

双缩脲法蛋白含量检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

样品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。

测定原理：

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。该方法测定范围为 $1\sim 10\text{mg}$ 蛋白质，适用于蛋白质浓度高的样品，尤其是动物材料。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 $50\text{mL}\times 1$ 瓶， 4°C 保存。

标准品：液体 $1\text{mL}\times 1$ 瓶， 5 mg/mL ， 4°C 保存。

样品中可溶性蛋白质提取：

- 液体样品：**澄清无色液体样品可以直接测定。
- 组织样品：**按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 $1: 5\sim 10$ 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 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））
冰浴匀浆， 8000g ， 4°C 离心 10min ，取上清，即待测液。（动物样品常常需要稀释）
- 细菌、真菌：**按照细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 $500\sim 1000: 1$ 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°C ，离心 10min ，取上清置于冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 540 nm, 蒸馏水调零。
2. 空白管: 取 1 mL 玻璃比色皿, 加入 **200 μL 蒸馏水**, 1000 μL 试剂一, 混匀后室温静置 15 min, 于 540nm 比色, 记为 A 空白管。
3. 标准管: 取 1 mL 玻璃比色皿, 加入 **200 μL 标准液**, 1000 μL 试剂一, 混匀后室温静置 15 min, 于 540 nm 比色, 记为 A 标准管。
4. 测定管: 取 1 mL 玻璃比色皿, 加入 **200 μL 待测液**, 1000 μL 试剂一, 混匀后室温静置 15 min, 于 540nm 比色, 记为 A 测定管。

注意: 空白管和标准管只需测定一次。

样品中蛋白质浓度计算公式:

$$C \text{ 待测 (mg/mL)} = C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \\ = 5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

注意事项:

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、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。