



生物化学实验

生物大分子定量测定技术

3.6 蛋白质定量测定: Bradford法

北京大学 王青松 胡晓倩

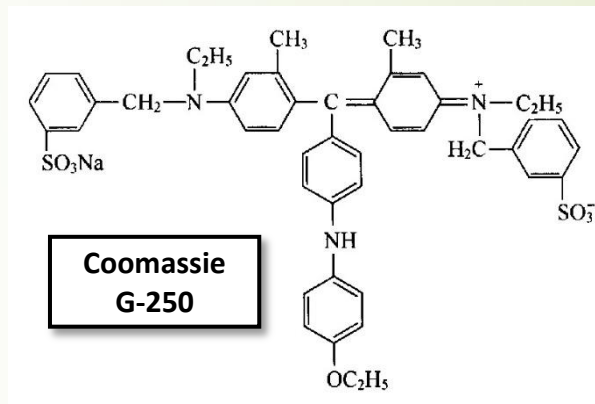
概述

- 1976年，Bradford首次报道了利用考马斯亮蓝G-250（Coomassie Brilliant Blue G-250，简称CBBG-250）与蛋白质结合的定量测定微量蛋白质的方法，称为Bradford法。
- 该方法试剂配制简单，操作简便快捷，干扰因素少，反应灵敏度高，是目前生物化学实验室快速测定微量蛋白质浓度的常用方法。

实验原理

- 考马斯亮蓝G-250存在着红色和蓝色2种颜色形式，在游离状态下呈现红色，最大光吸收值在465 nm，当它与蛋白质通过范德华力结合生成蛋白质-CBBG结合物后，颜色由红色转变成蓝色，最大吸收峰由465 nm变成595 nm。
- 在一定蛋白质浓度范围内，蛋白质和染料的结合符合比尔定律（Beer's law），蛋白质-CBBG结合物的吸光值与蛋白质含量成正比，通过测定595 nm处吸光值的增加量可以得到与其结合的蛋白质的量，因此可用于蛋白质的定量测定。

蛋白质



蛋白质-染料结合物

Blue

实验目的

1. 学习Bradford法测定蛋白质浓度的原理和方法
□ □ □ □ □ □ □ □
2. 学会基于微孔板和酶标仪进行蛋白质定量测定的实验操作
□ □ □ □ □ □ □ □
3. 掌握如何制作蛋白质定量测定的标准曲线
□ □ □ □ □ □ □ □
4. 掌握酶标仪的使用方法
□ □ □ □ □ □ □ □

□ □ □ □ □ □ □

实验样品/试剂/器材

牛血清白蛋白标准液
(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

待测蛋白样品溶液

考马斯亮蓝G-250溶
液 (Bradford试剂)

样品/试剂/
器材

酶标仪

可调式移液器

8孔酶标条

微孔板比色法测定加样表

- 每人取2条8孔酶标条或1块96孔酶标板，按下表平行操作

	标准曲线						
孔号	1	2	3	4	5	6	7 (待测样品)
标准蛋白质溶液/ μL	0	4	8	12	16	20	—
待测蛋白质溶液/ μL	—	—	—	—	—	—	5
0.9% NaCl / μL	20	16	12	8	4	0	15
考马斯亮蓝G-250/ μL	200	200	200	200	200	200	200
每加入1孔考马斯亮蓝试剂用枪头轻轻吸吹2~3次，使反应溶液混合均匀，全部加完后， 室温放置5 min，用酶标仪测定吸光值。							
$A_{595\text{nm}}(1)$							
$A_{595\text{nm}}(2)$							
$A_{595\text{nm}}$							

操作步骤

1. 取2条8孔酶标条或1块96孔酶标板，按照表格加入一定体积的标准蛋白溶液和待测样品

2. 用生理盐水将各孔的体积定容到20 μ L

3. 加入200 μ L的考马斯亮蓝G-250溶液，吸吹混匀

4. 室温放置5 min

5. 用酶标仪测定各孔的读数（波长 595 nm）

视频

北京大学生命科学学院

实验数据处理

- 绘制标准曲线

计算出每孔标准蛋白质 $A_{595\text{ nm}}$ 的平均值，扣除空白孔的吸光值，以其为纵坐标，每孔标准蛋白质含量（ μg ）为横坐标，在坐标纸上绘制标准曲线。

- 计算待测样品溶液的蛋白质浓度

用扣除空白孔后的待测样品蛋白质的 $A_{595\text{ nm}}$ 在标准曲线上查出其对应的蛋白质含量，根据实验中所加入待测蛋白质溶液的体积计算出其浓度（ $\mu\text{g/mL}$ 或 mg/mL ）。

注：可用excel作图法绘制标准曲线并计算样品的蛋白质浓度

详见：3.7 标准曲线制作与蛋白质浓度计算

注意事项

- 1. 测定中加入待测样品溶液的体积**应使其测定值在标准曲线范围内**
- 2. 此方法干扰物少，有少量干扰试剂时需用适当的缓冲液扣除干扰因素
- 3. 去污剂（如SDS、Triton X-100、Tween 20）的干扰不易消除
- 4. 注意加样顺序和平行操作
- 5. 微孔板比色法测定时，加入反应试剂后用移液器吸头**轻轻吸吹2~3次，避免产生大量气泡**，测定前注意微孔内溶液不能有气泡