

## 去垢剂兼容型Bradford试剂盒 Detergent-Compatible Bradford Assay Kit

货号：PD-Cde-1000

组分：1000毫升染色液一瓶，5 mg/ml BSA四支。

保存：4度避光，一年有效。 -20度冷冻可长期保存。

在涉及蛋白组学的实验中，经常需要检测溶液中的蛋白质浓度。常用的蛋白定量的方法分为两大类：一类是铜还原法，原理是在碱性环境中利用肽键将二价铜还原为一价铜，如双缩脲反应、改良Lowry法、BCA法等；另一类是染料结合法，原理是通过染料与蛋白质的结合，使溶液的光吸收峰发生改变，最常用的染料是考马斯亮蓝G250（Bradford法）。

在蛋白质提取和蛋白电泳实验中，经常会用到还原剂和去垢剂（表面活性剂），上述蛋白定量方法往往与这些还原剂和去垢剂不兼容：还原剂对铜还原法有强烈干扰作用，即使在没有蛋白的情况下也能产生显色反应；去垢剂则对染料结合法有强烈干扰作用，如SDS、Triton-X100、Tween20等，会与染料结合使溶液光吸收峰发生改变。这些还原剂和去垢剂在蛋白提取和电泳相关缓冲液中很常见，传统上解决这些干扰的方法是通过蛋白沉淀法去除干扰成分，然后重悬蛋白进行浓度测定，其缺点在于显著增大了工作量，并且增加了实验误差。

Bradford法不受绝大部分样品中的化学物质的影响，也不受还原剂的影响，但是去垢剂可以造成强烈干扰。通过与染料结合，去垢剂抬高背景光吸收值，使得检测灵敏度和检测范围发生改变，甚至无法检测。本产品通过对Bradford法的改进，降低了去垢剂的干扰，可兼容6%SDS、4%Tween20、2% Triton-X100、2% NP40、8% CHAPS，可耐受各种RIPA裂解液，对蛋白组学实验常用的各种缓冲液均可兼容。

Bradford法蛋白定量的原理是在酸性环境中，蛋白质结合考马斯亮蓝G250染料，导致染料的最大光吸收峰发生位移，从红棕色形式转化为蓝色形式，595nm 是测定G250-蛋白复合物的最佳波长。由于G250在结合蛋白前后的光吸收波谱有重叠，直接使用OD595线性拟合，得到的是一个直径很大的曲线，可近似看作直线，在蛋白浓度跨度较大时会对线性拟合造成影响。使用OD595/OD470的比值则可以更好地拟合反应过程，得到的是一条直线，可在一定程度上提高检测灵敏度。本试剂盒对BSA蛋白的最低检测浓度为约30  $\mu\text{g/ml}$ ，以样品体积5  $\mu\text{l}$  计算，即检测灵敏度为约0.15  $\mu\text{g}$  的BSA蛋白；最大检测浓度受仪器的测读范围限制，可超过4mg/ml。

使用Bradford法蛋白定量时，被检测的肽或蛋白质的分子量须大于 3KD，低于此分子量的短肽和氨基酸无法检测。

### 操作步骤：

一，准备蛋白标准品：参考下表配制标准蛋白梯度，使用与蛋白溶液相同的缓冲液作为溶剂，可按比例放大或缩小，也可按需调整浓度区间。

管号	BSA终浓度	BSA体积和来源	溶剂体积	总体积
A	2000 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{l}$ 储液 (5 mg/ml)	750 $\mu\text{l}$	1250 $\mu\text{l}$
B	1500 $\mu\text{g/ml}$	从A管取847.5 $\mu\text{l}$	282.5 $\mu\text{l}$	1130 $\mu\text{l}$
C	1000 $\mu\text{g/ml}$	从B管取730 $\mu\text{l}$	365 $\mu\text{l}$	1095 $\mu\text{l}$
D	750 $\mu\text{g/ml}$	从C管取693 $\mu\text{l}$	231 $\mu\text{l}$	924 $\mu\text{l}$
E	500 $\mu\text{g/ml}$	从D管取524 $\mu\text{l}$	262 $\mu\text{l}$	786 $\mu\text{l}$
F	250 $\mu\text{g/ml}$	从E管取384 $\mu\text{l}$	384 $\mu\text{l}$	768 $\mu\text{l}$
G	125 $\mu\text{g/ml}$	从F管取368 $\mu\text{l}$	368 $\mu\text{l}$	736 $\mu\text{l}$
H	60 $\mu\text{g/ml}$	从G管取336 $\mu\text{l}$	364 $\mu\text{l}$	700 $\mu\text{l}$
I	30 $\mu\text{g/ml}$	从H管取300 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$	600 $\mu\text{l}$
J	15 $\mu\text{g/ml}$	从I管取200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$	400 $\mu\text{l}$
K	0	0	400 $\mu\text{l}$	400 $\mu\text{l}$

二，将染色液从冰箱取出，充分混匀。取出所需体积的染色液，温度平衡至室温，其余染色液放回冰箱。然后根据需要选择试管法或微孔板法。

三，检测和结果计算：

A，试管法

- 1，取50  $\mu$ l蛋白标准品或待测样品放入试管，然后放入2.5 ml染色液，混匀，室温孵育2分钟后读数，60分钟内完成。在2-30分钟之间读数，结果比较稳定。
- 2，在比色杯中放水，在595 nm波长给分光光度计调零，然后读取样品的吸光值OD595。将OD595减去对照（含染料不含蛋白）的吸光值，获得的数值作为纵坐标，以BSA蛋白浓度作为横坐标，作图，进行线性拟合，以此计算待测样品中的蛋白浓度。
- 3，（可选）用水在470 nm波长给分光光度计调零，然后读取样品的吸光值OD470。用OD595/OD470的比值作为纵坐标，BSA蛋白浓度作为横坐标，拟合得到的曲线线性更好，可在一定程度上提高检测灵敏度。

B，微孔板法

- 1，取5  $\mu$ l蛋白标准品或待测样品放入96孔板中，然后放入250  $\mu$ l染色液，室温孵育2分钟，振荡后读数，60分钟内完成。在2-30分钟之间读数，结果比较稳定。
- 2，用酶标仪在595 nm波长读取样品的吸光值OD595。将OD595的数值作为纵坐标，以BSA蛋白浓度作为横坐标，作图，进行线性拟合，以此计算待测样品中的蛋白浓度。
- 3，（可选）用酶标仪分别在595和470 nm波长读取样品的吸光值OD595和OD470，并设置一个只有水、不含染料和蛋白的背景对照OD（H<sub>2</sub>O）。用【OD595（样品）- OD595（H<sub>2</sub>O）】 / 【OD470（样品）- OD470（H<sub>2</sub>O）】的比值作为纵坐标，BSA蛋白浓度作为横坐标，拟合得到的曲线线性更好，可在一定程度上提高检测灵敏度。

注意事项：

- 1，在使用微孔板读数时，需注意此时的背景值是指水的光吸收值，并非不含蛋白的染色液的光吸收值。在试管法中，因为已经用水调零，计算时不用再减去水的光吸收值。如缺乏合适滤光片，也可使用590-600 nm和450-485 nm的任意波长进行读数。
- 2，采用试管法时建议使用塑料或玻璃比色皿。染料会吸附在石英比色皿壁上，不影响本实验，但可能会影响其他实验。沾了染料的石英比色皿可以用95%乙醇清洗。
- 3，泡沫会影响光吸收值，应注意避免在比色皿或微孔板中留下气泡。
- 4，温度对反应没有影响，但需注意避免在不同样品或不同微孔之间产生温度差，以免对最终读值造成干扰。因此每次使用前需将染色液提前平衡至室温。
- 5，在长时间静置条件下，染料容易在溶液中结成松散的团块，因此在使用前需充分混匀。染料与蛋白质的结合过程很快，蛋白浓度过高时也可能产生团块。在读数之前注意摇匀或振荡后读数，以免结果产生偏差。

相关产品：

Bradford法蛋白定量试剂盒 <http://www.biothrive.cn/products/51335558.html>

BCA蛋白定量试剂盒 <http://www.biothrive.cn/products/18252051.html>

超敏型 ECL化学发光底物试剂盒 <http://www.biothrive.cn/products/18242124.html>

极敏型 ECL化学发光底物试剂盒 <http://www.biothrive.cn/products/18241935.html>