

Bradford 蛋白定量实验方案 (中文翻译)

原文标题: Bradford Assay with Pierce™ Bradford Protein Assay Kit

说明: 以下内容为对原始实验文档的忠实中文翻译, 并在每一步后补充“本步目的”, 便于理解实验设计。凡原文未给出的数值或条件, 均不擅自补充。

一、标准液

由白蛋白 (BSA) 储备液配制以下标准液, 用于 **100–1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$** 的工作范围。

原文表题: *Dilution scheme for standard test tube and microplate protocols (working range = 100–1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)*

管号	稀释液体积	BSA 体积及来源	最终 BSA 浓度
A	0	300 μL 储备液	2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
B	125 μL	375 μL 储备液	1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
C	325 μL	325 μL 储备液	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
D	175 μL	175 μL B 管稀释液	750 $\mu\text{g}/\text{mL}$
E	325 μL	325 μL C 管稀释液	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
F	325 μL	325 μL E 管稀释液	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
G	325 μL	325 μL F 管稀释液	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$
H	400 μL	100 μL G 管稀释液	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
I	400 μL	0	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (空白)

由上述标准储备液进一步配制 **1:5 稀释液** 作为工作液 (例如: 取 10 μL 标准储备液, 加 40 μL dH_2O)。

本步目的: 制备一系列已知浓度的蛋白标准品, 以建立标准曲线, 从而推算未知样品的蛋白浓度; 其中空白管用于背景扣除。

二、96 孔板实验流程

1. 在通风橱内操作, 并佩戴手套。

本步目的: 保证实验安全, 减少与试剂直接接触的风险, 同时降低样品污染概率。

2. 将 **Coomassie Bradford Protein Assay Reagent (4°C 冰箱保存)** 用 dH_2O 按 **1:5 稀释**。 例如: 3 mL Coomassie Bradford Protein Assay Reagent 加 12 mL dH_2O ; 每个样品需要 250 μL 稀释后的试剂。

本步目的：将显色试剂稀释到适用于 96 孔板检测的工作浓度，并估算每孔所需体积，以便提前准备足量试剂。

3. **取所需体积的 Coomassie Bradford Protein Assay Reagent，先恢复至室温，再加入 dH₂O，轻轻混匀。**

本步目的：使试剂温度稳定，减少温度差导致的显色偏差，并通过轻柔混匀保证试剂均一。

4. **向对应孔中加入 5 μL 各标准品或未知蛋白样品，然后向每孔加入 250 μL 稀释后的 Coomassie Bradford Protein Assay Reagent。**

本步目的：使蛋白与 Bradford 染料结合并发生显色反应；标准品用于建曲线，未知样品用于浓度测定。

5. **轻柔吹打混匀。**

本步目的：确保样品与试剂充分接触，使各孔反应一致，提高重复性。

6. **室温孵育 10 分钟。**

本步目的：给予染料与蛋白充分结合和颜色稳定的时间，从而获得可靠吸光度读数。

7. **使用酶标仪在 595 nm 测定吸光度（2 楼设备）。**

本步目的：595 nm 是 Bradford 法常用检测波长，用于定量分析蛋白-染料复合物形成后的吸光信号。

8. **分光光度计信息：** Molecular Devices, Spectra max PLUS；需通过 ClusterMarket 预约。

本步目的：明确仪器型号和预约方式，保证实验当天可顺利完成检测。

9. **选择在吸光度测定前带振荡（shaking）的测定方法。**

本步目的：在读数前进一步均匀孔内液体，减少沉降、分层或加样不均对结果的影响。

10. **用空白孔在 595 nm 的平均吸光度，对所有其他标准品或未知蛋白样品的吸光度进行扣除。**

本步目的：去除背景信号与试剂本底影响，使结果更准确地反映蛋白本身引起的显色强度。

11. **以每个 BSA 标准品经空白校正后的 595 nm 平均吸光度对其浓度（μg/mL）作图，建立标准曲线；据此确定各样品的蛋白浓度。**

本步目的：通过已知标准与吸光度之间的关系，将未知样品的吸光值换算为实际蛋白浓度。

三、96 孔板布局（按原文整理）

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	B	C	D	E	F	G	H				
B	A	B	C	D	E	F	G	H				

C	A	B	C	D	E	F	G	H				
D												
E												
F												
G												
H												

注：上表按原文表格直接转写。A-H 很可能对应不同标准品/样品组，A-C 行可能为重复孔，但原文未进一步解释。