

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

考马斯亮蓝法测蛋白含量测定试剂盒说明书 微量法

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。

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体25mL×1 瓶	4℃保存	-
标准品	500 μg/mL×1 瓶	4℃保存	临用前用蒸馏水稀释为50 μg/mL

产品说明：

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。

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595nm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：

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、移液器和蒸馏水。

操作步骤：

一、样品中可溶性蛋白质提取

1. 液体样品：澄清无色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 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 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，10000rpm，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 (10^4 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 s，间隔 7s，总时间 3min）；然后 10000rpm，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

二、吸光值测定

1. 分光光度计预热 30 min 以上，蒸馏水调零。
2. 空白管：取 0.5 mL EP管，加入 40 μL 蒸馏水，250 μL 试剂一，混匀后室温静置 10min，取 200 μL 于微量玻璃比色皿/96孔板，595nm 比色，10~20min 完成比色，记为 A 空白管。
3. 标准管：取 0.5 mL EP管，加入 40 μL 标准液，250 μL 试剂一，混匀后室温静置 10min，取 200 μL 于微量玻璃比色皿/96孔板，595nm 比色，10~20min 完成比色，记为 A 标准管。
4. 测定管：取 0.5 mL EP管，加入 40 μL 待测液，250 μL 试剂一，混匀后室温静置 10min，取 200 μL 于微量玻璃比色皿/96孔板，595nm 比色，10~20min 完成比色，记为 A 测定管。

三、蛋白质含量:

C 待测 ($\mu\text{g/mL}$) = $50 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$

C 标准管: 标准品蛋白质浓度, $50 \mu\text{g/mL}$ 。

注意事项:

1. 加考马斯亮蓝后, 在10~20min 内吸光值相对较稳定, 因此须在10~20min 完成比色。
2. 不宜用石英比色皿, 可用玻璃或塑料比色皿, 测完成后立即用95%乙醇冲洗。
3. 测定前用1~2 个样做预实验, 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。