

UV/Visible Spectroscopy



使用LAMBDA UV/Vis 分光光度计测定 总蛋白: Bradford法

介绍

总蛋白的定量方法是一种建立最久的基础且重要的生物科学实验。UV/Vis分光光度计被广泛用于蛋白的测定。本应用报告描述了经典的蛋白方法，Bradford法。使用LAMBDA 464 UV/Vis

分光光度计快速获取数据，并使用UV Lab软件进行分析。

原理

酸性溶液中，考马斯亮蓝和样品中的蛋白组分结合。结果造成该染料的最大吸收从465nm红移到595nm。595nm的吸光度和蛋白的含量成正比。

本方法中, 颜色反应非常快, 可在2分钟内完成, 并保持1小时稳定。Bradford方法比Lowry方法更加灵敏, 使用微量法可以测量1~20μg的蛋白。并且Bradford方法更快, 并几乎不受非蛋白组分的干扰。

试剂和仪器

- 1、Bradford试剂
考马斯亮蓝G-250染料、磷酸和甲醇的混合溶液, 使用去离子水进行5倍稀释并过滤。该稀释的溶剂可以稳定2周。
- 2、蛋白标准物-牛血清丙种球蛋白 (或者牛血清清蛋白-BSA)
0.1mg/ml
- 3、未知蛋白
- 4、盐溶液 (8.5g/l)
- 5、LAMBDA 465 UV/Vis分光光度计
- 6、UV Lab软件
- 7、比色皿 (10mm光程)

实验过程

- 1、准备蛋白溶液: 依照表1, 在7个试管中混合蛋白和盐溶液。
- 2、加入5.0ml去离子Bradford试剂到标准溶液和未知样品中, 混匀并静置5分钟。
- 3、在软件的定量模式的方法文件中, 选择Bradford方法。
- 4、在定量标准模式, 测量标准品2到6相对标准品1在595nm的吸光度。在1小时之内完成。
- 5、在定量样品模式, 测量未知样品 (样品7)。
- 6、制作标准品吸光度相对浓度的曲线。
- 7、计算未知样品的浓度。

仪器参数

LAMBDA 465的仪器参数如下设置:

实验设置

数据类型: 吸光度
采样: 单池
模式: 快速 (光谱数: 1/扫描数: 50/积分数: 1/增益数: 1)

实验方法

定量方法: Bradford方法
使用波长: 595nm
曲线维度: 1

表1、蛋白标准品的浓度

Reagent	Test Tube No.					
	1	2	3	4	5	6
0.1 mg/ml Standard Protein (ml)	0	0.1	0.4	0.6	0.8	1
Saline Solution (ml)	1	0.9	0.6	0.4	0.2	0
Concentration (ug/ml)	0	10	40	60	80	100

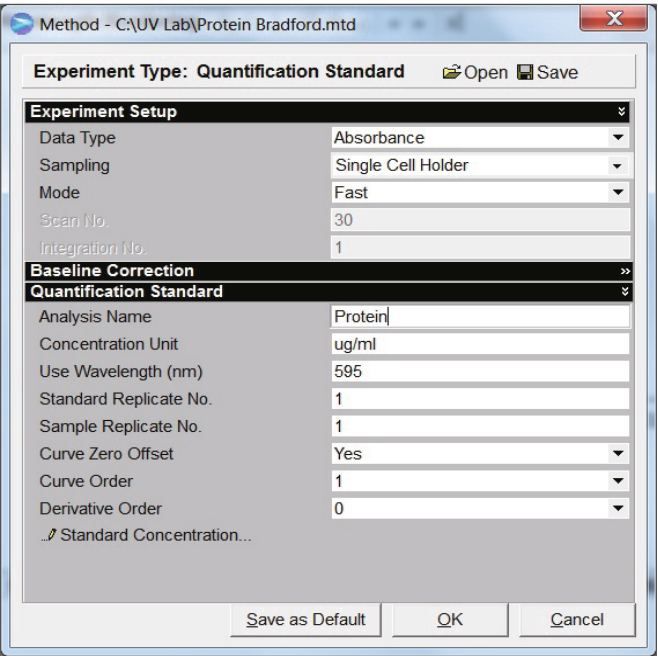


图1、Bradford方法的实验设置

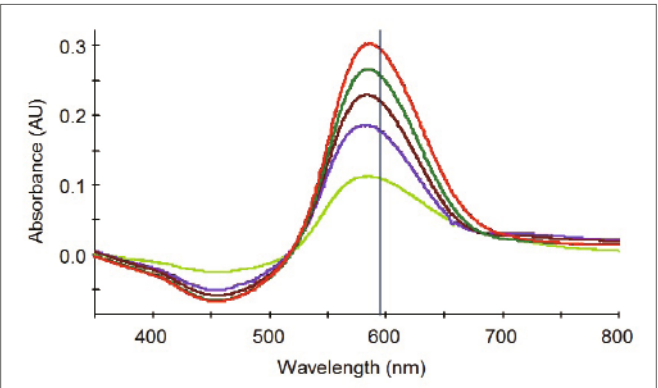


图2、Bradford方法的谱图

结果

LAMBDA 465的仪器参数如下设置:

1、校准曲线

图2显示了蛋白标准溶液的光谱, 图3显示了得到的校准曲线。曲线的相关系数R²是0.99885。

2、未知蛋白样品

基于校准曲线, 未知样品的浓度计算结果为65.39mg/ml, 见表2。

表2、未知样品的浓度

公式: $Y=0.0021X+0.0933$
 $R^2=0.9988$

Name	Concentration (µg/ml)	Dilution Factor	Au (595.00) nm
Sample 1	65.39	1.0	0.2279

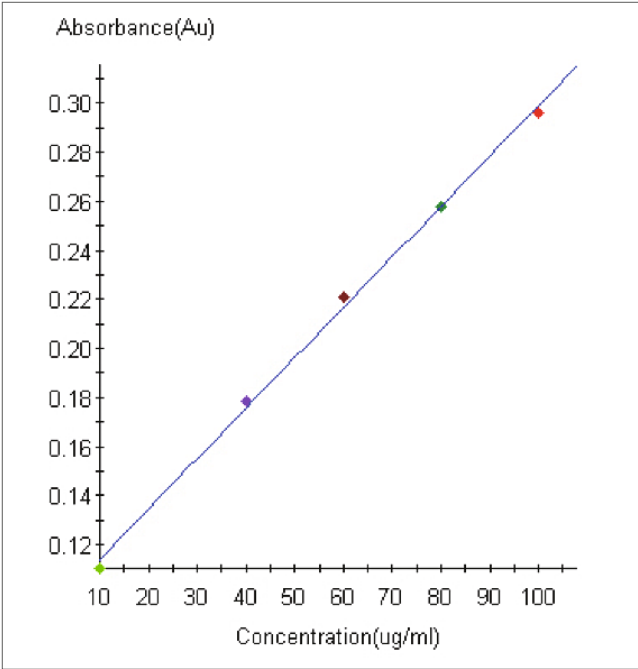


图3、Bradford方法的校准曲线

结论

使用LAMBDA 465 UV/Vis分光光度计和UV Lab软件, 进行了蛋白的定量分析。光谱快速采集, 并且灵敏度很高。UV Lab软件的定量模式有效的进行了数据处理和定量分析。

珀金埃尔默企业管理（上海）有限公司
地址：上海 张江高科技园区 张衡路1670号
邮编：201203
电话：021-60645888
传真：021-60645999
www.perkinelmer.com.cn



要获取全球办事处的完整列表，请访问[http:// www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs](http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs)

版权所有 ©2014, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自持有者或所有者的财产。