

# 考马斯亮蓝法测蛋白含量试剂盒说明书

(微板法 96 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 20mL $\times$ 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:

酶标仪、96 孔板、离心机、可调式移液器、研钵和蒸馏水。

## 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 酶标仪预热 30 min 以上,设定波长为 600nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

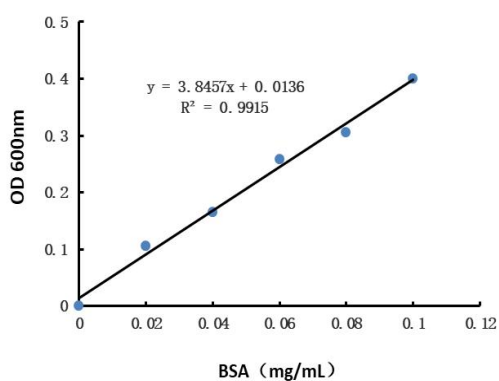
试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	空白管(只做一次)
待测液	40	
蒸馏水		40
试剂一	200	200
混匀,置于室温(25 $^{\circ}\text{C}$ )静置 10min,600nm 处测定吸光值 A (5~15min 完成比色), $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

**【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 $\Delta A$  差值低于 0.3;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： $y = 3.8457x + 0.0136$ ； $x$  是标准品浓度（mg/mL）， $y$  是 $\Delta A$ 。



2、蛋白含量(mg/g 鲜重)=[ $(\Delta A - 0.0136) \div 3.8457 \times V1$ ]  $\div$  ( $W \times V1 \div V$ )  $\times D$   
 $= 0.26 \times (\Delta A - 0.0136) \times D \div W$

3、蛋白含量(mg/mL)=[ $(\Delta A - 0.0136) \div 3.8457 \times V1$ ]  $\div V1 \times D = 0.26 \times (\Delta A - 0.0136) \times D$

V---提取液体积：1mL；

V1---加入粗提液体积：0.04mL；

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。