

双缩脲法蛋白质含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50T/48S

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 CuSO_4 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、移液器、1 mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制

试剂一:液体 50mL×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(10^4 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. 分光光度计预热 30 min,调节波长到 540 nm,蒸馏水调零。
2. 空白管:取 1 mL 玻璃比色皿,加入 200 μL 蒸馏水,1000 μL 试剂一,混匀后室温静置 15 min,于 540nm 比色,记为 A 空白管。
3. 标准管:取 1 mL 玻璃比色皿,加入 200 μL 标准液,1000 μL 试剂一,混匀后室温静置 15 min,于 540 nm 比色,记为 A 标准管。
4. 测定管:取 1 mL 玻璃比色皿,加入 200 μL 待测液,1000 μL 试剂一,混匀后室温静置 15 min,于 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

$$C \text{ 待测 (mg/mL)} = C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \\ = 5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

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。