

考马斯亮蓝法测蛋白含量试剂盒说明书

(货号: G0417F 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。

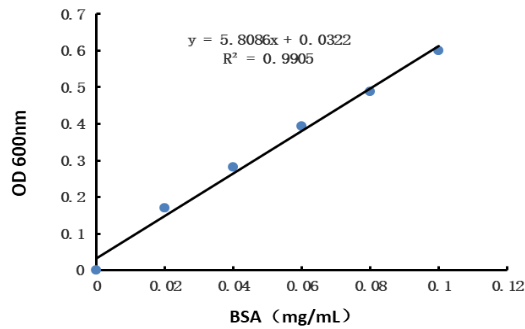
② 在 EP 管中依次加入:

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),
 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

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。