

双缩脲法蛋白含量测定试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介:

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:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|---------------|---------|--|
| 提取液 | 液体 50mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂 A | 液体 22.5mL×1 瓶 | 4°C避光保存 | 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，4°C避光保存两周。 |
| 试剂 B | 液体 13.5mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 标准品 | 液体 1mL×1 支 | 4°C保存 | |

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、恒温水浴锅、移液器。

四、蛋白含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液冰浴匀浆，12000rpm，4°C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°C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、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min，调节波长到 540 nm，蒸馏水调零。

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:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 标准管 (只做一次) | 空白管 (只做一次) |
|------------------------|-----|---------------|---------------|
| 样本 | 100 | | |
| 标准品 | | 100 | |
| 蒸馏水 | | | 100 |
| 反应 mix | 900 | 900 | 900 |

混匀，于 37°C保温 10min，全部转移到 1mL 玻璃比色皿中，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、蛋白含量 (mg/g 鲜重)=(C 标准×V1)×ΔA÷(A 标准-A 空白)÷(W×V1÷V)×D
=10×ΔA÷(A 标准-A 空白)÷W×D

2、蛋白含量(mg/mL)=C 标准×ΔA÷(A 标准-A 空白)×D
=10×ΔA÷(A 标准-A 空白)×D

3、蛋白含量(μg/10⁴ cell)=(C 标准×V1)×ΔA÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×500)×D
=0.02×ΔA÷(A 标准-A 空白)×D

C 标准---蛋白标准品浓度，10mg/mL；

V---提取液体积：1mL；

V1---加入粗提液体积：0.1mL；

W---样本质量：g；

D---稀释倍数；

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。