

考马斯亮蓝法蛋白质定量试剂盒（Bradford法）

产品货号：26402

产品规格：2666次

产品简介：

考马斯亮蓝蛋白定量法又称Bradford法，是最常用的蛋白质快速定量方法之一。考马斯亮蓝 (Coomassie brilliant blue G-250)与蛋白质结合后染料的最大吸收峰由465nm变为595nm，溶液的颜色由棕色变为蓝色，在595nm波长下测定的吸光度值与蛋白含量成正比。灵敏度比Lowry法高4倍，与BCA法相当。反应迅速，2分钟达到平衡并在1小时内保持稳定。操作简便，只需要一种反应试剂。干扰物质少，K⁺、Na⁺、Mg²⁺离子、Tris、葡萄糖和蔗糖、甘油、巯基乙醇、(NH₄)₂SO₄、乙醇、EDTA等均不干扰此测定法。本试剂盒采用改良Bradford法和优化的试剂组成以及优化的测定方案，可对0.5-4000μg/ml浓度范围的蛋白进行线性检测，显著提高了蛋白检测灵敏度。提供的5×染料浓缩液可进行400次标准2ml比色杯检测，或2666次微板检测。

产品组成：

产品名称	2666次	保存条件
5×Coomassie浓缩溶液	100ml	2-8℃
牛血清白蛋白标准品(BSA) 4.0mg/ml溶液	1ml	-20℃

所需设备：

比色计或酶标仪、微板比色仪，工作波长为595nm ± 5 nm (见说明1)。

操作步骤：

一、工作染液配制

用蒸馏水将5×Coomassie浓缩液稀释为500ml 1×染料工作液。稀释的1×染料工作液用普通滤纸过滤除去沉淀，否则可能无法使用。1×染料工作液在4℃避光保存9个月，放置后如由茶色变蓝色可再次过滤。加入反应管前应升到室温，直接使用4℃工作液不影响精度但测得的OD值较低。

二、标准蛋白溶液配制

按照表1和下页说明将标准牛血清白蛋白(BSA, 4mg/ml, -20℃)稀释为需要的浓度。可用双蒸水、0.9%生理盐水、PBS缓冲液或待测蛋白样品的缓冲液稀释。

三、标准曲线制作

取8支干净试管，按下表加样。将试管中溶液充分混匀，放置2min。将溶液分别加入1cm光径的比色皿(或取200μl加入96孔微板)，用分光光度计、酶标仪、微板测量仪测定595nm处的光吸收值OD₅₉₅。用标准蛋白质浓度(μg/ml)为横坐标，用吸光度值OD₅₉₅为纵坐标作图，即得标准曲线。

样品测定与浓度计算

样品测定方法同上(标准曲线制作)。根据标准曲线和测出的未知样品的OD₅₉₅值，查出未知样品的蛋白质浓度。此浓度是与染料工作液混合之前的待测样品中的蛋白浓度。如果样品在与染料工作液混合之前经过稀释，最后估计样品蛋白浓度时须乘以实际稀释倍数。

表 1 几种不同测定方案的加样量和比例

测定方案	超敏感方案		高敏感方案		标准方案	
	微量	标准	微量	标准	微量	标准
测定范围	0.5-50μg/ml		5-500μg/ml		50-2000μg/ml	
微量测定或标准测定	微量	标准	微量	标准	微量	标准
检测管数	2666	400	1400	210	1400	200
加入标准蛋白或待测蛋白样品溶液 μl	150	1000	15	100	3	20
精确加入考马斯亮蓝染料工作液 μl	150	1000	285	1900	297	1980



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

或者为简便操作加入以下近似量 μl			300	2000	300	2000
反应总体积 μl	300	2000	300	2000	300	2000
标准或待测蛋白样品与考蓝工作液的比例	1:1	1:1	1:20	1:20	1:100	1:100

标准测定：反应终体积2ml。用1cm光程玻璃或塑料比色皿，用比色计测定。

微量测定：反应终体积300 μl 。用96孔微板，用酶标仪、微板比色仪测定。

标准方案(50-2000 $\mu\text{g/ml}$)标准曲线的标准蛋白倍比稀释：

标准测定时：30 μl 4000 $\mu\text{g/ml}$ BSA + 30 μl 稀释溶液($\text{H}_2\text{O}/\text{PBS}/0.9\%\text{NaCl}$) = 60 μl (BSA=2000 $\mu\text{g/ml}$)，取30 μl 连续倍比稀释7次，得到BSA标准溶液2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 $\mu\text{g/ml}$ 。每一稀释度标准溶液各取20 μl ，与1980 μl 或者2000 μl 染料工作液混合。

微量测定时：5 μl 4000 $\mu\text{g/ml}$ BSA + 5 μl 稀释溶液($\text{H}_2\text{O}/\text{PBS}/0.9\%\text{NaCl}$) = 10 μl (BSA=2000 $\mu\text{g/ml}$)，取5 μl 连续倍比稀释7次。得到BSA标准溶液2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 $\mu\text{g/ml}$ 。每一稀释度标准溶液各取3 μl ，与297或300 μl 蓝染料工作液混合。

高敏感方案(5-500 $\mu\text{g/ml}$)标准曲线的标准蛋白倍比稀释：

标准测定时：37.5 μl 4000 $\mu\text{g/ml}$ BSA + 262.5 μl 稀释溶液($\text{H}_2\text{O}/\text{PBS}/0.9\%\text{NaCl}$) = 300 μl (BSA=500 $\mu\text{g/ml}$)，取150 μl 连续倍比稀释7次。得到BSA标准溶液500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.813、3.907 $\mu\text{g/ml}$ 。每一稀释度标准溶液各取100 μl ，与1800 μl 或者2000 μl 染料工作液混合。

微量测定时：3.75 μl 4000 $\mu\text{g/ml}$ BSA + 26.25 μl 稀释溶液($\text{H}_2\text{O}/\text{PBS}/0.9\%\text{NaCl}$) = 30 μl (BSA=500 $\mu\text{g/ml}$)，取15 μl 连续倍比稀释7次。得到BSA标准溶液500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.813、3.907 $\mu\text{g/ml}$ 。每一稀释度标准溶液各取15 μl ，与285 μl 或者300 μl 染料工作液混合。

超敏感方案(0.5-50 $\mu\text{g/ml}$)标准曲线的标准蛋白倍比稀释：

标准测定时：37.5 μl 4000 $\mu\text{g/ml}$ BSA + 2962.5 μl 稀释溶液($\text{H}_2\text{O}/\text{PBS}/0.9\%\text{NaCl}$) = 2000 μl (BSA=50 $\mu\text{g/ml}$)，取1000 μl 连续倍比稀释7次。得到BSA标准溶液50、25、12.5、6.25、3.125、1.563、0.782、0.391 $\mu\text{g/ml}$ 。每一稀释度标准溶液各取1000 μl ，与1000 μl 染料工作液混合。

微量测定时：3.75 μl 4000 $\mu\text{g/ml}$ BSA + 296.25 μl 稀释溶液($\text{H}_2\text{O}/\text{PBS}/0.9\%\text{NaCl}$) = 300 μl (BSA=50 $\mu\text{g/ml}$)，取150 μl 连续倍比稀释7次。得到BSA标准溶液50、25、12.5、6.25、3.125、1.563、0.782、0.391 $\mu\text{g/ml}$ 。每一稀释度标准溶液各取150 μl ，与150 μl 染料工作液混合。

注意事项：

1. 分别在工作波长为595nm和450nm测定OD值，计算OD594/OD450，以此代替原有的OD595作图，可明显提高检测的精确度和灵敏度约10倍，显著提高测定的线性关系，并降低去垢剂的影响。在进行超敏感度测定时可考虑此法。
2. 主要干扰物质的终浓度：SDS<0.002%；Triton X-100<0.1%；Tween-20/60/80<0.015%；NaOH<0.1N。
3. 蛋白-染料结合物在1小时内保持稳定，但在5-20分钟内稳定性最好，因此应尽快测定。如果放置过久将出现沉淀，或使测定结果偏低。
4. 染料不结合精氨酸、赖氨酸及分子量小于3kDa的短肽，所以不同的蛋白质由于精氨酸和赖氨酸含量不同会出现小范围的测量偏差；小于3kDa的短肽纯品不能用此方法测定。
5. 染料-蛋白结合物附着在石英比色皿后难以洗去，因此不宜使用石英比色皿。可用玻璃或塑料比色皿，用后立即用95%乙醇或洗涤剂浸泡洗涤。塑料比色皿不可用乙醇长时间浸泡。
6. 标准曲线应该每次新做。但每一稀释度的BSA标准品可预先配好-20° C冻存备用，注意在使用这种非新鲜配制的BSA时，如果发现标准曲线的某一些点偏差较大，说明稀释的BSA已经坏掉应予重配。

有效期：9个月。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com