

Code No. T9310A

研究用

TaKaRa

TaKaRa Bradford Protein
Assay Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒以外必备的主要试剂及仪器	1
● 使用注意	1
● 操作方法	1
● 附 录	3
● 关联产品	4

● 制品说明

本制品是一种使用考马斯染料的 Bradford 法蛋白质定量试剂盒，操作简便，可快速地对浓度范围在 1~1,000 $\mu\text{g/ml}$ 的蛋白质溶液进行定量。其原理是考马斯染料与蛋白质结合后，溶液的颜色发生变化（棕色~蓝色），最大吸收峰从 465 nm 迁移到 595 nm。这种颜色的变化与溶液中的蛋白质浓度成正比。因此可通过测定 595 nm 处的吸光值对溶液中的蛋白质进行定量。从反应开始 5 分钟~60 分钟，蛋白质和染料结合产生的复合体十分稳定。本制品可对含有还原剂的样品进行测定，但对于含有表面活性剂样品的测定结果不稳定，详细信息请见附录的表 1。同时要注意不同蛋白质测定时，吸光度值会存在很大差异，不同蛋白质间的差异性请参考附录的表 2。

使用本制品时，1 ml 标准型反应体系可进行 500 次反应，使用微孔板的 200 μl 微型反应体系可进行 2,500 次反应。使用低浓度蛋白质样品测定的操作流程时，1 ml 反应体系可进行 1,000 次反应，200 μl 反应体系可进行 5,000 次反应。

● 制品内容

1. Bradford Dye Reagent	250 ml \times 2 支
2. BSA Standard Solution (2 mg/ml)*	1 ml \times 10 支

* : BSA Standard Solution (牛血清白蛋白标准品溶液) 保存在 0.9% NaCl 和 0.05% NaN_3 溶液中。

● 保存

4°C

● 试剂盒外必备的主要试剂及仪器

1. 1 ml 比色皿 (1 ml 反应体系时使用)
建议使用一次性的聚苯乙烯比色皿。
2. 微孔板 (200 μl 反应体系时使用)
3. Microtube (2 ml 或 1.5 ml)
4. 分光光度计及酶标仪

● 使用注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前请一定认真阅读。

1. Bradford Dye Reagent 使用前室温放置，恢复至室温后，轻轻颠倒 3~5 次混合均匀，注意不要剧烈振荡。
2. BSA Standard Solution 使用前室温放置或在 20~50°C 的水浴中复温，轻弹混匀，轻微离心后使用。
3. 稀释标准品和样品时，可使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS。
4. 蛋白质溶液与 Bradford Dye Reagent 反应后，可能会产生蛋白质与染料复合体的沉淀物，测定前要混合均匀。
5. 如果没有配备 595 nm 滤光片，可选择 575~620 nm 的滤光片进行测定，不会对蛋白质定量产生影响。
6. 由于染料易吸附在比色皿表面，因此不建议使用玻璃及石英器皿。但如果使用，在测定后需要立即用甲醇或乙醇充分洗净。建议使用一次性的聚苯乙烯比色皿。

● 操作方法

A. 标准操作流程 (定量范围: 25~1,000 $\mu\text{g/ml}$) 【1 ml 反应体系】

1. BSA 标准品溶液的稀释方法见下表，BSA 标准品溶液和检测样品的稀释可使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS。

2 mg/ml BSA Standard (μl)	稀释液 (μl)	BSA 终浓度 (μg/ml)
50	50	1,000
30	50	750
20	60	500
20	140	250
10	150	125
5	395	25
0	100	0 (Blank)

- 取 20 μl 稀释后的 BSA 标准品溶液和检测样品溶液（如有必要，也可对检测样品进行稀释）加入到 1.5 ml microtube 中，每个浓度取 2 个平行样进行测定。
- 每管中各加入 1 ml 复温的 Bradford Dye Reagent，混匀后在 25°C 水浴中或者室温（~25°C）反应 5 分钟。
- 使用分光光度计测定 595 nm 处的吸光度值（测定时间尽量控制在反应后的 1 小时以内）。
- 各浓度 BSA 标准品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值，绘制 BSA 标准品溶液的标准曲线，并根据 BSA 标准曲线计算出检测样品的蛋白质浓度。

B. 标准操作流程（定量范围：25~1,000 μg/ml）【200 μl 反应体系】

- BSA 系列标准品溶液的稀释同 A-1。
- 取 4 μl 稀释后的 BSA 标准品溶液和检测样品（如有必要，也可对检测样品进行稀释）加入到微孔板中，每个浓度取 2 个平行样进行测定。
- 每孔中各加入 200 μl 复温的 Bradford Dye Reagent，混匀后在室温（~25°C）下反应 5 分钟。
- 酶标仪波长设定在 595 nm 处进行测定（测定时间尽量控制在反应后的 1 小时以内）。
- 各浓度 BSA 标准品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值，绘制 BSA 标准品溶液的标准曲线，并根据 BSA 标准曲线计算出检测样品的蛋白质浓度。

C. 低浓度蛋白质样品测定的操作流程（定量范围：1~25 μg/ml）【1 ml 反应体系】

- BSA 标准品溶液的配制。
 - 0.1 mg/ml BSA 标准品溶液的制备：取 50 μl BSA Standard Solution (2 mg/ml) 加入 950 μl 稀释液后充分混匀。
 - 按照下表所示在 1.5 ml microtube 中稀释 BSA 标准品溶液（2 个平行样）（7 个浓度 × 2 = 14）。BSA 标准品溶液和检测样品的稀释可使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS。

0.1 mg/ml BSA Standard (μl)	稀释液 (μl)	BSA 终浓度 (μg/ml)
125	375	25
100	400	20
75	425	15
50	450	10
25	475	5
12.5	487.5	2.5
0	500	0 (Blank)

- 在 1.5 ml microtube 中加入 500 μl 检测样品溶液（如有必要，也可对检测样品进行稀释），每个检测样品取 2 个以上平行样进行测定。
- 每管中各加入 500 μl 复温的 Bradford Dye Reagent，混匀后在 25°C 水浴中或者室温（~25°C）反应 5 分钟。
- 使用分光光度计测定 595 nm 处的吸光值（测定时间尽量控制在反应后的 1 小时以内）。
- 各浓度 BSA 标准品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值，绘制 BSA 标准品溶液的标准曲线，并根据 BSA 标准曲线计算出检测样品的蛋白质浓度。

D. 低浓度蛋白质样品测定的操作流程（定量范围：1~25 µg/ml）【200 µl 反应体系】

1. BSA 系列标准品溶液的稀释同 C-1。
2. 分别取 100 µl 稀释后的 BSA 标准品溶液和检测样品（如有必要，也可对检测样品进行稀释）加入到微孔板中，每个浓度取 2 个平行样进行测定。
3. 每孔中各加入 100 µl 复温的 Bradford Dye Reagent，混匀后在 25°C 水浴中或室温（~25°C）反应 5 分钟。
4. 酶标仪波长设定在 595 nm 处进行测定（测定时间尽量控制在反应后的 1 小时以内）。
5. 各浓度 BSA 标准品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值，绘制 BSA 标准品溶液的标准曲线，并根据 BSA 标准曲线计算出检测样品的蛋白质浓度。

● 附录

兼容试剂的影响

本制品一般不受还原剂的影响，但表面活性剂浓度过高会影响其测定结果。下表列举了使用本制品检测时，不影响检测结果的各种兼容试剂的浓度。

表 1. 标准操作流程中所使用的各种兼容试剂的最大浓度

试剂名称	兼容试剂的最大浓度
Salt/Buffer	
Ammonium sulfate	1 M
Borate pH9.5	50 mM
Calcium chloride	10 mM
Glycine	100 mM
Guanidine-HCl	3.5 M
HEPES, pH7.5	100 mM
Imidazole pH7.0	200 mM
KPB pH7.0	100 mM
Magnesium chloride	100 mM
MES, pH6.1	100 mM
MOPS, pH7.2	100 mM
NaPB, pH7.0	100 mM
Nickel chloride	10 mM
PBS	undiluted
PIPES, pH6.8	500 mM
Sodium acetate, pH5.0	600 mM
Sodium azide	0.5%
Sodium chloride	5 M
Sodium citrate, pH6.4	200 mM
Tricine, pH8.0	100 mM
Tris-HCl, pH8.0	2 M
Zinc chloride	10 mM
Detergents	
Brij-35	0.125%
CHAPS	5%
NP-40	0.1%
Triton X -100	0.125%
Tween-20	0.1%
SDS	0.015%

试剂名称	兼容试剂的最大浓度
Chelating agents	
EDTA	100 mM
EGTA	50 mM
Reducing agents	
Cysteine	10 mM
Dithiothreitol(DTT)	100 mM
Glucose	1 M
2-Mercaptoethanol	1 M
Organic solvents	
Acetone	10%
DMSO	10%
Ethanol	10%
Methanol	10%
Misc. Reagents	
Glycerol	50%
Hydrochloric Acid	100 mM
PMSF	1 mM
16S, 23S rRNA	1 mg/ml
Sodium Hydroxide	100 mM
Streptomycin sulfate	20%
Tryptophan	1 mM
Urea	6 M

蛋白质种类的影响

蛋白质与染料的结合主要是蛋白质中的碱性氨基酸及芳香族氨基酸残基（特别是精氨酸）与染料的结合。因此，测定不同蛋白质时，吸光度值会存在差异。BSA（牛血清白蛋白）和 BGG（ γ -球蛋白）的标准曲线见图 1，大多数蛋白质测定方法使用 BSA 或 BGG 作为标准品。表 2 列举了以 BSA 为标准测定的 15 种蛋白质吸光度值的差异。

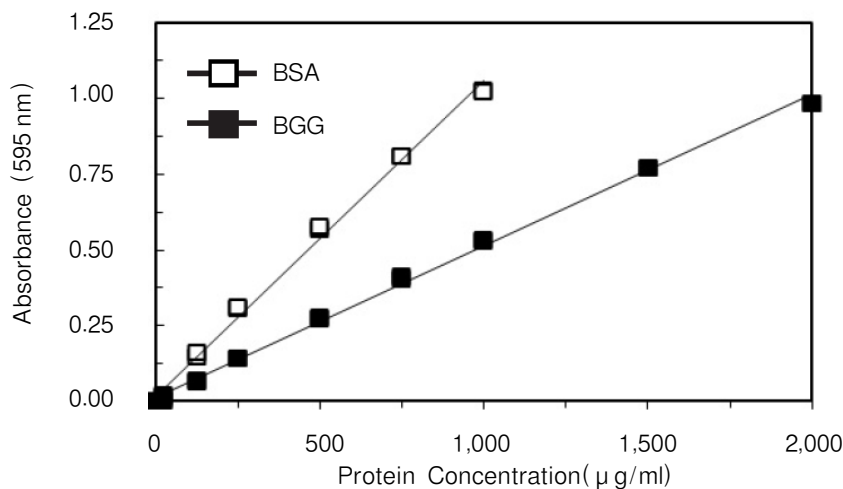


图 1. BSA 及 BGG 的标准曲线

表 2. 不同蛋白质相对于 BSA 吸光度值的差异性

Protein	Ratio*
Albumin, bovine serum (BSA)	1.00
Alcohol Dehydrogenase, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.64
Aldolase, rabbit muscle	0.80
Carbonic Anhydrase, bovine erythrocytes	0.89
α -Chymotrypsin, bovine pancreas	0.52
Cytochrome C, bovine heart	1.31
Gamma globulin, bovine (BGG)	0.51
Hemoglobin, bovine	1.01
IgG, rabbit	0.40
IgG, mouse	0.58
Insulin, human	0.84
Lysozyme, chicken egg white	0.73
Myoglobin, equine skeletal muscle	1.15
Ovalbumin, chicken egg white	0.68
Transferrin, human	0.79

* Ratio = (各种蛋白质吸光度的平均值) / (BSA 吸光度的平均值)

● 关联产品

TaKaRa BCA Protein Assay Kit (Code No. T9300A)

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>