

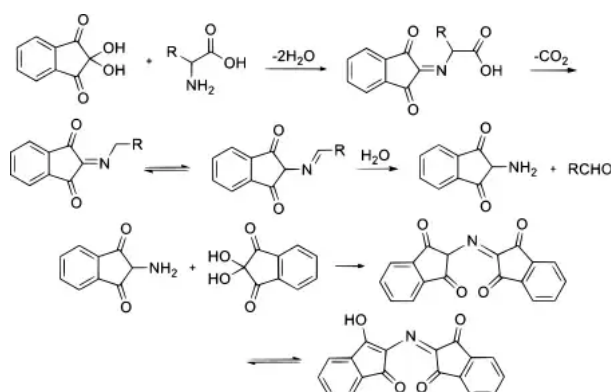
第一次作业

简述以下颜色反应的基本原理、操作和方法的灵敏度、定量范围以及局限性：双缩脲反应（蛋白质含有肽键），茚三酮反应（肽类、氨基酸及其它伯胺类化合物等具有氨基的化合物），坂口反应（精氨酸及含精氨酸的蛋白质）

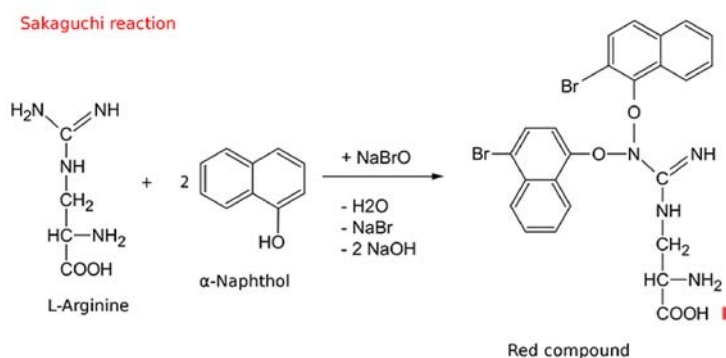
基本原理：

双缩脲反应：在碱性条件下，具有两个酰胺基或两个直接连接的肽键，或具有能够以1个中间碳原子相连的肽键的化合物，如多肽、蛋白质等，能用肽键上的氮原子与 Cu^{2+} 直接络合（另一种说法为，被肽键络合的 Cu^{2+} ，在碱性条件下，会被半胱氨酸、胱氨酸、色氨酸、酪氨酸和肽键还原为 Cu^+ ），形成四配位化合物而显强烈的紫色，且显色程度仅与参与络合的肽键数（等效于溶液中多肽或蛋白质的浓度）有关，而与蛋白质分子量及氨基酸成分无关，因此可通过测定540 nm处的吸光度，结合工作曲线进行测量。[1-3]

茚三酮反应：茚三酮是一种强氧化剂，在弱酸性溶液中与 α -氨基酸共热，引起 α -氨基酸氧化脱氨，反应产物为相应的醛、氨、二氧化碳（均来自 α -氨基酸），以及还原茚三酮，产生的氨、还原茚三酮和另一个茚三酮分子反应生成紫色产物（见下图）。后者可用紫外可见光谱仪在570 nm波长处进行定量测定。[4-5]此外释放的二氧化碳用测压法测量，也可计算出参加反应的 α -氨基酸量。[4]值得注意的是，两种亚氨基酸，即脯氨酸和羟脯氨酸，与茚三酮反应时并不产生氨，而是直接生成亮黄色产物，其最大吸收峰在440 nm。[4]



坂口反应：在碱性条件下，精氨酸的胍基能与萘酚（或萘酚衍生物）和次卤酸钠（如 NaClO 或 NaBrO ）反应，生成红色物质，该物质在520 nm左右具有强烈吸收，且在一定范围内，吸光度与精氨酸的浓度成正比。[6-7]



操作：

双缩脲反应：首先配置双缩脲试剂，将 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶于适量去离子水中，得 CuSO_4 溶液，再加入一定量酒石酸钾钠($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)和碘化钾(KI)，溶解后与适量氢氧化钠(NaOH)溶液混合，定容，得双缩脲试剂。通常厂家提供的双缩脲试剂，如赛默飞世尔(Thermo Fisher)和西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich)的总蛋白测定试剂盒所使用的双缩脲试剂中，含 CuSO_4 $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ， NaOH $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，酒石酸钾钠 $32 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，碘化钾 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。[8-9]

接下来，如果仅做定性实验，则取少量待测液，与双缩脲试剂混合，若混合后溶液变为紫色，则待测液含多肽或蛋白质。如果还需要测定待测液的蛋白质浓度，则需要配置等体积的空白溶液和一系列已知浓度的蛋白质标准溶液，然后分别与一定量双缩脲试剂混合，用紫外可见光谱仪测定540 nm处吸光度大小，作出工作曲线，再取等体积的待测溶液，与等量双缩脲试剂混合，用紫外可见光谱仪测定540 nm处吸光度大小，结合工作曲线得出待测溶液的蛋白质浓度。

茚三酮反应：取适量茚三酮溶于丙酮，配置成2%的茚三酮溶液（也可购买试剂厂商预先配置的茚三酮溶液）。接下来，如果仅做定性实验，则取少量待测液(1 mL)，与茚三酮溶液混合均匀，然后置于水浴中加热一段时间（5~10 min），若水浴加热后溶液变为紫色，则待测液含肽类、氨基酸及其它伯胺类化合物等具有氨基的化合物。[10]如果还需要测定待测液的氨基酸含量，则需要配置等体积的空白溶液和一系列已知浓度的氨基酸标准溶液，然后按上述步骤加入茚三酮溶液，置于水浴中加热一段时间，用紫外可见光谱仪测定570 nm处吸光度大小，作出工作曲线，再取等体积的待测溶液，与等量茚三酮溶液混合，置于水浴中加热相同时间，用紫外可见光谱仪测定570 nm处吸光度大小，结合工作曲线得出待测溶液的氨基酸浓度。

坂口反应：首先，准备一定量1%萘酚的乙醇溶液，1%尿素溶液，和次氯酸钠溶液；接下来，如果仅做定性实验，则取少量待测液(1 mL)，滴加2滴1%萘酚的乙醇溶液，摇匀；再加入2 mL次氯酸钠溶液，加完后立即加入1 mL尿素溶液，以稳定可能生成的红色化合物。如果在加入次氯酸钠溶液后，溶液变成红色，则待测液含精氨酸或具有精氨酸残基的蛋白质。[11]如果还需要测定待测液的精氨酸含量，或是某种含精氨酸残基的蛋白质含量，则需要配置等体积的空白溶液和一系列已知浓度的氨基酸标准溶液，然后按上述步骤依次加入1%萘酚的乙醇溶液、次氯酸钠溶液、1%尿素溶液，用紫外可见光谱仪测定520 nm处吸光度大小，作出工作曲线，再取等体积的待测溶液，按上述步骤依次加入1%萘酚的乙醇溶液、次氯酸钠溶液、1%尿素溶液，用紫外可见光谱仪测定520 nm处吸光度大小，结合工作曲线得出待测溶液的氨基酸浓度。

方法灵敏度：

双缩脲反应：传统认为双缩脲反应的灵敏度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，但有部分研究者[12]发现工作曲线线性区间的下限可达 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，不过由于该研究属于孤例，无更多研究佐证，因此笔者认为双缩脲反应的（可信）灵敏度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

茚三酮反应：由于茚三酮反应的显色程度不仅与氨基酸的浓度有关，还与氨基酸的种类有关，因此没有一个标准值。根据国内的研究，茚三酮反应的线性区间下限有 $80 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (对谷氨酸)[13]， $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (对赖氨酸)[14]；对应于蛋白质总质量，约为 $2 \text{ } \mu\text{g}$ [15]，但仍有争议。

坂口反应：根据国内的研究，坂口反应的线性区间下限为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ [16]或 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ [7]；对应于精氨酸总质量，约为 $2.5 \text{ } \mu\text{g}$ [17]，但仍有争议。

定量范围：

双缩脲反应：该反应的定量范围说法不一。国内常见的说法为 $1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 或 $1 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ [18]，但根据国外的相关研究[2]，以及Thermo Fisher[1,8]、Biochrom[3]、Sigma-Aldrich[9]的技术文档，双缩脲反应的定量范围为 $5 \sim 160 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，这可能与双缩脲试剂的配置，以及反应的具体操作有关。

茚三酮反应：根据国内的研究，茚三酮反应的定量范围有 $80 \sim 130 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (对谷氨酸)[13]， $50 \sim 300 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (对赖氨酸)[14]。

坂口反应：根据国内的研究，坂口反应的线性定量范围为 $0.02\sim 0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[16]或 $0.01\sim 0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[7]

局限性：

双缩脲反应：（1）容易受脂质、螯合配体（EDTA、EGTA、柠檬酸、Tris等）、含螯合基团的生物分子（胆红素、血红蛋白等）、还原性物质（葡萄糖、右旋糖苷、维生素C等）、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等物质的干扰^[2,11]；（2）灵敏度低，对于微量蛋白质检测效果差。

茚三酮反应：（1）脯氨酸和羟脯氨酸，与茚三酮反应时并不产生氨，而是直接生成亮黄色产物；（2）茚三酮溶液配置复杂，且需现配现用^[15]，如果是购买的茚三酮试剂，必须避光保存，并充入惰性气体，否则容易因氧化而变质，影响之后的测定^[19]。

坂口反应：（1）试剂种类多且繁杂；（2）加入次氯酸钠后要立即加入尿素，对时间的把握较为严格；（3）只对精氨酸或含有精氨酸残基的蛋白质有效，适用范围较窄。

Reference

- [1] Thermo Fisher Scientific. Chemistry of Protein Assays. <https://www.thermofisher.com/cn/zh/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html> (accessed Feb 25, 2020)
- [2] Krohn, R. I. *Current Protocols in Cell Biology*. **2011**, 52(1), A.3H.1.
- [3] Biochrom. Technical Note: Colorimetric Protein Assays - Assays for Determining Protein Concentration. https://biochromspectros.com/media/wysiwyg/support_page/Colorimetric_Protein_Assays.pdf (accessed Feb 25, 2020)
- [4] 朱圣庚, 徐长法主编. 生物化学(第4版). 北京: 高等教育出版社, 2017, 51-52.
- [5] Ninhydrin. *Wikipedia*. [Online]; <https://en.wikipedia.org/wiki/Ninhydrin> (accessed Feb 25, 2020)
- [6] Weng, L.; Gan, L.; Wang, S.; Lan, X. *Chin. J. Pharm.* **2004**, 35(9), 547.
翁连进, 甘林火, 王士斌, 蓝心仁. 中国医药工业杂志. **2004**, 35(9), 547.
- [7] Meng, Q.; Lai, B.; Zhou, X. *Amino Acid & Biotic Resources*. **1998**, 20(3), 1-4.
蒙绮芳, 赖碧清, 周锡梁. 氨基酸和生物资源. **1998**, 20(3), 1-4.
- [8] Thermo Fisher Scientific. Total Protein Reagent (Biuret Method) [EN]. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Total-Protein-Reagent-EN.pdf> (accessed Feb 25, 2020)
- [9] Sigma-Aldrich. Total Protein Reagent (T1949) - Bulletin. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/t1949bul.pdf> (accessed Feb 25, 2020)
- [10] LaboratoryInfo. Ninhydrin Test – Procedure, Uses, Principle and Result. <https://laboratoryinfo.com/ninhydrin-test/> (accessed Feb 26, 2020)
- [11] Karki, G. Online Biology Notes. Sakaguchi test: Objective, Principle, Reagents, Procedure and Result. <https://www.onlinebiologynotes.com/sakaguchi-test-objective-principle-reagents-procedure-and-result/> (accessed Feb 26, 2020)
- [12] Janairo, G.; Linley, M.; Yap, L.; Llanos-Lazaro, N.; Robles, J. *e-J. Sci. Technol.* **2011**, 5, 77.
- [13] Wang, A.; Wang, L.; Yi, H.; Zhao, Z. *China Condiment*. **2005**, 8, 50.
王昂, 王丽丽, 仪宏, 赵紫华. 中国调味品. **2005**, 8, 50.
- [14] Liu, F.; Li, Q.; Yu, L. *China Food Additive*. **2010**, 5, 223.
刘飞飞, 李群, 于岚. 中国食品添加剂. **2010**, 5, 223.
- [15] Zhu, W.; Xie, X.; Feng, F.; Liu, J. *J. Donghua Univ.(Natural Science)* **2015**, 41(1), 60.
朱文祥, 谢学辉, 冯帆, 柳建设. 东华大学学报(自然科学版). **2015**, 41(1), 60.
- [16] He, X.; Sun, Y.; Chen, H. *Food and Drug*. **2007**, 9(1A), 18.
贺小贤, 孙莹, 陈合. 食品与药品. **2007**, 9(1A), 18.
- [17] Lu, S.; Shang, H. *J. Biochem. Pharm.* **1991**, 3, 61.
陆森如, 尚灏. 中国生化药物杂志. **1991**, 3, 61.
- [18] Li, N. *J. Shanxi Agric. Univ.* **2006**, 26(2), 132.

李宁. 山西农业大学学报. **2006**, 26(2), 132.

[19] Sigma-Aldrich. Ninhydrin Reagent solution (N7285) - Product Information Sheet. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/n7285pis.pdf (accessed Feb 26, 2020)