

双缩脲法蛋白含量测定试剂盒说明书

(货号：ADS-W-SP001-196 微板法 196 样 有效期：6 个月)

一、指标介绍：

在碱性溶液中，凡分子中含二个或二个以上酰胺基($-\text{CO}-\text{NH}_2$)或与此相似基团的化合物均与二价铜离子作用，络合物呈紫色，这一反应称双缩脲反应。蛋白质分子含有众多肽键($-\text{CONH}-$)，可发生双缩脲反应，且呈色强度在一定浓度范围内与蛋白质含量成正比，经光谱扫描 540nm 为最大吸波长。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×2 瓶	4℃保存	
试剂 A	液体 19mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 依据实验用量，临用前试剂 A:B:超纯水=5:3:2 的比例混匀成反应 mix; 2. 4℃避光保存两周。
试剂 B	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清，即待测液。

② 细菌或细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），12000rpm，4℃离心 10min，取上清，即待测液。

③ 液体样本：澄清无色液体样品可以直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤

① 酶标仪预热 30min，调节波长到 540 nm。

② 可先取 2 个样本预测，确定适合本批样本的浓度，若需要可用蒸馏水进行稀释，稀释倍数 D 代入公式计算。

③ 在 2mL 的 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	标准管 (只做一次)	空白管 (只做一次)
样本	20		
标准品		20	
蒸馏水			20
反应 mix	180	180	180
混匀，于 37℃保温 10min，全部转移到 96 孔板，于 540nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

五、结果计算：

$$1、\text{蛋白含量}(\text{mg/g 鲜重})=(C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \div (A \text{ 标准}-A \text{ 空白}) \div (W \times V1 \div V) \times D$$

$$=10 \times \Delta A \div (A \text{ 标准}-A \text{ 空白}) \div W \times D$$

$$2、\text{蛋白含量}(\text{mg/mL})=C \text{ 标准} \times \Delta A \div (A \text{ 标准}-A \text{ 空白}) \times D$$

$$=10 \times \Delta A \div (A \text{ 标准}-A \text{ 空白}) \times D$$

$$3、\text{蛋白含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=(C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \div (A \text{ 标准}-A \text{ 空白}) \div (V1 \div V \times 500) \times D$$

$$=0.02 \times \Delta A \div (A \text{ 标准}-A \text{ 空白}) \times D$$

C 标准---蛋白标准品浓度，10mg/mL；

V1---加入粗提液体积：0.02mL；

D---稀释倍数；

V---提取液体积：1mL；

W---样本质量：g；

500---细菌或细胞总数，500 万。

注意事项：

- 1 本法可测定范围为 1-10mg 蛋白质，适用于精度不高的蛋白质含量测定。
- 2 硫酸铵、Tris 缓冲液、EDTA、PVP 和一些氨基酸等物质会对测定造成干扰。
- 3 工作液长期放置后若有暗红色沉淀出现，即不能使用。