

产品概述

Bradford 蛋白浓度测定方法是目前常用的灵敏度较高的蛋白浓度测定方法之一。其原理是考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质的碱性和芳香族氨基酸结合后会产生蓝色化合物,该物质最大吸光值波长为 595 nm,吸光值与蛋白质的含量在一定浓度范围内有较好的线性关系,通过测定吸光值大小并对照标准蛋白的吸光值,可推算出蛋白浓度,从而实现蛋白浓度的快速测定。

本产品 Bradford Protein Assay Kit 对传统的 Bradford 方法进行了改良,最佳蛋白含量检测范围为 100-500 $\mu\text{g/mL}$,具备灵敏度高和去垢剂耐受性高的特点。同时,本试剂盒配备有一系列梯度浓度的蛋白质标准品溶液(BSA 溶液),即取即用,无需稀释,方便快捷。

试剂组成

Components	BR4C202-01 800T
Bradford Protein Staining Fluid	250 mL
Bovine Serum Albumin Standard (0 $\mu\text{g/mL}$)	1 mL
Bovine Serum Albumin Standard (100 $\mu\text{g/mL}$)	1 mL
Bovine Serum Albumin Standard (150 $\mu\text{g/mL}$)	1 mL
Bovine Serum Albumin Standard (200 $\mu\text{g/mL}$)	1 mL
Bovine Serum Albumin Standard (300 $\mu\text{g/mL}$)	1 mL
Bovine Serum Albumin Standard (400 $\mu\text{g/mL}$)	1 mL
Bovine Serum Albumin Standard (500 $\mu\text{g/mL}$)	1 mL

保存条件

Bradford Protein Staining Fluid 试剂于 2-8°C 存储; Bovine Serum Albumin Standard 试剂于 -20 $\pm$ 5°C 存储;

注意事项

1. 本产品仅作科研用途,不用于临床诊断。
2. Bovine Serum Albumin Standard 试剂使用前应混匀,避免反复冻融。
3. Bradford 法测定蛋白浓度对大多数化学物质的兼容性比较好,但会受到略高浓度的去垢剂影响,需确保待测样品中 SDS、Triton X-100、Tween-20、NP-40 和 Brij35 等去垢剂浓度低于 2%。
4. 低温或长期保存过程中 Bradford 定量试剂会出现沉淀,请上下翻转混匀溶解即可。
5. Bradford 定量试剂需恢复到室温再使用,有利于提高检测的灵敏度。BSA 标准品在使用前请充分溶解摇匀。
6. 反应在 5-20 min 内吸光值最稳定,建议在此时间内完成检测,并尽量保证各管的反应时间一致,降低误差。
7. 建议每次检测均绘制标准曲线,以获得准确数据。
8. 为了您的安全和健康,请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

实验步骤

1. 取 BSA 标准品①-⑦各 10 μL 加入到透明 96 孔板中。
2. 使用 1 $\times$ PBS 或 0.9% 生理盐水将待测样品适当稀释(如 2 倍、4 倍、8 倍稀释),取 10 μL 稀释后的待测样品加入到 96 孔板中。
3. 每孔加入 300 μL Bradford 定量试剂,充分混匀,盖上 96 孔板盖,室温孵育 3-5 min。
4. 酶标仪测定 $A_{595\text{ nm}}$ 处的吸光值,空白对照为不含 BSA 样品的光吸收值。
5. 以蛋白含量(μg)为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。根据标曲和待测样品的吸光值计算得到待测样品的蛋白含量。

常见问题与解决方案

1. 标准曲线线性关系差或重复性差

原因: 移液操作误差大, 特别是小体积时; 标准品未充分混匀或溶解; 部分标准品出现变性或降解; 染料与标准品混合不均匀或反应时间不一致; 仪器不稳定或波长设置错误。

解决方案: 使用高精度移液器和低吸附枪头; 确保标准品完全溶解, 妥善保存 BSA 标准品溶液; 彻底混匀 BSA 标准品和 Bradford 定量试剂, 确保标准品与染料充分混合; 严格控制反应时间 (5-20 min 内读数); 校准分光光度计, 确认波长设置在 595 nm。

2. 吸光值偏高 (超出标准曲线范围)

原因: 样品蛋白浓度过高; 样品中含有干扰物质。

解决方案: 用与样品相同的缓冲液或水进行稀释, 确保稀释后浓度落在标准曲线范围内。记录稀释倍数用于最终计算。

3. 吸光值偏低 (接近或低于空白)

原因: 样品蛋白浓度过低; 样品中含有干扰物质; 反应时间不足或过长 (某些情况下); 移液错误 (样品量不足)。

解决方案: 浓缩样品, 如真空离心浓缩或 TCA 沉淀复溶; 增大样品体积 (但需注意总体积不能超过染料工作液体积太多, 否则会稀释染料), 通常样品体积不超过工作液体积的 10-20%; 确保足够的反应时间, 通常 5 min 显色基本稳定, 10-20 min 最佳, 但不宜过长。

4. 样品间重复性差

原因: 样品本身不均匀, 如细胞裂解物中有沉淀未充分混匀; 移液操作不一致 (特别是粘稠样品); 样品中含有气泡 (影响吸光值); 干扰物质在样品间含量不一致。

解决方案: 充分混匀样品 (涡旋或反复吹打), 特别是含有沉淀的样品, 取样前务必彻底混匀; 使用正向置换移液器或低吸附枪头处理粘稠样品; 加入染料后混匀时避免剧烈摇晃产生气泡, 或静置让气泡消失后再读数; 确保样品处理条件一致, 尽量减少干扰物质引入。

5. 干扰物质的影响 (最常见且棘手的问题)

原因: Bradford 法对多种物质敏感, 会导致吸光值异常升高或降低。

解决方案: 稀释能降低干扰物浓度, 使其影响减小, 但需确保稀释后蛋白浓度仍在可测范围内且干扰未完全消除时仍可能不准; 使用脱盐柱、超滤离心管和透析等方法将样品置换到低干扰或无干扰的缓冲液 (如水或低浓度 PBS) 中; 使用 TCA/丙酮或类似方法沉淀蛋白质, 弃去含干扰物的上清, 将沉淀溶解在兼容 Bradford 法的缓冲液 (如水或低浓度 PBS) 中; 如果干扰物难以去除且严重影响结果, 考虑使用对特定干扰物耐受性更好的方法, 如 BCA 法、Lowry 法或紫外吸收法 (A_{280}); 如果样品中的主要干扰物成分和浓度相对固定且已知, 可以将相同浓度的干扰物添加到标准品系列中, 建立“含干扰物的标准曲线”。

6. 颜色异常 (非典型蓝色)

原因: 染料失效 (变绿或棕色, 而非棕褐色); 样品 pH 极端 (过酸呈红色/棕色, 过碱呈蓝色但可能不稳定); 样本存在强氧化剂/还原剂; 极高浓度蛋白可能导致沉淀或颜色过深失真。

解决方案: 检查染料颜色, 失效则更换新批次; 调整样品 pH 至中性附近 (但注意稀释或加缓冲液本身可能引入问题); 稀释样品, 尝试去除或稀释干扰物。

7. 沉淀形成

原因: 样品离子强度过高 (高盐); 样品中含有不兼容的溶剂或去垢剂; 蛋白浓度过高; 染料或混合液储存温度过低 (磷酸盐沉淀)。

解决方案: 稀释样品 (首选); 脱盐/置换缓冲液; 确保染料和工作液在室温下使用 (避免冷试剂导致盐析); 充分混匀, 但避免剧烈摇晃产生过多气泡; 离心去除沉淀后取上清读数 (需注意沉淀中可能包含部分蛋白, 导致结果偏低)。