

## 考马斯亮蓝法蛋白含量检测试剂盒（分光光度法）

**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。**

### 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。

### 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。

## 测定步骤表:

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 (μL)	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:

- 1、空白管只需要测定一次。
- 2、测定管的待测样品蛋白质浓度要控制在 1-100μg/mL 范围内, 尽量控制在中间范围。
- 3、测定管若出现浑浊或分层现象, 就说明蛋白含量较高, 通常须将待测液用提取液稀释 10~20 倍后重新检测。

## 计算公式:

a 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。