

双缩脲法蛋白质含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10563

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	自备	-
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支, 5 mg/mL	-20°C保存

溶液的配制:

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。

产品说明:

样本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。

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, 故可用来测定蛋白质含量。该方法适用于蛋白质浓度高的样本, 尤其是动物材料。

技术指标:

最低检出限: 0.1304 mg/mL

线性范围: 0.5-10 mg/mL

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

离心机、可见分光光度计、移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

- 1、液体样本: 澄清无色液体样本可以直接测定。
- 2、组织样本: 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) 冰浴匀浆, 8000g, 4°C离心 10min, 取上清, 即待测液。(动物样本常常需要稀释)
- 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°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min, 调节波长到540nm, 蒸馏水调零。

- 2、空白管：取1mL玻璃比色皿，加入200 μ L蒸馏水，1000 μ L试剂一，混匀后室温静置15min，于540nm比色，记为A空白管。
- 3、标准管：取1mL玻璃比色皿，加入200 μ L标准液，1000 μ L试剂一，混匀后室温静置15min，于540nm比色，记为A标准管。
- 4、测定管：取1mL玻璃比色皿，加入200 μ L待测液，1000 μ L试剂一，混匀后室温静置15min，于540nm比色，记为A测定管。

注意：空白管和标准管只需测定 1-2 次。

三、样本中蛋白质浓度计算

- 1、按液体体积计算：

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

- 2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned}\text{蛋白质 (mg/g 质量)} &= C_{\text{标准管}} \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{样总}} \div W \\ &= 5 \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div W\end{aligned}$$

- 3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned}\text{蛋白质 (mg/10}^4 \text{ cell)} &= C_{\text{标准管}} \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{样总}} \div 500 \\ &= 0.01 \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}})\end{aligned}$$

C标准管：5mg/mL；V样总：样本总体积，1mL；W：样本质量，g；500：细胞总数，500万。

注意事项：

- 1、样本蛋白浓度须在0.5~10mg/mL范围内，低于0.5mg/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0.5~10mg/mL范围内。
- 2、如果吸光值大于0.44，则需要将样本用蒸馏水稀释后再测定。
- 3、待测样本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。