

# 蛋白含量（SP）试剂盒（双缩脲法） 检测试剂盒微板法

## 使用说明书

产品货号：BP10368W

注意：请在试剂盒保质期内使用，具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用，不能用于临床诊断。

检测范围：0.5-20mg/mL

灵敏度：0.5mg/mL

有效期：6个月

保存温度：2-8℃和-20℃

## 检测原理:

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。

## 注意事项:

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 待测样品蛋白提取可用生理盐水、蒸馏水或不含蛋白的 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。
3. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
4. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
5. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
6. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

**试剂盒组分：**

试剂名称	规格（48T/40S）	规格（96T/88S）	保存条件
试剂一	12.5mL×1 瓶	25mL×1 瓶	2-8℃，避光
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃

**所需仪器耗材及试剂：**

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱。

## 样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.5-20mg/mL, 如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩, 样本的稀释液为蒸馏水。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性。
3. **组织样本**: 按照组织质量 (g): 生理盐水/蒸馏水体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 生理盐水/蒸馏水) 进行冰浴匀浆; 10000 g 4℃ 离心 10min, 取上清液待测。
4. **细菌、细胞样本**: 按按照细胞数量 ( $10^4$  个): 生理盐水/蒸馏水体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 生理盐水/蒸馏水), 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min); 10000 g 4℃ 离心 10 min, 取上清液待测。
5. **血清 (浆) 等液体样本**: 直接测定。若浑浊, 离心后取上清测定。

### 检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **标准品溶液的配制:** 临用前取一瓶标准品加入 1mL 蒸馏水，溶解为 10mg/mL 的标准品母液。把标准品母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0、1、2、4、5、6、8、10mg/mL。（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从对应浓度的标准品溶液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mg/mL)	0	1	2	4	5	6	8	10
10mg/mL 标准品(μL)	0	20	40	80	100	120	160	200
蒸馏水(μL)	200	180	160	120	100	80	40	0

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准孔加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

**操作步骤:**

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。
2. 样本测定 (在 96 孔板中依次加入):

试剂名称( $\mu$ L)	标准孔	测定孔
样本		40
不同浓度的标准品	40	
试剂一	250	250

充分混匀, 室温静置 15min, 于 540nm 处读取 OD 值。

**注:**

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、蒸馏水或不含蛋白的 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。

### 实验结果结算：

1. 标准品拟合曲线： $y=ax+b$

2. 样本中蛋白质浓度计算公式：

$$\text{总蛋白含量(mg/mL)}=(\Delta A-b)\div a\times N$$

### 注：

y：标准品 OD 值-空白孔 OD 值  
(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

$\Delta A$ ：测定孔 OD 值-空白孔 OD 值  
(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品浓度

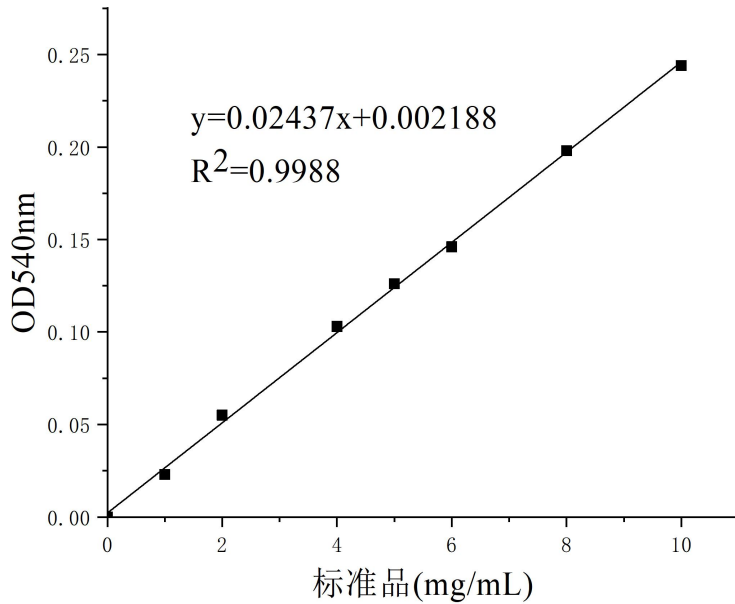
N：样本的稀释倍数

a：标准曲线斜率

b：标准曲线截距

参考曲线:

$y=0.02437x+0.002188, R^2=0.9988$ , x 是标准品的浓度 (mg/mL), y 是  $\Delta A$ 。



注意: 本图仅供参考, 应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。