

天
净
沙
系
列

CAT#: 80814-250

常温运输和保存, BSA 标准低温

TIANDZ

Bradford 法蛋白定量试剂盒

Bradford Protein Assay Kit

使用手册 V1.2

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

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，通过颜色的强弱即可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 µg/mL。 4. 最小测量体积为 1-20 uL，最低测量蛋白量为 0.5 ug。 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 5mM。 8. 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。 9. 本产品至少可以按常规法测 200 次，按微量法测 1000 次。			
规格及成分		成 分	编 号	小纸盒包装
		Bradford 法蛋白定量溶液 A	80814a	250 mL（棕色瓶）
		BSA 标准（2 mg/mL）	131070	1 mL
		定性滤纸（直径 12.5cm）	80814b	50 张
		使用手册	80814sc	1 份
运输及保存	常温运输和保存，BSA 标准需低温运输、-20℃保存，有效期一年。			
自备仪器试剂	超纯水、分光光度计			
使用方法	一、制备溶液 A 工作液 1. 将试剂盒提供的Bradford 法蛋白定量溶液 A 与自备超纯水按 1: 4 比例充分混合即为溶液 A 工作液（例：4 mL 溶液 A + 16 mL 超纯水= 20 mL 溶液 A 工作液）。每次配制多少取决于检测方法和测试体积，需要预先按下面手册计算。 2. 用本试剂盒提供的滤纸过滤溶液 A 工作液。过滤后的工作液室温条件下可稳定使用 1-2 星期。注意：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。 二、制备 BSA 标准品梯度稀释液			

3. 测试开始之前，应首先制备 BSA 标准品梯度稀释液。本试剂盒使用 BSA 作为标准品。用户也可以使用自备的其他蛋白质浓度测定用标准品。每个浓度具体需要多少体积取决于检测方法和测试体积，需要预先按下面的手册计算。没有用完的 BSA 标准品梯度稀释液可以放-20℃待下次使用。

a) 如果进行常规检测，建议用溶解待测样品的缓冲液将 BSA (2 mg/mL) 稀释成下面的 8 个浓度：

0μg/mL、31.25μg/mL、62.5μg/mL、125μg/mL、250μg/mL、500μg/mL、750μg/mL、1000μg/mL

b) 如果进行微量检测，建议用溶解待测样品的缓冲液将 BSA (2 mg/mL) 稀释成下面的 6 个浓度：

0μg/mL、2.5μg/mL、5μg/mL、7.5μg/mL、10μg/mL、20μg/mL。

三、常规检测流程

常规检测法在蛋白浓度 30 - 1000 μg/mL 范围内呈现 $R^2 = 0.996$ 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。

4. 在标记的离心管中分别加入 N 个待测蛋白样品和 8 个 BSA 梯度稀释液，然后再在每个离心管中按 1:50 的比例加入溶液 A 工作液。终体积多少取决于比色杯的体积。

如果用 3 mL 比色杯检测，则取 100 μL 样品+5 mL 溶液 A 工作液；

如果用 1 mL 比色杯检测，则取 40 μL 样品+2mL 溶液 A 工作液；

如果用平底透明 96 孔板，则取 20 μL 样品+1 mL 溶液 A 工作液。

5. 样品与溶液 A 工作液混合后，充分震荡 30 秒混匀。

6. 室温放置 5 分钟。

7. 分光光度计检测吸光度。波长设定= 595nm。用 96 孔板测定时，应确保没有气泡，否则气泡会绝对增加吸光度的读数。

8. 将待测样品的测定值逐一跟用 BSA 梯度稀释液测定值绘制的标准曲线比较得到待测样品的蛋白质浓度。

四、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。

9. 在标记的离心管中分别加入 N 个待测蛋白样品和 6 个 BSA 梯度稀释液，然后

	再在每个离心管中按 4:1 的比例（注意：不是 1:50）加入溶液 A 工作液。终体积多少取决于比色杯的体积。 如果用 3 mL 比色杯检测，则取 4 mL 样品+1 mL 溶液 A 工作液； 如果用 1 mL 比色杯检测，则取 2 mL 样品+0.5 mL 溶液 A 工作液； 如果用平底透明 96 孔板，则取 400 μL 样品+100 μL 溶液 A 工作液。 10. 样品与溶液 A 工作液混合后，充分震荡 30 秒混匀。 11. 室温放置 5 分钟。 12. 分光光度计检测吸光度。波长设定= 595nm。用 96 孔板测定时，应确保没有气泡，否则气泡会绝对增加吸光度的读数。 13. 将待测样品的测定值逐一跟用 BSA 梯度稀释液测定值绘制的标准曲线比较得到待测样品的蛋白质浓度。
注意事项	1. 不像其它一些蛋白浓度测定方法（包括 Lowry 法），Bradford 蛋白浓度测定的显色反应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 5mM。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%，可用稀释法、透析/除盐法或 Acetone/TCA 沉淀蛋白后重溶于超纯水等方法再行测定。对于难溶解的蛋白样品，可用 1M NaOH 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。