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 $CuSO_4$ 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/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（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/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：

C 待测（mg/mL）= C 标准管×(A 测定管－A 空白管)÷(A 标准管－A 空白管)

=5×(A 测定管－A 空白管)÷(A 标准管－A 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。