

考马斯亮蓝法测蛋白含量试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介：

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；经光谱扫描，该蓝色复合物在 600nm 处有最大吸收峰，在一定的蛋白浓度范围（1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）内，其颜色的深浅与蛋白质的含量成正比。

二、测试盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 40mL \times 1 瓶	4 $^{\circ}\text{C}$ 保存	
标准品	液体 1mL \times 1 支	4 $^{\circ}\text{C}$ 保存	若重新做标曲，则用到该试剂

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）、离心机、可调式移液器、研钵。

四、蛋白含量检测：

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（提取液可选用酶提取缓冲液、蒸馏水、生理盐水）冰浴匀浆，12000rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min，取上清，即待测液。

【注】：依据研究经验，一般需将样本粗提液稀释到适当倍数再进行测定，如 10 倍。实验前可以先选 2 个样本测定，摸索确定适合本次实验的稀释倍数。

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 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：依据研究经验，一般需将样本粗提液稀释到适当倍数再进行测定，如 10 倍。实验前可以先选 2 个样本测定，摸索确定适合本次实验的稀释倍数。

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。

【注】：依据研究经验，一般需将样本稀释到适当倍数再进行测定，如 10 倍。实验前可以先选 2 个样本测定，摸索确定适合本次实验的稀释倍数。

2、上机检测：

① 分光光度计预热 30 min 以上，设定波长为 600nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

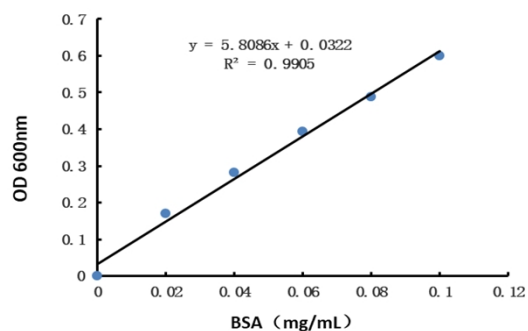
试剂名称 (μL)	测定管	空白管(只做一次)
待测液	160	
蒸馏水		160
试剂一	800	800
混匀，置于室温（25 $^{\circ}\text{C}$ ）静置 10min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，600nm 处测定吸光值 A（5~15min 完成比色）， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

【注】：1. 确保蛋白浓度在 0~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内，否则需要做相应稀释，即 ΔA 差值低于 0.5；稀释倍数 D 带入公式计算。

2. 去污剂、Triton X-100、十二烷基硫酸钠（SDS）和 0.1mol/L 的 NaOH 溶液对该实验会有影响。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 5.8086x + 0.0322$ ； x 是标准品浓度（mg/mL）， y 是 ΔA 。



2、蛋白含量(mg/g 鲜重)=[$(\Delta A - 0.0322) \div 5.8086 \times V1$] $\div (W \times V1 \div V) \times D$
=0.172 $\times (\Delta A - 0.0322) \times D \div W$

3、蛋白含量(mg/mL)=[$(\Delta A - 0.0322) \div 5.8086 \times V1$] $\div V1 \times D = 0.172 \times (\Delta A - 0.0322) \times D$

V---提取液体积：1mL；

V1---加入粗提液体积：0.16mL；

W---样本质量：g；

D---稀释倍数，未稀释即为1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品母液（0.5mg/mL）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1. mg/mL。
也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。