**总蛋白（TP）定量试剂盒(考马斯亮蓝法)说明书**（货号：PYB2056,规格:96T）

1. **实验原理：**

|  |
| --- |
| 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，通过测定吸光度可计算出蛋白含量。 |

1. **组份**：（100管/96样）

试剂一：考马斯亮蓝贮备液，60mL×1瓶，4℃保存6个月。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0.5mL×1支（浓度见标签），4℃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）。

所需仪器耗材及试剂：

含595nm波长的分光光度计及1cm光径比色皿（或酶标仪及96 孔板）、台式低速离心机、烧杯及玻璃棒（配试剂用）、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水（0.9%）或PBS（0.1M）、涡旋混匀器、试管或离心管。

1. **实验步骤：**

**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，可按需要将匀浆上清稀释后测定，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0.1～1.3g/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。

操作表：

A测定-A空白

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 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，测各管OD值 |

计算公式：待测样本蛋白浓度（g/l）= ×C标准×N

A标准-A空白

|  |
| --- |
| 注意事项：1.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（1.3mg/mL）以下，在此范围内呈线性关系。 3．考马斯亮兰法测定动物组织蛋白时组织匀浆的浓度一般为0.5%～2%。 4．蛋白浓度高的样品需进行稀释或者请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。 |