

5×考马斯亮蓝 G-250(蛋白定量用)

货号: AC13857

规格: 100mL/500mL

保存: 开封使用后请密封保存, 本试剂盒自订购之日起九个月内有效。

产品简介:

考马斯亮蓝 G-250 染料, 在酸性溶液中与蛋白质结合, 使染料的 λ_{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%。含去垢剂的样品推荐使用 ACMEC 的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒。

自备试剂:

PBS、BSA 标准品(5mg/ml)

操作说明:

一. 微孔酶标仪法

1. 完全溶解蛋白标准品, 取 10ul, 稀释至 250ul, 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×G250 染色液使用前请颠倒 3-5 次混匀, 取 1ml 5×G250 染色液, 加入 4ml 双蒸水, 混匀成 1×G250 染色液, 此 1×G250 染色液可在 4℃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×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:

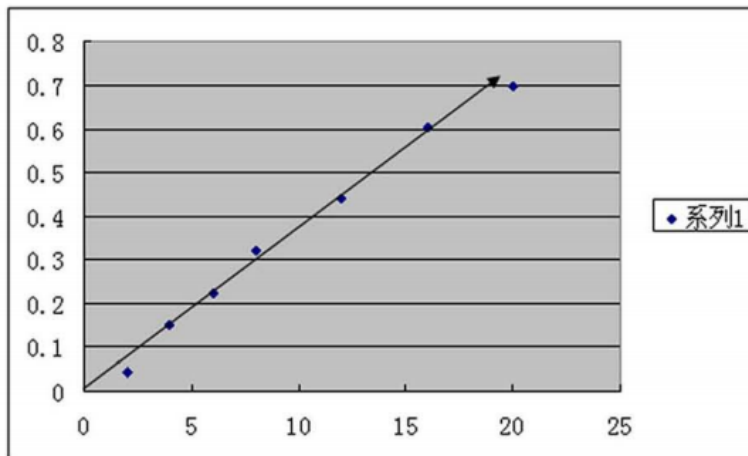
1. 取八支(或者更多)干净的 10ml 离心管, 标记上号。
2. 取 100ulBSA 加入 PBS 2.4ml 稀释至终浓度为 0.2mg/ml。
3. 5×G250 染色液使用前请颠倒 3-5 次混匀, 取 10ml 5×G250 染色液, 加入 40ml 双蒸水, 混匀成 1×G250 染色液, 此 1×G250 染色液可在 4℃保存一周。

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	0ul	100ul	200ul	300ul	400ul	500ul	500ul 适当稀释的样品 1	500ul 适当稀释的样品 2
PBS	500ul	400ul	300ul	200ul	100ul	0ul	0ul	0ul	0ul
1×G250 染色液	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	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