

总蛋白检测试剂盒(双缩脲微板法)

产品简介:

总蛋白(Total Protein, TP)由白蛋白和球蛋白组成, 对于生物体液(血清、尿液、脑脊液)中总蛋白质含量的测定, 一般要基于如下两个假设: 1、所有蛋白质分子由纯多肽组成, 含氮量的质量百分比为 16%; 2、体液中含有数百个蛋白质分子, 每个分子对测定反应都具有非常相似的特性, 目前常用的检测总蛋白的方法有: 双缩脲法、紫外分光光度法、染料结合法、凯氏定氮法、沉淀法等。

总蛋白检测试剂盒(双缩脲微板法)多用于人或动物血清、血浆、组织等样本中的总蛋白含量测定, 双缩脲反应的原理是在呈蓝色的碱性硫酸铜溶液存在的情况下, 肽键与铜离子结合, 生成蓝紫色的化合物, 此化合物在 540nm 的吸光度与肽键的数量呈正比例关系, 因此可计算出蛋白质的含量。双缩脲法测蛋白浓度兼容性亦很好, 不受大部分样本中其他成分的影响, 但易受铜离子螯合剂的影响, 另外对于血清总蛋白的双缩脲分析, 胆红素、脂类、血红蛋白、葡聚糖具有一定干扰作用, 双缩脲法在 5~160mg/ml 浓度范围内有较好的线性关系。该试剂盒仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称 \ 编号	BN27447	Storage
	120T	
试剂(A): 双缩脲试剂	25ml	4°C
试剂(B): 蛋白标准	40mg	RT
试剂(C): 蛋白标准配制液	2ml	RT
试剂(D): 双缩脲空白试剂(备选)	10ml	4°C
使用说明书	1 份	

自备材料:

- 1、待测样品(血清、血浆、组织)、生理盐水(0.9%NaCl)或 PBS
- 2、离心管或小试管、水浴锅或恒温箱、酶标仪、96 孔板、匀浆器或研钵

操作步骤(仅供参考):

- 1、取 0.25ml 蛋白标准配制液或稀释液加入到 40mg 蛋白标准中, 充分溶解后即配制成蛋白标准溶液(160mg/ml), 配制后可立即使用, 溶解后的蛋白标准溶液应-20°C保存; 亦可根据需要进行稀释, 如稀释至 40mg/ml; 特别提示: 待测蛋白溶解于什么样的稀释液中, 蛋白标准也宜溶解于什么样的稀释液中, 例如待测蛋白溶解于蔗糖溶液中, 亦取蛋白标准溶解于蔗糖溶液中, 常用 0.9%NaCl 或 PBS 作为总蛋白标准品的稀释液。
- 2、样本处理: 血清、血浆样本, 直接取 4 μ l 检测; 对于组织样本, 按组织质量(g): 生理盐水(ml)=1: 9 比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰浴下匀浆后 2500g 离心 10min, 取

上清液并补生理盐水至 10ml 待检。

- 3、TP 加样：按照下表设置空白管、标准管、测定管，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡；如果样品浓度过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置平行管。

加入物(μl)	空白孔	标准孔	测定孔
ddH ₂ O	4	—	—
蛋白标准溶液(如 40mg/ml)	—	4	—
待测样品	—	—	4
双缩脲试剂	200	200	200

注意：当遇到浑浊或溶血样本时，可设“样本空白管”：取 0.04ml 待测样品加入 2ml 双缩脲空白试剂即为“样本空白管”，以双缩脲空白试剂调零，读取“样本空白管”的吸光度，用测定管的吸光度减去“样本空白管”的吸光度后的净吸光度，计算总蛋白浓度。

- 4、TP 测定：混匀，37℃孵育 10min，用酶标仪测定 540nm 处各孔的吸光度，记为 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ ，如无 540nm，510 ~ 562nm 之间的波长也可，以空白孔调零。

计算：

血清、血浆样本总蛋白浓度(g/L) = $A_{\text{测定}} / A_{\text{标准}} \times C$

浑浊或溶血样本总蛋白浓度(g/L) = $(A_{\text{测定}} - A_{\text{样本空白}}) / A_{\text{标准}} \times C$

100g 组织样本总蛋白含量(g/100g) = $A_{\text{测定}} / A_{\text{标准}} \times C \times V_T \times 100 / m$

式中： $A_{\text{测定}}$ = 测定管的吸光度

$A_{\text{标准}}$ = 标准管的吸光度

$A_{\text{样本空白}}$ = 样本空白管的吸光度

C = 蛋白标准液浓度(mg/ml = g/L)

V_T = 组织样本上清液总体积 = 10ml

m = 组织样本的质量(g)

100 = 100g 组织样本的质量

参考区间：

健康成人走动后血清总蛋白浓度为 64~83g/L

健康成人静卧时血清总蛋白浓度为 60~78g/L

注意事项：

- 1、蛋白标准粉末溶解于蛋白标准配制液后，即获得蛋白标准原液，该原液中含有防腐剂，不影响后续检测，该蛋白标准原液-20℃长期保存。
- 2、待测蛋白和蛋白标准加入双缩脲试剂后，如果发现检测效果不佳，可以室温放置 1h 或 60℃放置 15min，颜色会随着时间的延长不断加深。
- 3、测定标准曲线时发现随着标准品浓度的增加吸光度或颜色没有明显变化，可能的原因

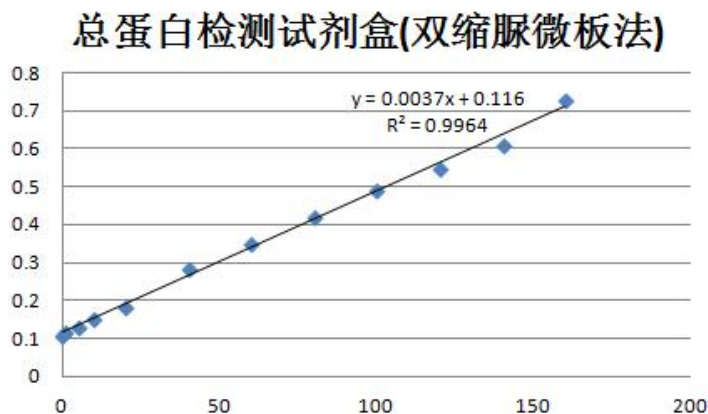
是样品中含有铜离子螯合剂。

- 4、蛋白浓度低于 20mg/ml 时，颜色反应呈不明显的蓝色；当大于 40mg/ml 时，即可呈现明显的蓝紫色反应。
- 5、该试剂盒的线性范围是 5~160 mg/ml，样品蛋白浓度应大于 1mg/ml，以 20mg/ml 以上为宜；如需测定低浓度蛋白样品(1mg/ml)，请选用 BCA 蛋白定量试剂盒或微量 BCA 蛋白定量试剂盒。
- 6、该试剂盒反应生成的蓝紫色的化合物的吸光度，与试剂批次、pH 值、反应温度有关，因此建议每次测定都做标准对照。
- 7、氨基酸和二肽不发生双缩脲反应，三肽、寡肽和多肽与铜离子的双缩脲复合物，呈粉红色-紫红色，与蛋白质的双缩脲反应结果不同。
- 8、如果没酶标仪也可以使用分光光度计测定，使用分光光度计测定蛋白浓度时，每个试剂盒可以测定的样品数量会显著减少。
- 9、检测中发现所有孔都呈暗紫色，可能原因是样品含有还原剂，应适当透析或稀释样品。
- 10、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：12 个月有效；室温运输，按要求保存。

附参考标准曲线范围：

用酶标仪测定蛋白质标准 1、5、10、20、40、60、80、100、120、140、160mg/ml 在 540nm 的吸光度(未调零)，空白调零后 40mg/ml 的吸光度为 0.15~0.18，据此做出其标准曲线如下：



测定结果显示，1mg/ml 的吸光度比较低，与空白管接近，因此建议测定样品浓度应大于 1mg/ml，以 20mg/ml 以上为宜；如需测定低浓度蛋白样品(1mg/ml)，请选用 BCA 蛋白定量试剂盒或微量 BCA 蛋白定量试剂盒。