

蛋白定量 (TP) 测定试剂盒说明书

(货号: A045-2 考马斯亮蓝法 分光光度计比色法)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

C 标准: 标准液浓度,0.524g/L(具体浓度见标签);**N:** 样本测试前稀释倍数。

一、测定原理:

蛋白质分子具有-NH₃⁺基团,当棕红色的考马斯亮蓝显色剂加入蛋白标准液或样品中时,考马斯亮蓝染料上的阴离子与蛋白-NH₃⁺结合,使溶液变为蓝色,通过测定吸光值可计算出蛋白含量。本法测定的是可溶性的蛋白浓度。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

	组 分	50 管/48 样 (A045-2-1)	100 管/96 样 (A045-2-2)	保 存
试剂一	考马斯亮蓝贮备液	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶	4℃
	用时按考马斯亮蓝贮备液:蒸馏水=1:4 的比例(即 5 倍稀释)配制成考马斯亮蓝显色液,用多少配多少,现用现配。			
试剂二	蛋白标准液 (浓度见标签)	0.5mL×1 支	0.5mL×1 支	短期 4℃ 长期 -20℃

注: 试剂二运输时不在纸质试剂盒内,而是在白色泡沫盒(冰盒)中,用户收到时请仔细检查货品是否完全。

三、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿(或酶标仪(595nm)及 96 孔板),涡旋混匀器,蒸馏水,生理盐水(或 PBS)。

四、操作步骤:

1、样本前处理:

①、**组织样本:** 准确称取待测组织的重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质(推荐 0.01mol/L 且 pH 值为 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液或 0.9% 的生理盐水),冰水浴条件机械匀浆,2500 转/分,离心 10 分钟,取上清液(10%匀浆上清)待测。(不同样本匀浆上清测定时最适浓度不同,可挑选 2 例匀浆上清分别稀释一定倍数后按操作表测定,选择测定管吸光值接近标准管吸光值时对应的样本浓度作正式实验)

注: 匀浆介质不局限于上述所列的生理盐水和磷酸盐缓冲液,其它的提取液(原则上不干扰试剂反应的都可以)制作的匀浆液也可以用本法进行检测。若是蛋白用于其它指标的计算,则样本无需再进行前处理,直接使用该指标预处理制备的匀浆上清检测即可。

②、**血清(浆)样本:** 血清(浆)可用生理盐水按血清:生理盐水=1:49 稀释,待测。

③、**其它体液样本:** 按比例稀释,总的来说,测定范围为 0.1~1.3g/L (mg/mL)为宜,(不同的样本稀释度存在差异),请在批量测试前先做 1~2 个样本的预试。

2、操作表:

	空白管	标准管	测定管
蒸馏水 (mL)	0.05		
蛋白标准液 (mL)		0.05	
样品 (mL)			0.05
考马斯亮蓝显色液 (mL)	3.0	3.0	3.0

混匀,静置 10 分钟,于 595nm 处,1cm 光径,蒸馏水调零,分光光度计测各管吸光值 A(或每管取 200μL 到 96 孔板中,酶标仪 595nm 处读数)

(如果您的样本量很少,可以将上述所有试剂及样本量均减半)

五、计算公式及举例:

1、计算公式:

$$\text{待测样本蛋白浓度 (g/L)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

六、注意点:

- 1、本法测定蛋白快速、准确,尤其适用于动物组织匀浆、血清(浆)样本。
- 2、此法灵敏度高,所以样本蛋白浓度必须稀释至 1.3g/L(最好是 1g/L)以下,在此范围内呈线性关系。
- 3、考马斯亮蓝法测定动物组织蛋白时组织匀浆的浓度一般为 0.5%~2%。
- 4、蛋白浓度高(50g/L 以上)的样品需进行稀释或者可用本公司双缩脲试剂进行测定,双缩脲测试范围为 10~80g/L (mg/mL)。
- 5、标准液浓度不同此次可能有差异,具体浓度见标签。
- 6、本法所测为可溶性的蛋白浓度。