

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

**产品货号：E-BC-K168-M**

**产品规格：96 T(80 samples) / 500 assays**

**检测仪器：酶标仪 (550-630 nm)**

## **Elabscience<sup>®</sup>总蛋白(TP)比色法测试盒(考马斯亮蓝法)**

### **Bradford Protein Colorimetric Assay Kit**

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：[biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址：[www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、动物组织、细胞样本中的总蛋白含量。

## 检测原理

考马斯亮蓝 G-250(Coomassie brilliant blue G-250)在游离状态下呈红色，最大光吸收在 465nm；当它与蛋白质结合后变为青色，蛋白质-色素结合物在 595 nm 波长下有最大光吸收。其颜色的深浅与蛋白质含量呈正比。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1) (96 T)	规格 2 (Size 2) (500 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	显色剂储备液 (Chromogenic Agent Stock Solution)	6 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	1 mg 标准品 (1 mg Standard)	1 mg×2 支	1 mg×5 支	室温保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

仪器：酶标仪(550 nm-630 nm, 最佳检测波长为 595 nm)

试剂：双蒸水、生理盐水 (0.9% NaCl) 或 PBS (0.01 M, pH 7.4)

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 显色剂工作液的配制：

按试剂一：双蒸水为1：4的体积比混匀，可2-8℃避光保存7天。

③ 标准品的配制：

每支试剂二，加入1 mL生理盐水，溶解混匀，即可。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mg/mL)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
1 mg/mL 标准品( $\mu$ L)	0	5	10	20	30	40	50	60
生理盐水( $\mu$ L)	100	95	90	80	70	60	50	40

## 样本准备

### ① 样本处理

血清血浆等液体样本：可直接测定。

组织样本：匀浆介质是 PBS (0.01 M, pH 7.4) 或生理盐水 (0.9% NaCl)，匀浆离心后取上清进行测定。

细胞样本：取  $1 \times 10^6$  细胞加入 300-500  $\mu\text{L}$  PBS (0.01 M, pH 7.4) 或生理盐水 (0.9% NaCl) 进行匀浆。匀浆后， $4^\circ\text{C}$ ， $10000 \times g$  离心 10 min，取上清置于冰上待测。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择预期差异大的2-3个样本，稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.046-0.6 mg/mL，不同样本稀释比例如下表(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	90-110	10%小鼠肾组织匀浆	15-20
人血浆	90-110	10%小鼠肺组织匀浆	15-20
兔血清	90-110	10%大鼠脾组织匀浆	15-20
大鼠血浆	90-110	10%大鼠心组织匀浆	15-20
鸡血清	90-110	10%大鼠肝组织匀浆	20-25
293T	不稀释	HL-60	不稀释

注：稀释液为生理盐水 (0.9% NaCl) 或 PBS (0.01 M, pH 7.4)。

## 操作步骤

- ① 标准孔：取 10  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准液，加入到对应的标准孔中。  
样本孔：取 10  $\mu\text{L}$  样本，加入到对应的样本孔中。
- ② 向步骤①标准孔、样本孔加入 250  $\mu\text{L}$  显色剂工作液。
- ③ 酶标仪上振荡 10 s，室温静置 10 min，595 nm，测各孔的 OD 值。

## 操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液( $\mu\text{L}$ )	10	--
待测样本( $\mu\text{L}$ )	--	10
显色剂工作液( $\mu\text{L}$ )	250	250
酶标仪上振荡 10 s，室温静置 10 min，595 nm，酶标仪测各管 OD 值。		

## 结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

血清(浆)、动物组织总蛋白(TP)浓度计算公式：

$$\text{总蛋白(TP)含量} = (\Delta A_{595} - b) \div a \times f$$

(mg/mL)

注解：

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：吸光度对应的浓度

a：标曲斜率

b：截距

$\Delta A_{595}$ ：样本 OD 值-空白 OD 值(标准浓度为 0 时的 OD 值)

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

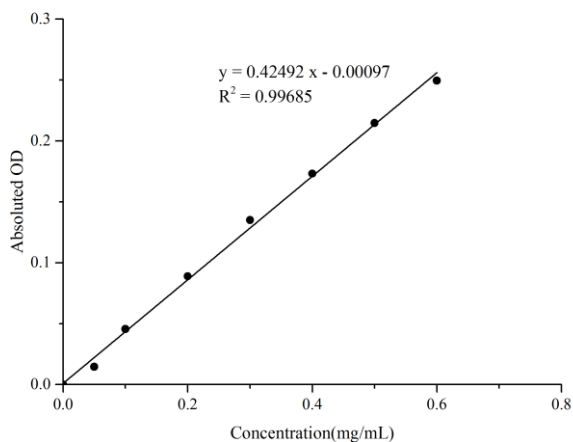
检测范围	0.046-0.6 mg/mL	平均批间差	8.2 %
灵敏度	0.046 mg/mL	平均批内差	3.2 %
平均回收率	104 %		

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量10  $\mu$ L，按照操作步骤进行实验，读取各点OD值如下表所示：

标准品浓度 (mg/mL)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
OD 值	0.320	0.337	0.358	0.405	0.452	0.502	0.528	0.568
	0.321	0.332	0.373	0.413	0.458	0.484	0.542	0.571
平均 OD 值	0.320	0.335	0.366	0.409	0.455	0.493	0.535	0.569
绝对 OD 值	0.000	0.015	0.046	0.089	0.135	0.173	0.215	0.249

② 制标准曲线，如下图示：



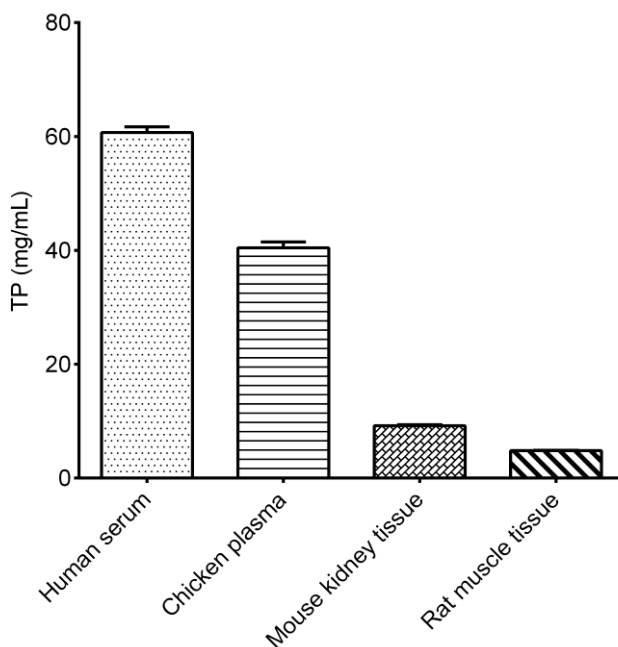
## 附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

用生理盐水(0.9% NaCl)将人血清稀释100倍, 取10  $\mu\text{L}$ 人血清。按操作表操作, 标准曲线:  $y = 0.3727x + 0.0043$ , 测定孔平均OD值为0.550, 空白孔平均OD值为0.319, 计算结果为:

$$\text{总蛋白(TP)含量} = (0.550 - 0.319 - 0.0043) \div 0.3727 \times 100 = 60.83 \text{ mg/mL} \\ (\text{mg/mL})$$

按照操作过程, 测定人血清(稀释100倍, 加样量10  $\mu\text{L}$ )、鸡血浆(稀释100倍, 加样量10  $\mu\text{L}$ )、小鼠肾(10%组织匀浆, 稀释20倍, 加样量10  $\mu\text{L}$ )和大鼠肌肉(10%组织匀浆, 稀释20倍, 加样量10  $\mu\text{L}$ )中总蛋白含量(如下图):



### 附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测值不稳定，复孔差异大	样本加入时，未触板底加入	触板底加入样本
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
样本测量结果 > 0.6 mg/mL	样本浓度太高	选择合适稀释倍数，重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

#### 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。