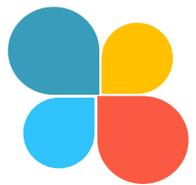




农科专业基础实验教学中心

# 基础生物化学实验

云南农业大学农科中心版权所有

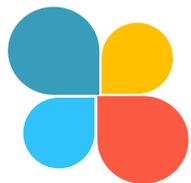


基础生物化学实验

# 谷物中蛋白含量的快速测定

## ——双缩脲法

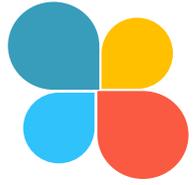
云南农业大学农科中心版权所有



为什么要测定？

谷物中蛋白质含量的高低决定谷物的营养品质，因此，**营养成分**析及**育种**常需测定蛋白质含量。

云南农业大学农学院所有



# 一、实验目的

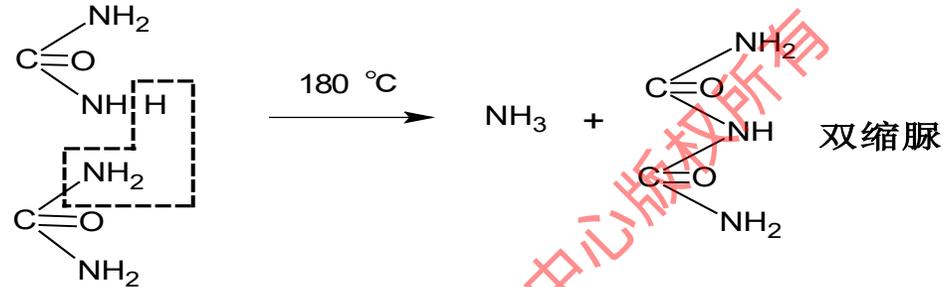
- 1、学习谷物蛋白质含量的快速测定方法
- 2、比较不同材料谷物蛋白质含量的差异
- 3、学习标准曲线法（回归方程法）测定谷物蛋白的含量

云南农业大学农科中心版权所有

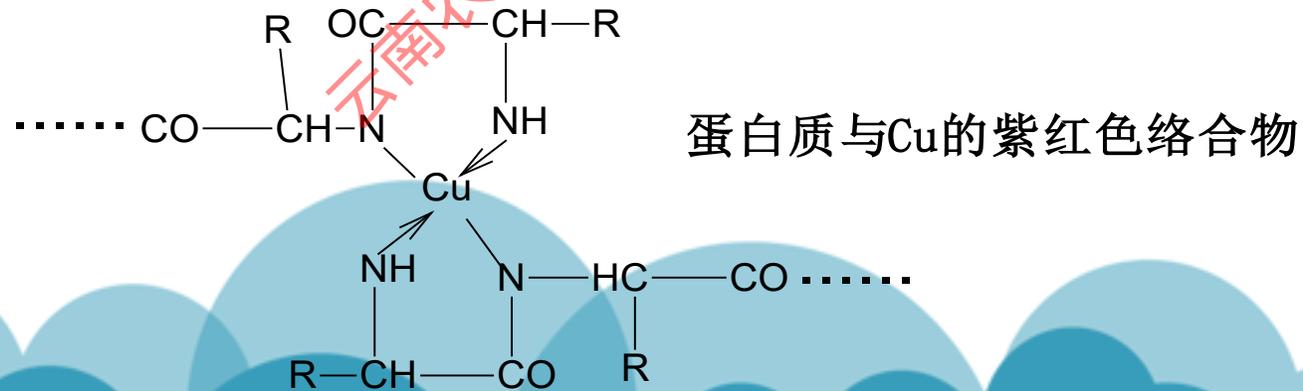


## 二、实验原理

双缩脲是两个分子脲经 $180^{\circ}\text{C}$ 左右加热，放出一个分子氨后得到的产物。

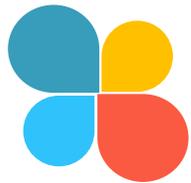


在浓碱溶液中，**双缩脲**与硫酸铜形成**紫色络合物**，称为双缩脲反应。蛋白质分子中含有许多**肽键** ( $\text{—CO—NH—}$ )，故能产生同样反应。



紫色络合物颜色的深浅与蛋白质含量成**正比**，而与蛋白质分子量及氨基酸成分无关，故可通过分光光度技术来测定蛋白质含量。

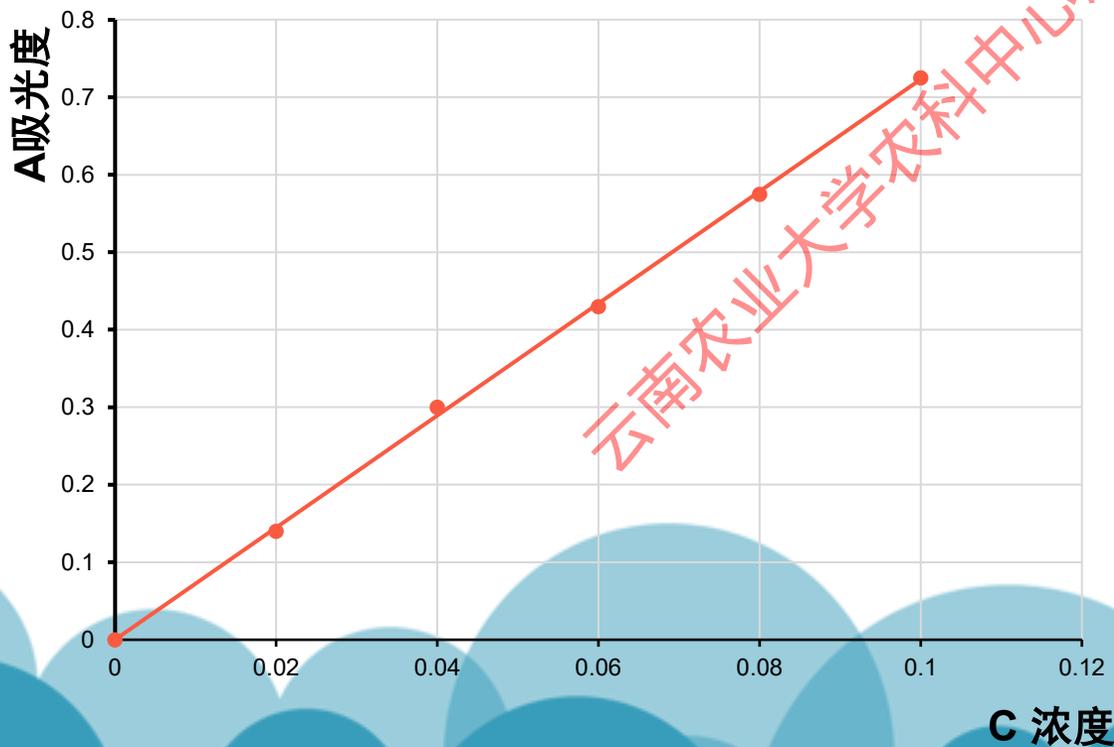
此法的优点是较快速，不同的蛋白质产生颜色的深浅相近，以及干扰物质少。主要的缺点是灵敏度差。因此双缩脲法常用于需要**快速**，但并不需要十分精确的蛋白质测定。



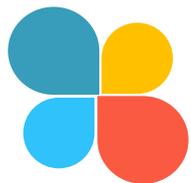
# 标准曲线法测定

酪蛋白 (g/ml)	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
吸光度值A	0	0.140	0.30	0.43	0.575	0.725

酪蛋白 标准曲线



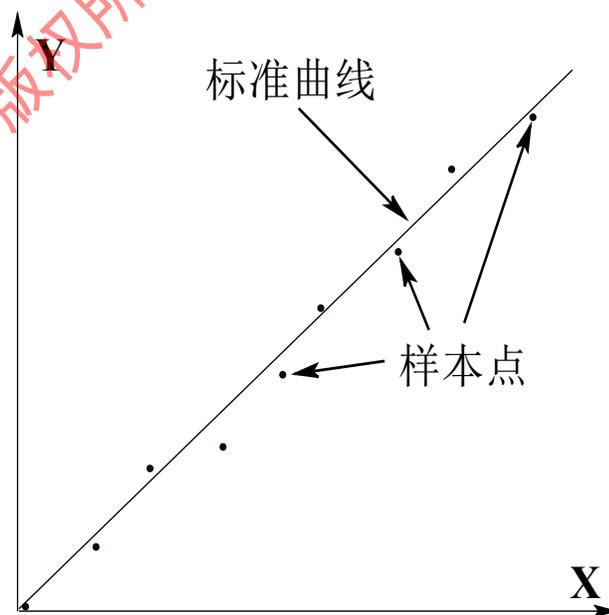
以吸光度为纵坐标，浓度为横坐标作图得到一条通过原点的直线，叫做**标准曲线**（或称工作曲线）。然后在同样条件下测定出待测液的吸光度，即可从标准曲线上查到其相对应的浓度。



# 回归方程法测定

根据测得的吸光度A，从曲线方程算出待测物的量（浓度C），再结合提取液体积、样品总质量等求出样品中待测物的含量。

回归分析是研究一个变量与另一个（或一组）变量间**相关关系的统计方法**。具体说来，就是对具有相关关系的变量通过实验观测的数据，建立相互之间的数学关系式——**经验公式**。如对有色溶液浓度与吸光度之间的相关性进行分析，就可得知两者间的关系为直线相关，**所获得的一元一次线性方程，称为回归方程**， $y=a+bx$ 其中溶液浓度为普通变量X，吸光度为随机变量Y；设计实验时使回归直线通过原点（即 $x_0=0, y_0=0$ ），可省去a值的计算，所得到的方程表示为 $y=bx$ ，其代表的直线也称为标准曲线（如右图所示）。 $y=A$ （吸光度）， $x=C$ （浓度），求出**b**值，从而求出**浓度C**



对所检测的样本通过实验获得关于X、Y两变量的若干数据，表示为  $(x_1, y_1)$ ， $(x_2, y_2)$ ， $\dots$ ， $(x_n, y_n)$ ，称为样本的n对实验值。根据这些实验值，用“最小二乘法”可推导出a和b的计算公式：

$$l_{XX} = \sum (x - \bar{x})^2 = \sum x^2 - \frac{1}{n} (\sum x)^2$$
$$l_{YY} = \sum (y - \bar{y})^2 = \sum y^2 - \frac{1}{n} (\sum y)^2$$
$$l_{XY} = \sum xy - \frac{1}{n} (\sum x)(\sum y)$$
$$b = \frac{l_{XY}}{l_{XX}}$$

例如，某一实验中标准曲线测定过程得到以下数据：

序号 (管号)	0	1	2	3	4	5	6	7
浓度 (mmol · L <sup>-1</sup> )	0	10	20	40	60	80	100	120
吸光度A	0	0.054	0.102	0.198	0.310	0.415	0.490	0.598

根据上面的公式进行如下计算：

浓度为普通变量X，吸光度为随机变量Y，仅需求出b值；

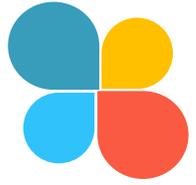
$$\sum x = 430, \sum x^2 = 36500, \sum y = 2.167, \sum xy = 183.06, n=8$$

$$l_{XX} = 36500 - 430^2 \div 8 = 13387.5, l_{XY} = 183.06 - 430 \times 2.167 \div 8 = 66.584$$

$$b = 66.584 \div 13387.5 \approx 0.005$$

即Y=0.005X，就是这一标准曲线的方程；如待测溶液的吸光度数值测得0.145，代入方程得0.145=0.005X，求出待测溶液浓度为29 mmol · L<sup>-1</sup>。

参照例题，用酪蛋白标准曲线计算出曲线方程，根据待测液吸光度值(A)，代入方程，求出蛋白浓度。



## 三、实验材料、仪器设备

### 1、材料

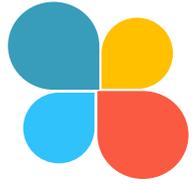
米粉 0.5g

小麦粉 0.5g

### 2、仪器设备

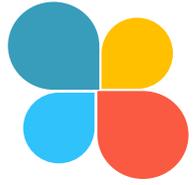
分光光度计；电子天平（千分之一）；100ml三角瓶；漏斗

云南农业大学农科中心版权所有



## 四、实验步骤

准确称取样品  $\left\{ \begin{array}{l} \text{面粉} 0.5\text{g} \\ \text{米粉} 0.5\text{g} \end{array} \right.$  → 分别放入干燥的100ml三角瓶中 → 依次加入0.5g碳酸铜 ( $\text{CuCO}_3$ ) → 无水乙醇10ml → 10ml 10%KOH → 盖塞 → 手摇10min → 静置3min → 过滤于100ml烧杯中 → 滤液倒入0.5cm光径比色皿 → 在分光光度计波长  $\lambda$  550nm比色 → 读取A值 → 记录数据 → 通过标准曲线查出相应蛋白浓度 (回归方程求出相应蛋白浓度) (C) → 代入公式计算并比较分析



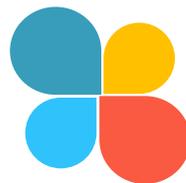
## 五、结果计算

按下列公式计算

$$\text{样品蛋白质}\% = \frac{\text{从标准曲线查得蛋白质浓度（从回归方程求出蛋白质浓度）（}C\text{）}}{\text{样品重（g）}} \times 100$$

谷物蛋白含量	面粉	米粉
%		

比较分析不同材料中谷物蛋白含量的差异



# 思考题

试验为什么要加无水乙醇（从蛋白质的结构上考虑）、KOH及碳酸铜且先加无水乙醇后加KOH？

云南农业大学农科中心版权所有

**实验结束请整理各自台面，  
保持实验室卫生整洁！ 谢谢！**

云南农业大学农科中心版权所有