

蛋白定量（TP）测定试剂盒说明书

（货号：A045-2-3 考马斯亮蓝法 微板法 96T）

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！

一、测定原理：

蛋白质分子具有 $-\text{NH}_3^+$ 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 $-\text{NH}_3^+$ 结合，使溶液变为蓝色，通过测定吸光度可计算出蛋白含量。

二、试剂及配制：（试剂盒有效期 6 个月）

试剂一：考马斯亮蓝贮备液：5mL×1 瓶，4℃保存。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 0.1mL×1 支（浓度见标签），4℃可保存 1 个月（如要延长保存时间，请将标准液分装后-20℃冷冻可保存 6 个月）。

附送 96 孔平底透明酶标板一块。

三、所需仪器及试剂：

酶标仪（595nm）及 96 孔板（附送一块），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 0.1mol/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。（注：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 OD 值接近标准 OD 值时的样本浓度；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）一样可以检测）

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 0.1～1.0g/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：

	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水（μL）	5		
蛋白标准液（μL）		5	
样品（μL）			5
考马斯亮蓝显色液（μL）	250	250	250

轻轻振荡孔板混匀，室温静置 10 分钟，酶标仪 595nm 处读取各孔吸光值 A

（上表各试剂体积可按需要量同时增大或缩小，计算公式不变）

五、计算公式：

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

$C_{\text{标准}}$ ：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。

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样本。
- 2、此法灵敏度高，所以样本蛋白浓度必须稀释至 1.0g/L（1.0mg/mL）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（20g/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。