**考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白质含量**

**可溶性蛋白质 考马斯亮蓝紫外分光光度法 紫外UV2450**

1. **原理考马斯亮蓝G-250（Coomassie brilliant blue G-250）**

测定蛋白质含量属于染料结合法的一种。该染料在游离状态下呈红色，在稀酸溶液中当它与蛋白质的疏水区结合后变为青色，前者最大光吸收在465nm，后者在595nm在一定蛋白质浓度范围内（1-1000µg），蛋白质与色素结合物在595nm波长下的吸光度与蛋白质含量成正比，故可用于蛋白质的定量测定。考马斯亮蓝G-250于蛋白质结合反应十分迅速，2min左右即达到平衡。其结合物在室温下1h内保持稳定。此法灵敏度高，易于操作，干扰物质少，是一种比较好的定量法。其缺点是在蛋白质含量很高时线性偏低，且不同来源蛋白质与色素结合状况有一定差异。

1. **材料、仪器设备及试剂**
2. 材料：小麦叶片、马铃薯块茎、或其他植物材料
3. 仪器设备：分光光度计、研钵、烧杯、移液管
4. 试剂

（1）标准蛋白质溶液：100µg·ml-1牛血清白蛋白：称取牛血清白蛋白25mg，加水溶解并定容至100ml,吸取上述溶液40ml，用蒸馏水稀释至100ml即可。

（2）考马斯亮蓝G-250溶液：称取100mg考马斯亮蓝G-250，溶于50ml90%乙醇中，加入100ml 85%（W/V）的磷酸，再用蒸馏水定容到1L，贮于棕色瓶中，常温下可保存一个月。

1. **实验方法及步骤**

1、标准曲线的绘制取6支具塞试管，按表加入试剂。混合均匀后，向各管中加入5ml考马斯亮蓝G-250溶液，摇匀，并放置5min左右，在595nm下比色测定吸光度。以蛋白质浓度为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制标准曲线。管号1 2 3 4 5 6 标准蛋白质（ml）0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 蒸馏水量（ml）1.0 0.8 0.6 0.4 0.2 0 蛋白质含量（µg）0 20 40 60 80 100

1. 样品测定
2. 样品提取：氨基酸含量测试结束后，剩余的样品提取液可以作为该实验的样品提取液，如果没有上述提取液，则按照下面的方法进行提取。 取鲜样0.5g，加入2ml蒸馏水研磨，磨成匀浆后用6ml蒸馏水冲洗研钵，洗涤液收集在同一离心管中，在4000r/min下离心10min，弃去沉淀，上清液转入容量瓶，以蒸馏水定容至10ml，摇匀后待测。
3. 吸取样品提取液0.1ml，放入具塞试管中（每个样品重复2次），加入5ml考马斯亮蓝G-250溶液，充分混合，放置2min后在595nm下比色，测定吸光度，并通过标准曲线查得蛋白质含量。

**四、结果计算（**单位mg/g）样品中蛋白质含量=（C·VT）/（1000·VS·WF）

 式中：C—查的标准曲线值（µg）

  VT—提取液总体积（ml）

WF—样品鲜重（g）

VS—测定时加样量（ml）