

## 双缩脲法蛋白含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10368W-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 <b>反应 mix</b> ;<br>2. <b>4℃避光保存两周</b> 。 |
| 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<br>(只做一次) | 空白管<br>(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,<br>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；

V---提取液体积：1mL；

V1---加入粗提液体积：0.02mL；

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。