

考马斯亮蓝法测蛋白含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50管/48样

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、分光光度计、石英比色皿、移液器和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 30 mL×1 瓶，4℃ 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℃ 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 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min，蒸馏水调零。
2. 在石英比色皿中加入：

试剂（ μ L）	测定管	空白管
样本	500	
蒸馏水		500
试剂一	500	500

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： $y = 14.253x - 0.0007$ $R^2 = 0.9997$ 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：

$$\begin{aligned} \text{Cpr (mg/mL)} &= (\Delta A + 0.0007) \div 14.253 \\ &= 0.07 \times (\Delta A + 0.0007) \end{aligned}$$

2. 按组织样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{Cpr (mg/g)} &= (\Delta A + 0.0007) \div 14.253 \times V_{\text{总}} \div W \\ &= 0.07 \times (\Delta A + 0.0007) \div W \end{aligned}$$

V_总: 提取液体积, 1 mL; W: 样本质量, g。