

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K165-M

产品规格: 96 T(80 samples) / 500 assays

检测仪器: 酶标仪 (520-580 nm)

Elabscience®总蛋白 (TP) 比色法测试盒(双缩脲法)

Biuret Protein Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、动植物组织样本中的蛋白含量。

检测原理

凡分子中含有两个氨基甲酰基(-CONH₂)的化合物都能与碱性铜溶液作用，形成紫色复合物，这一反应称为双缩脲反应，蛋白质分子中有许多肽键(-CONH-)都能起此反应，各种蛋白显色程度基本相同。

测定样本总蛋白浓度：样本背景值较高时，推荐使用考马斯亮蓝法（货号：E-BC-K168-S）；样本蛋白浓度较低时，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1) (96 T)	规格 2 (Size 2) (500 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	铜试剂 (Copper Reagent)	粉剂×1 瓶	粉剂×5 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	碱试剂 (Alkali)	粉剂×1 瓶	粉剂×5 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	100 g/L 蛋白标准品 (100 g/L Protein Standard)	1 mL×1 支	1 mL×5 支	-20℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪（520-580 nm，最佳检测波长 540 nm）

试剂：双蒸水、生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）

试剂准备

① 试剂三从-20℃取出，放在冰上缓慢融化（避免反复冻融），其他试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液的配制：

取一瓶试剂一用10 mL双蒸水溶解，2-8℃保存3个月。

③ 试剂二工作液的配制：

取一瓶试剂二用20 mL双蒸水溶解，2-8℃保存3个月。

④ 双缩脲工作液的配制：

按试剂一工作液：试剂二工作液为1:2的体积比混匀，配好工作液可在2-8℃下保存1天。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(g/L)	0	10	20	40	50	60	80	100
100 g/L 标准品(μL)	0	10	20	40	50	60	80	100
生理盐水或 PBS (μL)	100	90	80	60	50	40	20	0

样本准备

① 样本处理

血清血浆等液体样本：可直接测定。

组织样本：匀浆介质是 PBS (0.01 M, pH 7.4) 或生理盐水 (0.9% NaCl)，匀浆离心后取上清进行测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择预期差异大的2-3个样本，稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.58-100 g/L，不同样本稀释比例如下表(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	人血浆	不稀释
大鼠血清	2-4	小鼠血浆	不稀释
兔血清	不稀释	鸡血浆	不稀释
马血清	1-3	猪血清	1-3
狗血清	2-4	10%大鼠脾脏组织	不稀释
10%小鼠肝组织	不稀释	10%小鼠肾组织	不稀释

注：稀释液为生理盐水 (0.9% NaCl) 或 PBS (0.01 M, pH 7.4)。

操作步骤

- ① 标准孔：取 7 μL 不同浓度的蛋白标准品，加入到酶标板对应的标准孔中；
测定孔：取 7 μL 的待测样本，加入到酶标板对应的测定孔中。
- ② 向步骤①中的各孔加入 250 μL 双缩脲工作液。
- ③ 酶标仪振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 准确孵育 10 min。
- ④ 酶标仪 540 nm 处，测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的蛋白标准品(μL)	7	--
待测样本(μL)	--	7
双缩脲工作液(μL)	250	250
酶标仪振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 准确孵育 10 min，540 nm 处测定各孔 OD 值。		

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

血清、血浆、组织匀浆等液体样本中总蛋白含量计算公式：

$$\text{总蛋白浓度 (g/L)} = (\Delta A_{540} - b) \div a \times f$$

注解：

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：吸光度对应的浓度

a：标准曲线斜率

b：标准曲线截距

ΔA_{540} ：样本测定 OD 值-空白 OD 值

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

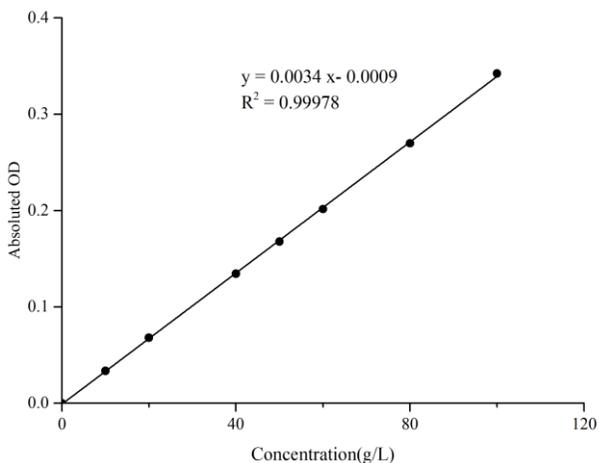
检测范围	0.58-100 g/L	平均批间差	6.5 %
灵敏度	0.58 g/L	平均批内差	4.0 %
平均回收率	98 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量7 μL，按照操作步骤进行实验，读取各点OD值如下表所示：

标准品浓度 (g/L)	0	10	20	40	50	60	80	100
OD 值	0.122	0.155	0.189	0.255	0.289	0.323	0.391	0.463
	0.122	0.156	0.191	0.257	0.290	0.324	0.393	0.465
平均 OD 值	0.122	0.156	0.190	0.256	0.290	0.324	0.392	0.464
绝对 OD 值	0.000	0.034	0.068	0.134	0.168	0.202	0.270	0.342

②制标准曲线，如下图所示：



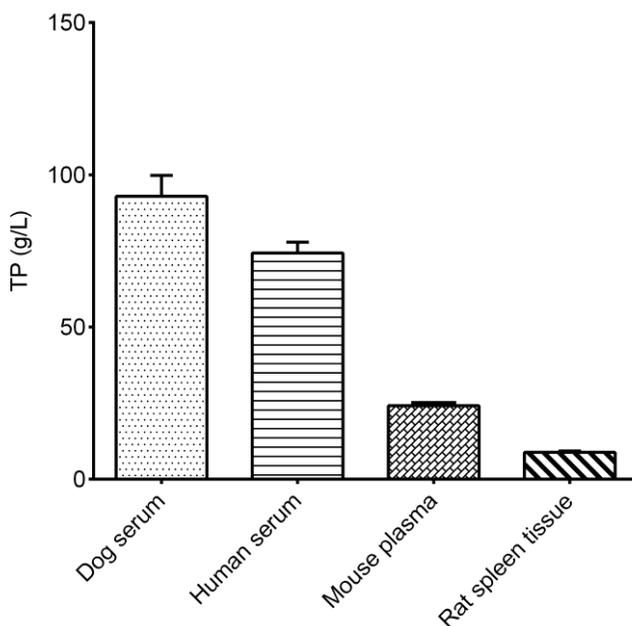
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

取7 μL 的人血清,按操作表检测,结果如下:总蛋白的标准曲线: $y = 0.0052x - 0.0057$, 测定孔平均OD值为0.497, 空白OD值为0.121, 计算结果为:

$$\text{蛋白浓度 (g/L)} = (0.497 - 0.121 + 0.0057) \div 0.0052 = 73.40 \text{ g/L}$$

按照说明书,测定狗血清(稀释3倍,加样量7 μL)、人血清(加样量7 μL)、小鼠血浆(加样量7 μL)和大鼠脾脏组织(10%组织匀浆,加样量7 μL)中的总蛋白含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测值不稳定, 复孔差异大	样本加入时, 未触板底加入	触板底加入样本
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数, 重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本, 重新检测
样本测量结果 >100 g/L	样本浓度太高	选择合适稀释倍数, 重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用, 如将其用于临床诊断或任何其他用途, 我公司将不对因此产生的问题负责, 亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器, 严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责, 不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责, 使用前请充分考虑样本可能的使用量, 预留充足的样本。