

双缩脲法蛋白含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-SP001 微板法 96 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×1 瓶	4℃保存	1. 依据实验用量, 临用前试剂 A:B:超纯水=5:3:2 的比例混匀成反应 mix; 2. 4℃避光保存两周。
试剂 A	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂 B	液体 7mL×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, 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:

试剂组分 (μL)	测定管	标准管 (只做一次)	空白管 (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, 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)×△A÷(A 标准-A 空白)÷(W×V1÷V)×D

$$=10 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

2、蛋白含量 (mg/mL)=(C 标准×V1)×△A÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V)×D

$$=10 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

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