

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°C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°C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（10⁴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°C，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：空白管只需要测定一次。

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)

y: 吸光值差值

1.按液体样本体积计算:

$$\text{Cpr (mg/mL)} = (\Delta A + 0.0007) \div 7.1265$$

$$= 0.1403 \times (\Delta A + 0.0007)$$

2.按组织样本质量计算:

$$\text{Cpr (mg/g)} = (\Delta A + 0.0007) \div 7.1265 \times V_{\text{总}} \div W$$

$$= 0.1403 \times (\Delta A + 0.0007) \div W$$

V_总: 提取液体积, 1 mL; W: 样本质量, g。

www.affandi-e.com