**1.双缩脲反应**

原理：在碱性溶液中，蛋白质中的亲核基团（大部分为肽键）与铜离子形成四配位紫红色化合物，在545 nm光照射下，吸光度与反应产物浓度成正比，因此可以用来蛋白定量。

操作：在蛋白质溶液中，先加入碱溶液，混合均匀后再逐滴加入硫酸铜溶液。

灵敏度与定量范围：灵敏度较低，大约为1 mg/mL，定量范围约1-10mg/mL。

局限性：灵敏度低，所需样品量大，测定范围有限；存在干扰，缓冲液中的氨基酸和肽可能会干扰测定，在同一个C或者N原子上连接有-CONH2/-CH2NH2/-CH(NH)NH2/-CSNH2中任意两个的物质会发生类似反应而产生干扰。

**2.米伦式反应**

原理：米伦试剂为硝酸、亚硝酸、硝酸汞、亚硝酸汞的混合物，能与单酚、双酚和吲哚生物产生颜色，这些反应最初产生的有色物质可能是酚的亚硝基衍生物，经互变异构后成为颜色更深的邻醌肟，最终形成红色稳定产物。酚类化合物有此反应，酪氨酸含有酚基，故酪氨酸及含有酪氨酸的蛋白质都有此反应。

操作：取2 mL蛋白质溶液，加0.5 mL米伦试剂，此时出现蛋白质的沉淀（因试剂含汞盐及确酸之故），小心加热，凝固之蛋白质出现红色。

灵敏度与定量范围：灵敏度较低，适用于各类蛋白质测定范围5 mg/mL蛋白质溶液。

局限性：酚类化合物有此反应，组成蛋白质的氨基酸中只有酪氨酸含有酚羟基，即只有含酪氨酸的蛋白质才能显色；不能利用米伦反应检测尿蛋白，试剂中的汞离子能被尿，无机盐所沉淀，使试剂失效；碱也能沉淀汞离子，因此，鉴定碱性试样时，必须先酸化。

**3.茚三酮反应**

原理：在加热条件及弱酸环境下，[氨基酸](https://baike.baidu.com/item/%E6%B0%A8%E5%9F%BA%E9%85%B8/303574)或肽与[茚三酮](https://baike.baidu.com/item/%E8%8C%9A%E4%B8%89%E9%85%AE)反应生成紫蓝色（与天冬酰胺则形成棕色产物，与[脯氨酸](https://baike.baidu.com/item/%E8%84%AF%E6%B0%A8%E9%85%B8/4929208)或[羟脯氨酸](https://baike.baidu.com/item/%E7%BE%9F%E8%84%AF%E6%B0%A8%E9%85%B8/5486554)反应生成黄色产物）化合物及相应的醛和二氧化碳的反应。茚三酮在酸性的还原性环境下能与氨基酸、蛋白质中的α-氨基迅速反应，生成紫蓝色化合物，在波长560-580 nm有吸收峰，因此可用于蛋白质定量。

操作：取适量茚三酮溶于丙酮，配置成2%的茚三酮溶液。取检品的水溶液1 mL，加入茚三酮试液2-3滴，加热煮沸5-10分钟，待其冷却，根据呈现红色棕色或蓝紫色来进行定性和定量。

灵敏度与定量范围：由于该反应的显色程度与氨基酸的浓度和种类相关，因此没有一个标准值。通常对于氨基酸的灵敏度约80 μg/mL，定量范围约几十到几百μg/mL。

局限性：受温度、pH以及反应时间的影响；也存在干扰物，例如氨和许多一级胺化合物；茚三酮溶液需要现用现配；购买的茚三酮试剂需要避光保存，并充入惰性气体以防止氧化。

**4.乙醛酸反应**

原理：含有吲哚基的色氨酸在浓硫酸存在下与乙醛酸（CHOCOOH）缩合，形成与靛蓝相似的物质。此反应机理尚不清楚，可能是由一分子乙醛酸与两分子色氨酸脱水缩合而成的。含有色氨酸的蛋白质也有此反应。

操作：向试管中加数滴蛋白质溶液，再加冰醋酸（常含有少量乙醛酸或醛类）约1 mL并混匀倾斜试管，谨慎地沿着管壁加浓硫酸（AR）约1 mL，使其重叠，且勿使二者混合。静置后，观察在两液界面上出现的红紫色环，于水浴中微热，可加快色环形成。

灵敏度与定量范围：适用于含有吲哚基结构的化合物测定范围5mg/mL蛋白质溶液。多用于定性检测蛋白质。

局限性：只有含吲哚基的化合物如色氨酸才有此反应，不能检测不含有色氨酸结构的蛋白质分子，如不含色氨酸的白明胶，如果这种特定氨基酸含量很低或位于蛋白质内部也可能不发生反应。

**5. 坂口反应**

原理：本法广泛用于精氨酸的分析与测定。精氨酸与α-萘酚在碱性次溴酸钠（或次溴酸钾）中发生反应，得到红色产物。

操作：取蛋白质溶液1 mL，再加10% NaOH溶液0.5 mL，0.2% α-萘酚2滴，混合后再加次溴酸钠溶液2滴，观察颜色的变化。

灵敏度与定量范围：十分灵敏，最低可以测到0.001 mg/mL的精氨酸，检测范围大概在0.001-0.01 mg/mL。

局限性：只局限于精氨酸的定量与分析；步骤很多，操作流程复杂；需要低温，且有时间限制，必须要快速操作。

**6.福林反应**

原理：利用蛋白质中有带酚基的酪氨酸和色氨酸残基，在碱性条件下，使福林-酚试剂中的磷钼酸化合物（组成可表示为3H2O·P2O5·14WO3·4MoO3·10H2O）还原，形成蓝色化合物。（λmax=745 – 750 nm，λmax=405 nm）通过蛋白质含量与吸光度的校准曲线进行定量。

操作：（1）配制福林试剂。典型的配置方法如下：于2000 mL磨口回流装置内加入钨酸钠（Na2WO4·2H2O）100 g，钼酸钠（Na2MoO4·2H2O）25 g。水700 mL，85％的磷酸50 mL，浓盐酸100 mL，文火回流10 h，加入硫酸锂（Li2SO4）150 g，蒸馏水50 mL，混匀取去冷凝器，加入几滴液体溴，再蒸沸15 min，以驱逐残溴及除去颜色，溶液应呈黄色。若溶液有绿色，需再加数滴液溴，再蒸沸除去，冷却后定容至1000mL，过滤，置于棕色瓶中保存，此溶液使用时加2倍蒸馏水稀释。（2）准备助剂。试剂A，含2 % Na2CO3的0.10 mol/L NaOH。试剂B，含0.5 % CuSO4·5H2O的 1 %酒石酸钠或酒石酸钾。试剂C，碱性Cu溶液。试剂A与试剂B以体积比50∶1混合，1 d内使用。（3）显色反应。向含有蛋白质的约0.2 mL样品，加入试剂C 1 mL，混匀后室温放置10 min以上。迅速加入稀释后的福林试剂 0.10 mL，并迅速混匀。30 min或更长时间后，用比色计或分光光度计测定样品。

灵敏度与定量范围：灵敏度取决于方法使用时的条件。典型方法的灵敏度为5 ppm（μg/mL），经过改进的福林-酚法可以达到0.2 ppm。定量范围取决于使用试剂的含量。一般定量范围为3-22 ppm。当提高福林-酚试剂含量5倍时可以使范围扩大到2-50 ppm。

局限性：干扰多，引起干扰的包括胺及其衍生物、氨基酸、磷酸钠、柠檬酸钠、螯合剂、脂类；不同蛋白质因酪氨酸、色氨酸等氨基酸含量的不同使显色强度稍有不同，有蛋白质的特异性影响，标准曲线也不是严格的直线形式；费时较长，需严格控制操作时间。