
Bradford 蛋白浓度测定试剂盒说明书**AP0561****保存条件**

4°C保存，有效期 18 个月。

产品简介

考马斯亮兰 G-250 染料，在酸性溶液中与蛋白质结合，使染料的最大吸收峰的位置 (max)，由 465nm 变为 595nm，在一定的浓度范围内，测定的吸光度值 A595 与蛋白质浓度成正比。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，样品中巯基乙醇的浓度可高达 1M，二硫苏糖醇的浓度可高达 5mM，但受略高浓度的去垢剂影响，需确保 SDS 的浓度低于 0.1%，Triton X-100 低于 0.1%，Tween 20, 60, 80 低于 0.06%。

产品内容

组成	包装	保存
5xG250 染色液	50mL	4°C
蛋白标准(5mg/mL BSA)	1mL	4°C

使用方法**一. 微孔酶标仪法**

1. 完全溶解蛋白标准品，取 10 μ L，稀释至 250 μ L，使终浓度为 0.2mg/mL。待测蛋白样品在什么溶液中，标准品也宜用什么溶液稀释。但是为了简便起见，也可以用 0.9%NaCl 或 PBS 稀释标准品。
2. 5 \times G250 染色液使用前请颠倒 3-5 次混匀，取 1mL 5 \times G250 染色液，加入 4mL 双蒸水，混匀成 1 \times G250 染色液，此 1 \times G250 染色液可在 4°C保存一周。
3. 将标准品按 0、2、4、6、8、12、16、20 微升分别加到 96 孔板中，加 PBS 稀释液补足到 20 微升。
4. 将样品作适当稀释（最好多做几个梯度，如作 2 倍、4 倍、8 倍稀释），加 20 微升到 96 孔板的样品孔中。由于移液器在取小量时的误差，标准线前面的点可能不很准确，所以尽可能的让样品点落在标准线 1/2 后。
5. 各孔加入 200 微升稀释后的 1 \times G250 染色液，室温放置 3-5 分钟。
6. 用酶标仪测定 A595，或 560-610nm 之间的其它波长的吸光度。

7. 根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度。

二. 分光光度计法

如无酶标仪，染色反应可在离心管中进行，反应液混匀后加入比色皿中，使用分光光度计测定吸光值。

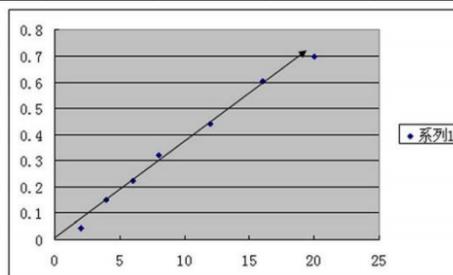
步骤如下：

1. 取八支（或者更多）干净的 10mL 离心管，标记上号。
2. 取 100 μ LBSA 加入 PBS 2.4mL 稀释至终浓度为 0.2mg/mL。
3. 5 \times G250 染色液使用前请颠倒 3-5 次混匀，取 10mL 5 \times G250 染色液，加入 40mL 双蒸水，混匀成 1 \times G250 染色液，此 1 \times G250 染色液可在 4 $^{\circ}$ C 保存一周。
4. 按下表加入试剂(以每孔 5mL 计，多余的用来清洗比色皿)

离心管号	1	2	3	4	5	6	7 (样品管 1)	8 (样品管 2)	9 (样品管 3)
标准蛋白 BSA	0	100 μ L	200 μ L	300 μ L	400 μ L	500 μ L	500 μ L 适当稀释的样品 1	500 μ L 适当稀释的样品 2
PBS	500 μ L	400 μ L	300 μ L	200 μ L	100 μ L	0	0	0	0
1XG250 染色液	5mL	5mL	5mL						

5. 反应 3 分钟后测 OD 值。为了实验的准确性，可每间隔 2 分钟加一管染色液，每间隔 2 分钟测一管 OD 值。如下表：

离心管号	1	2	3	4	5	6	7	8
加染色液 (分钟)	0	2	4	6	8	10	12	14
测 OD 值	3	5	7	9	11	13	15	17



此图为伯乐酶标仪 680，单波长，570nm 测得。室温反应三分钟。