双缩脲法蛋白含量测定试剂盒说明书
(分光法 48 样)

一、产品简介：

在碱性溶液中，凡分子中含二个或二个以上酰胺基(—CO-NH2)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(—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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 A	液体 22.5mL×1 瓶	4℃避光保存	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，4℃避光保存两周**。
试剂 B	液体 13.5mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、台式离心机、恒温水浴锅、移液器。

四、蛋白含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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、上机检测：

① 可见分光光度计预热 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：

试剂名称（μL）	测定管	标准管 （只做一次）	空白管 （只做一次）
样本	100		
标准品		100	
蒸馏水			100
反应 mix	900	900	900
混匀，于 37℃保温 10min，全部转移到 1mL 玻璃比色皿中，于 540nm 处测定吸光值 A，△A=A 测定-A 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×△A÷(A 标准-A 空白)÷W×D

2、蛋白含量(mg/mL)=C 标准×△A÷(A 标准-A 空白)×D
=10×△A÷(A 标准-A 空白)×D

3、蛋白含量(μg/10^4 cell))=(C 标准×V1)×△A÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×500)×D
=0.02×△A÷(A 标准-A 空白)×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：0.1mL；　　W---样本质量：g；
D---稀释倍数；　　500---细菌或细胞总数，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。