

Bradford 法蛋白定量试剂盒说明书

产品编号: BTN80814

规格: 100mL/200mL

产品及特点:

Bradford 法测定蛋白质浓度是最为常用的蛋白检测方法之一, 在酸性条件下, 考马斯亮蓝 (Coomassie G-250) 染料能与蛋白质结合形成复合物, 其最大吸光值也由 465 nm 转移到 595 nm, 通过颜色的强弱测定蛋白质浓度的高低。本产品是基于 Bradford 法蛋白检测原理开发的产品, 具备下述特点:

1. 快速, 10-20 个样品只需要 10 分钟即可完成测定。
2. 稳定, 加样混匀后 2 分钟既可测定, 1 小时内吸光度变化不超过 10%。
3. 线性范围在 50~1000 $\mu\text{g/mL}$ 。
4. 最小测量体积为 1-20 μL , 最低测量蛋白量为 0.5 μg 。
5. 即开即用, 不需要单独购买每个成分再配制。
6. 有常规和微量两种检测模式。
7. 不受绝大部分样品中的化学物质的影响。巯基乙醇的浓度可高达 1M, 二硫苏糖醇的浓度可高达 5 mM。
8. 但受略高浓度的表面活性剂影响, 各种蛋白质与染料的结合效率可能有差异。

规格及成分:

成分	100ml	200ml
溶液 A	100ml	200ml
BSA 标准 (2 mg/mL)	1ml	1ml
滤纸	20 张	20 张
说明书	1 份	1 份

保存条件:

常温运输和保存, BSA 标准-20°C 保存, 有效期一年。

自备试剂:

无菌水。

使用方法:

一. 常规检测流程:

此方法在蛋白浓度 30-1000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈现 $R^2 = 0.996$ 的直线性回归, 可精确定量蛋白浓度在此范围内的蛋白样品。

1. 制备 1×工作液。溶液 A 与无菌水按 1: 4 比例充分混合即为 1×工作液 (例: 4 mL 溶液 A + 16 mL 无菌水 = 20 mL 1×工作液)。
2. 滤纸过滤。过滤后的工作液室温条件下可稳定使用 1-2 星期。

3. 检测：蛋白样品与1×工作液按1：50比例混合（例：100 μL 蛋白样品 + 5mL 1×工作液，适用于3 mL 的比色杯；40 μL 蛋白样品 + 2 mL 1×工作液，适用于1 mL 的比色杯；20 μL 蛋白样品 + 1 mL 1×工作液，适用于平底透明96孔板）。
4. 加样后，充分混匀。
5. 室温放置5分钟。
6. 检测吸光度。波长设定 = 595 nm。

注意事项：

1. 不同型号、规格的滤纸，具有不同的孔径，导致可通过的分子各不相同。请使用本公司指定提供的滤纸，否则会导致不同的测定结果。
2. 检测样品之前，应首先制备蛋白标准曲线。一般可使用BSA。
 - a) 常规检测：建议使用下述浓度的BSA。
0 μg/mL、31.25 μg/mL、62.5 μg/mL、125 μg/mL、250 μg/mL、500 μg/mL、750 μg/mL、1000 μg/mL
 - b) 微量检测：建议使用下述浓度的BSA。
0 μg/mL、2.5 μg/mL、5 μg/mL、7.5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL。
3. 检测细胞提取物或纯化蛋白样品，应使用相应的缓冲液制备蛋白标准曲线。
4. 用96孔板测定时，应确保没有气泡，否则会绝对增加吸光度的读数。
5. 此检测试剂不受绝大部分样品中的化学物质的影响。巯基乙醇的浓度可高达1M，二硫苏糖醇的浓度可高达5 mM。但受略高浓度的表面活性剂影响。若SDS高于0.1%，TritonX-100高于0.1%，Tween20, 60, 80高于0.06%，可取少量样品加水稀释到适当浓度，再行测定。

二. 微量检测流程：

此方法在蛋白浓度1~20 μg/mL 范围内呈现 $R^2 = 0.992$ 的直线线性回归，可精确定量蛋白浓度在此范围内的蛋白样品。

1. 蛋白样品与溶液A按4：1比例混合。
例：400 μL 蛋白样品 + 100 μL 溶液A，适用于平底透明96孔板；
2 mL 蛋白样品 + 0.5 mL 溶液A，适用于1 mL 的比色杯；
4 mL 蛋白样品 + 1 mL 溶液A，适用于3 mL 的比色杯。

2. 加样后，充分混匀。
3. 室温放置5分钟。
4. 检测吸光度。波长设定= 595 nm。

注意事项：

1. Bradford 蛋白浓度测定的显色反应受许多去污剂的影响。应避免使用SDS, Triton X-100, Tween 等溶解蛋白样品。对于难溶解的蛋白样品，可用1MNaOH溶解和稀释。
2. Bradford 蛋白浓度测定的显色反应依赖于蛋白中精氨酸残基的数目，因此不同蛋白间测定的差异可能较大。

3. 标准品曲线配制时，如果吸量不准确或者加样枪不精确会造成标准曲线相关系数减小，可根据需要使用倍比梯度稀释的方法来配制，或者使用精确度高的加样枪。
4. 由于 Bradford 法在蛋白浓度增高到一定时候，颜色反应并不成比例增加，因此得到的标准曲线只是在一定范围内可以近似看成直线，每次应按照实际测得的标准曲线计算出相对精确的蛋白浓度。
5. 不像其它一些蛋白浓度测定方法（包括 Lowry 法），Bradford 法测定蛋白浓度不受绝大部分样品中的化学物质的影响。样品中巯基乙醇的浓度可高达 1M，二流苏糖醇的浓度可高达 5mM。但受略高浓度的去垢剂影响。需确保 SDS 低于 0.125%，Triton X-100 低于 0.125%，Tween 20 低于 0.06%，可以考虑用超纯水稀释，透析/除盐，ACETONE/TCA 沉淀蛋白后重溶于超纯水等方法来消除干扰物质的影响。