

## 考马斯亮蓝法测蛋白含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

**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：**

在酸性溶液中，考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质结合形成蓝色复合物；该复合物在 620nm 处有最大吸收峰，其颜色的深浅与蛋白质的浓度成正比。该方法灵敏度高，适合微量蛋白质分析。

**自备仪器和用品：**

离心机、酶标仪、96 孔板、移液器和蒸馏水。

**试剂组成和配制：**

试剂一：液体 11 mL×1 瓶，4℃ 保存。

**样品中可溶性蛋白质提取：**

1. 液体样品：澄清液体样品可以直接测定。
2. 组织样品：按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：20 的比例（建议称取约 0.05 g 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℃离心 10min，取上清，即待测液。（动物样品常常需要稀释）
3. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10<sup>4</sup> 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）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

**测定操作：**

1. 酶标仪预热 30 min。
2. 在 96 孔板中加入：

试剂 (μL)	测定管	空白管
样本	100	
蒸馏水		100
试剂一	100	100
混匀后，测定波长 620 nm 吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

**注意：**

- 1、空白管只需要测定一次。
- 2、测定管的待测样品蛋白质浓度要控制在 1-100 μg/mL 范围内，尽量控制在中间范围。
- 3、测定管若出现浑浊或分层现象，就说明蛋白含量较高，通常须将待测液用提取液稀释 10~20 倍后重新检测。

**计算公式：**

标准曲线： $y = 7.1265x - 0.0007$ ； $R^2 = 0.9997$ ；x：蛋白标准品浓度(mg/mL；线性范围为 0.001~0.1mg/mL)；y：吸光值差值

$$1. \text{按液体样本体积计算：} C_{pr} (\text{mg/mL}) = (\Delta A + 0.0007) \div 7.1265 \\ = 0.1403 \times (\Delta A + 0.0007)$$

$$2. \text{按组织样本质量计算：} C_{pr} (\text{mg/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0007) \div 7.1265 \times V_{\text{总}} \div W \\ = 0.1403 \times (\Delta A + 0.0007) \div W$$

V 总：提取液体积，1 mL；W：样本质量，g。