（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®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

网址：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℃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	96 孔×1 块	/	无要求
	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(μL)	0	5	10	20	30	40	50	60
生理盐水(μL)	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 1×10^6 细胞加入 300-500 μL PBS（0.01 M，pH 7.4）或生理盐水（0.9% NaCl）进行匀浆。匀浆后，4℃，10000 × 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 μL 不同浓度的标准液，加入到对应的标准孔中。
样本孔：取 10 μL 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 μL 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(μL)	10	--
待测样本(μL)	--	10
显色剂工作液(μL)	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：

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

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

ΔA_{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

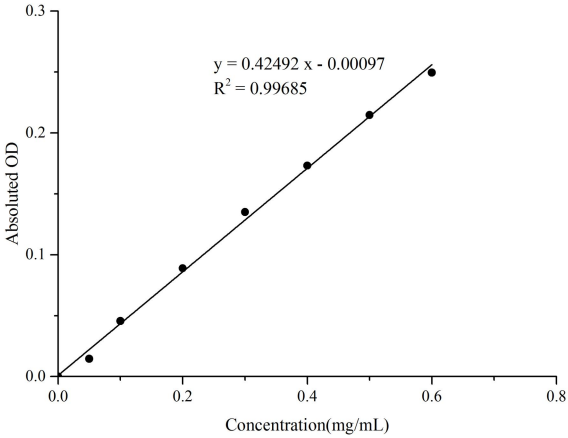
检测范围	0.046-0.6 mg/mL	平均批间差	8.2 %
灵敏度	0.046 mg/mL	平均批内差	3.2 %
平均回收率	104 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量10 μL，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，如下图所示：



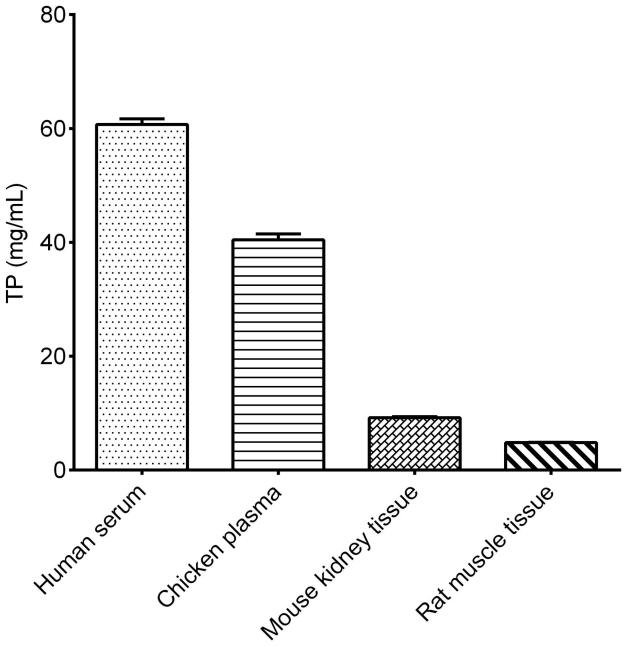
附录2 实例分析

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 μL人血清。按操作表操作，标准曲线：y= 0.3727 x + 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：

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

按照操作过程，测定人血清(稀释100倍，加样量10 μL)、鸡血浆(稀释100倍，加样量10 μL)、小鼠肾(10%组织匀浆，稀释20倍，加样量10 μL)和大鼠肌肉(10%组织匀浆，稀释20倍，加样量10 μL)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同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。