生活实际问题的目的。从本次实验的奶粉结果可以使学生意识到本节课学习的定量检测对于开展科学研究、解决生活中的问题（例如如何发现劣质奶粉，从而避免“大头娃娃”的悲剧）具有重要意义。将学习内容与生活实际密切结合，使学生深切体会到技术的价值；引导学生担负社会责任，关注科学进步的重要性。

[基金项目：石家庄市教育科学“十三五”规划2017年度课题：高考改革对生物学科核心知识教学的影响研究。（2017304）]

主要参考文献

1 朱正威，赵占良. 生物必修1-分子与细胞.第2版.北京:人民教育出版社,2007：104-105.

2 陈宁清，郑司雨. 双缩脲试剂在检测蛋白质上的应用研究.中国医疗器械杂志,2014,38(6): 458-460.

作者简介：李会娜，1980.11，女，河北省安国市，河北正定中学，中学一级教师，博士，研究方向：高考改革下的生物教学方向。lihuina0807@163.com