

考马斯亮蓝法测蛋白含量试剂盒说明书

(货号: BP10367F 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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 μ g/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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 45mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}$ C 避光保存	
标准品	液体 1mL $\times$ 1 支	4 $^{\circ}$ C 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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、检测步骤:

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:

试剂组分 (μ L)	测定管	空白管(只做一次)
待测液	160	
蒸馏水		160
试剂一	800	800

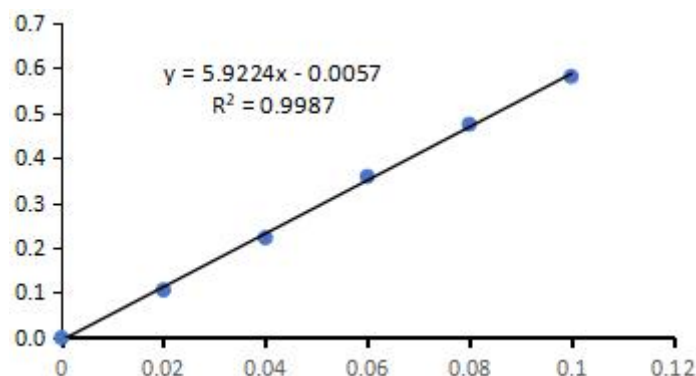
混匀，置于室温（25℃）静置 10min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，600nm 处测定吸光值 A（5~15min 完成比色）， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

【注】：1. 确保蛋白浓度在 0~100 $\mu\text{g/ml}$ 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： $y = 5.9224x - 0.0057$ ；x 是标准品浓度（mg/mL），y 是 ΔA 。



2、蛋白含量(mg/g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.0057) \div 5.9224 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D$

$$= 0.169 \times (\Delta A + 0.0057) \times D \div W$$

3、蛋白含量(mg/mL) = $[(\Delta A + 0.0057) \div 5.9224 \times V1] \div V1 \times D = 0.169 \times (\Delta A + 0.0057) \times D$

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 标准品母液浓度为 0.5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200uL，加入 800uL 蒸馏水，混匀得到 0.1mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称（ μL ）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	160	
蒸馏水		160
试剂一	800	800
混匀，置于室温（25℃）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），
 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{浓度管}}$ 。