双缩脲法蛋白质含量检测试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定，以确保蛋白浓度在 0.5-10mg/mL 范围内

测定意义：

双缩脲蛋白含量检测法是用于比色检测和总蛋白质定量的常用方法，具有操作简便、重复性好、试剂稳定等特点。

测定原理：

蛋白质能够在强碱性溶液中与双缩脲试剂形成紫色络合物，产物在 540 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值的变化即可定量检测蛋白的含量。

试剂组成和配制：

产品名称	PDM002-100T/96S	Storage
试剂一：液体	20mL	4℃避光
标准品：液体	1mL	-20℃
说明书	一份	

标准品：5mg/mL 的 BSA 标准液。

注：**提取液需自备**(根据试验要求可选用蒸馏水、生理盐水或不含蛋白的 PBS)，应不含硫酸铵、Tris 缓冲液，否则改用 BCA 法蛋白含量检测试剂盒(PDM005、PDM006)测定)

需自备仪器和用品：

酶标仪、电子天平、台式离心机、研钵、可调式移液器、96 孔板、蒸馏水。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利

可溶性蛋白提取：

1. 组织：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 1mL 提取液)进行冰浴匀浆，8000g，4℃，离心 10min 后取上清置于冰上待测。

2. 细菌和细胞：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)；8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

3. 液体样本：澄清无色液体样品可以直接或使用提取液适当稀释后再进行测定，悬浊液则需 8000g，4℃，离心 10min 取上清测定。

测定步骤：

酶标仪预热 30min 以上，

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	40		
标准品		40	
蒸馏水			40
试剂一	200	200	200
充分混匀，室温静置 15min，取 200μL 于 96 孔板中，测定 540nm 处吸光值，记为 A 测定、A 标准、A 空白。ΔA 测定=A 测定-A 空白，ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：标准管和空白管仅需测定 1-2 次。			

蛋白含量计算公式：

1.按组织样本质量计算：

蛋白质含量(mg/g 鲜重)=C 标准×(ΔA 测定÷ΔA 标准)×V 样总÷W×D =5×(ΔA 测定÷ΔA 标准)÷W×D

2.按细菌/细胞数量计算：

蛋白质含量(mg/10^4 cell)=C 标准×(ΔA 测定÷ΔA 标准)×V 样总÷500×D =5×(ΔA 测定÷ΔA 标准)÷500×D

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利

3.按液体样本体积计算

蛋白质含量(mg/mL)=C 标准×(ΔA 测定÷ΔA 标准)×D =5×(ΔA 测定÷ΔA 标准)×D

C 标准：BSA 标准品浓度，5mg/mL；V 样总：提取液总体积，1mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞数量，以万计；D：稀释倍数。

注意事项：

待测样本蛋白浓度须在 0.5-10 mg/mL 范围内，低于 0.5 mg/mL 或吸光值小于 0.08 则不能使用此法测定，高于 10mg/mL 或吸光值大于 0.29 应适当稀释后再进行测定，计算时相应修改。

实验实例：

称取 0.11g 新鲜牛肝，加入 1mL 0.9%生理盐水研磨匀浆，取上清，稀释 2 倍，按测定步骤操作，ΔA 测定=0.194-0.074=0.12，ΔA 标准=0.182-0.074=0.108，蛋白质含量（mg/g）=101.01mg/g。

常见问题及解决方案：

问题	可能原因	解决方法
样品读数重复性差	样品类型不合适	参考说明书了解不兼容的样品类型
	组织样品匀浆不充分	延长超声时间/增加匀浆器的研磨次数
	样品反复冻融次数过多	将样品分装，不可反复冻融
	样品中含有干扰物质	排查干扰物质
	样品读数超出线性范围	对样品进行浓缩或稀释，使读数处于线性范围内
	孔中有气泡	气泡会干扰读数，操作时尽量避免产生气泡，读数前务必去除气泡
样品和标准品读数偏低/偏高	样品放置时间过长或储存不当	使用新鲜制备的样品，按推荐温度保存至使用前
	试剂加样量错误	检查移液枪是否校准(始终使用能吸取整体积的最小量程移液枪)；尽量避免吸取过小体积的试剂
	配制反应混合液时移液误差	始终配制混合母液

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利