北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

双缩脲法蛋白含量检测试剂盒说明书

微量法

货号: D17155

规格: 100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	自备	-
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支，5 mg/mL	-20℃保存

溶液的配制：

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。

产品说明：

样本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。

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。该方法适用于蛋白质浓度高的样本，尤其是动物材料。

技术指标：

最低检出限：0. 1718 mg/mL

线性范围：0.25- 12 mg/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、离心机、移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1 、液体样本：澄清无色液体样本可以直接测定。

2 、组织样本：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）冰浴匀浆，10000rpm ，4℃离心 10min ，取上清，即待测液。（动物样本常常需要稀释）

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。

二、测定步骤

1 、 分光光度计/酶标仪预热30min 以上，调节波长到540nm ，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15min，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15min，取200μL于微量玻璃比色皿/96孔板，540nm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15min，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 1-2 次。

三、样本中蛋白质浓度计算

1、按液体体积计算：

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

=5÷(A标准管-A空白管)×(A测定管-A空白管)

2、按样本质量计算：

蛋白质（mg/g 质量）=C标准管÷(A标准管-A空白管)×(A测定管-A空白管) × V样总÷W

=5÷(A标准管-A空白管)×(A测定管-A空白管) ÷W

3、按细胞数量计算：

蛋白质（mg/ 10^4 cell）=C标准管÷(A标准管-A空白管)×(A测定管-A空白管) × V样总÷500

=0.01÷(A标准管-A空白管)×(A测定管-A空白管)

C标准管：5mg/mL；V样总：样本总体积，1mL；W：样本质量，g；500：细胞总数，500万。

注意事项：

1、 样本蛋白浓度须在0.25~ 12mg/mL范围内，低于0.25mg/mL不能用此法，高于12mg/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0.25~ 12mg/mL范围内。

2、 如果吸光值大于0.44，则需要将样本用蒸馏水稀释后再测定。

3、 待测样本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。

