

双缩脲法蛋白质含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定，确保蛋白浓度在1~10mg/ml范围内。

测定意义：

样品可溶性蛋白质含量常常用于酶活性计算。此外，可溶性蛋白质含量也用于食品等质量分析。

测定原理：

强碱性溶液中，双缩脲与CuSO₄形成紫色络合物；紫色络合物颜色的深浅与蛋白质浓度成正比，而与蛋白质分子量及氨基酸成分无关，故可用于测定蛋白质含量。该方法测定范围为1~10mg蛋白质，适用于蛋白质浓度高的样品，尤其是动物材料。

自备仪器和用品：

离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、移液器和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体20mL×1瓶，4℃保存。

标准品：液体1mL×1瓶，5 mg/mL，4℃保存。

样品中可溶性蛋白质提取：

1. 液体样品：澄清无色液体样品可以直接测定。
2. 组织样品：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液（自备，根据需要选用酶提取缓冲液或者蒸馏水或者生理盐水））

冰浴匀浆，8000g，4℃离心10min，取上清，即待测液。（动物样品常常需要稀释）

3. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后8000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。

测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30 min，调节波长到540 nm，蒸馏水调零。
2. 空白管：取0.5mL EP管，加入40μL蒸馏水，200μL试剂一，混匀后室温静置15 min，取200μL于微量玻璃比色皿/96孔板，540nm比色，记为A空白管。
3. 标准管：取0.5mL EP管，加入40μL标准液，200μL试剂一，混匀后室温静置15 min，取200μL于微量玻璃比色皿/96孔板，540 nm比色，记为A标准管。
4. 测定管：取0.5mL EP管，加入40μL待测液，200μL试剂一，混匀后室温静置15 min，取200μL于微量玻璃比色皿/96孔板，540nm比色，记为A测定管。

注意：空白管和标准管只需测定一次。

样品中蛋白质浓度计算公式：

$$\begin{aligned} C_{\text{待测}} (\text{mg/mL}) &= C_{\text{标准管}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \\ &= 5 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \end{aligned}$$

注意事项：

1.样品蛋白浓度须在1~10mg/ml范围内，低于1mg/ml不能用此法，高于10mg/ml须做相应稀释。因此测定前用1~2个样做预实验，确保蛋白浓度在1~10mg/ml范围内。

2.待测样品蛋白提取可用生理盐水、双蒸水或不含蛋白的PBS提取。该法受硫酸铵、Tris缓冲液干扰，提取液中应不含这些物质；否则改用BCA蛋白质含量测定试剂盒。

www.affandi-e.com