

## 考马斯亮蓝法测蛋白含量试剂盒说明书

(货号: ADS-W-SP001-48 微板法 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 $\mu$ 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 10mL $\times$ 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;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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 酶标仪预热 30 min 以上, 设定波长为 600nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

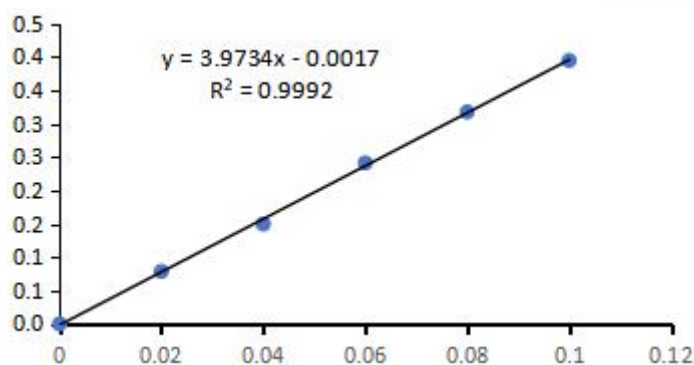
| 试剂组分 ( $\mu$ L) | 测定管 | 空白管(只做一次) |
|-----------------|-----|-----------|
| 待测液             | 40  |           |
| 蒸馏水             |     | 40        |
| 试剂一             | 200 | 200       |

混匀，置于室温（25℃）静置 10min，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 0~100μg/ml 范围内，否则需要做相应稀释，即 $\Delta A$  差值低于 0.3；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： $y = 3.9734x - 0.0017$ ；x 是标准品浓度（mg/mL），y 是 $\Delta A$ 。



- 2、蛋白含量(mg/g 鲜重)=[ $(\Delta A + 0.0017) \div 3.9734 \times V_1$ ] $\div (W \times V_1 \div V) \times D$   
=0.252 $\times (\Delta A + 0.0017) \times D \div W$

- 3、蛋白含量(mg/mL)=[ $(\Delta A + 0.0017) \div 3.9734 \times V_1$ ] $\div V_1 \times D = 0.252 \times (\Delta A + 0.0017) \times D$

V---提取液体积：1mL；

V<sub>1</sub>---加入粗提液体积：0.04mL；

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：

- 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。
- 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<br>mg/mL                                      | 0   | 0.02 | 0.04 | 0.06 | 0.08 | 0.1 |
| 标品稀释液<br>uL                                        | 0   | 40   | 80   | 120  | 160  | 200 |
| 水 uL                                               | 200 | 160  | 120  | 80   | 40   | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                          |     |      |      |      |      |     |

- 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                                                                                                 | 40  |             |
| 蒸馏水                                                                                                |     | 40          |
| 试剂一                                                                                                | 200 | 200         |
| 混匀，置于室温（25℃）静置 10min，600nm 处测定吸光值 A（5~15min 完成比色）， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。 |     |             |

