

Bradford法蛋白定量试剂盒

Bradford Protein Assay Kit

货号: PD-Cog-1000

组分: 1000毫升染色液一瓶, 5 mg/ml BSA四支。

保存: 4度避光, 密封保存, 一年有效。可在-20度冷冻长期保存。

试剂盒原理:

在酸性环境中, 蛋白质结合考马斯亮蓝G250染料, 导致染料的最大吸收发生位移, 从红棕色形式 (最大吸收峰 465nm) 转化为蓝色形式 (最大吸收峰 610nm)。这两种形式在 595nm 处光吸收差异最大, 因此 595nm 是测定考马斯染料-蛋白复合物的蓝色的最佳波长。基于考马斯染料的蛋白质检测法中, 颜色的形成是与某些碱性氨基酸 (主要是精氨酸、赖氨酸和组氨酸) 有关, 范德华力和疏水相互作用也影响染料-蛋白质的结合。游离氨基酸、肽和低分子量蛋白质不会与考马斯染料试剂产生颜色, 肽或蛋白质的分子量必须大于 3,000 道尔顿才能被检出。

与BCA法和Lowry法相比, 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, 尤其是还原试剂的影响, 但是受去垢剂的影响较大。常见物质的兼容性参考兼容物列表。

使用本试剂盒在微孔板上检测BSA时, 线性拟合范围最低可达约30 $\mu\text{g/ml}$, 即相当于0.15 μg 的BSA蛋白, 检测浓度上限可达到5 mg/ml以上, 主要受读数所用仪器的检测范围限制。若在试管中反应, 使用比色皿进行读数, 由于比色皿光径较大, 线性范围最低可达2 $\mu\text{g/ml}$ 。不同蛋白由于氨基酸组成不同, 与染料结合后的吸光值有差异, 线性范围会有所变动。由于染料与蛋白结合前后的吸收光谱有重叠, 因此直接使用OD595 (在595 nm的光吸收值) 线性拟合, 得到的是一个直径很大的曲线, 在较小浓度范围内可近似看作直线, 在蛋白浓度跨度较大时, 线性度下降。使用OD595/OD470的比值 (在595 nm和470 nm的光吸收值之比) 能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。采用OD595/OD470的比值进行计算的原因和优点可以参考此链接: http://www.biothrive.cn/vip_doc/26544800.html。

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

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 μ 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, 振荡后读数, 60分钟内读数完毕, 在前30分钟读数结果更好。

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 μ l蛋白标准品或待测样品放入96孔板中, 然后放入250 μ l染色液, 室温孵育2分钟, 振荡后读数, 60分钟内完成读数, 在前30分钟读数结果更好。

2, 用酶标仪在595 nm波长读取样品的吸光值OD595。以OD595为纵坐标, 以BSA蛋白浓度为横坐标, 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_{H₂O}。用【OD595 (样品) - OD595 (H₂O)】/【OD470 (样品) - OD470 (H₂O)】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, 在样品中干扰物浓度较低, 不对反应构成干扰时, 可提高样品与染色液体积比至1: 4 (如: 50 μ l 样品加入200 μ l 染色液), 可以提高检测灵敏度, 线性范围最低可达2 μ g/ml。

2, 使用OD595/OD470拟合时, 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。在上述试管法中, 因为已经用水调零, 因此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。

3, 由于G250染料的溶解特性, 在长时间静置时, 溶液中容易产生絮状团块, 因此在使用前需充分摇匀。摇匀过程中会产生泡沫, 而泡沫会影响光吸收值, 解决办法是在取液时稍侧倾瓶身, 从没有泡沫或泡沫较少的地方取液, 枪头离开液面时沿瓶身滑出, 可以不带出或只带出很少量泡沫。很少量泡沫通常会很快自行消失。应注意避免在比色皿或微孔板中留下气泡。

4, 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, 振荡后读数可获得更好的结果。不振荡也可拟合标准曲线, 质量略差。可以在反应过程中一直保持振荡状态。

5, 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。

6, 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。每次使用前需将染色液提前平衡至室温。

相关产品:

去垢剂兼容型Bradford试剂盒, <http://www.biothrive.cn/products/52575235.html>

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

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

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