

蛋白提取基础知识

蛋白质参与生物体内几乎所有的生命活动，对蛋白质的研究有助于揭示生命活动现象和分子生物学机理，蛋白质的提取是研究蛋白质的第一步，通常是提取特定组织细胞中的总蛋白，或是处于细胞特定位置的蛋白质，蛋白质提取实验的成败，直接影响后续的蛋白质检测和提纯等实验操作。

蛋白质提取样品来源分类：

根据组织和细胞不同来源，蛋白提取可分为动物蛋白提取、植物蛋白提取和微生物蛋白提取。动物组织大多柔软，细胞膜由磷脂双分子层为骨架构成，细胞易于破碎；植物组织细胞被多层纤维组成的细胞壁包裹，不容易研磨破碎；微生物主要是细菌和酵母菌，两者的细胞壁主要成分是肽聚糖和酵母纤维素。因不同物种细胞结构的差别，细胞破碎需要相适应的提取方法。根据是否使用外加作用力，常用破碎方法分为机械破碎和非机械破碎两类，详细见下表：

分类	作用机理	适用范围
机械法	珠磨法	固体剪切作用：利用固体间研磨剪切力和撞击使细胞破碎。 较高效的物理破碎方法，同时适用于实验室和大规模操作，主要用于微生物细胞的破碎。
	高压匀浆法	液体剪切作用：利用高压使细胞悬液以告诉喷出撞击，在撞击力和剪切力等综合作用下破碎 可达较高破碎率，适合大规模操作，主要应用于酵母和细菌细胞，不适合丝状菌和革兰氏阳性菌使用。
	超声破碎法	液体剪切作用：在超声波作用下液体会发生空化作用，空穴的形成、增大和闭合产生极大的冲击波和剪切力，是细胞破碎。 主要适用于实验室使用，适用于大多数微生物的破碎，破碎过程产生大量热量，升温剧烈，需加装冷却装置。
	撞击破碎法	固体剪切作用：将细胞冷冻使其成为刚性球体，在通过撞击，是细胞破碎只利用撞击力，细胞破碎均匀，可避免细胞内部结构的破碎，适用于细胞器回收，主要应用于微生物细胞和

		胞破碎。	植物细胞的破碎。
非机械破碎法	酶溶法	酶分解作用：利用特定酶对细胞壁的溶解能力，是细胞壁被溶解破坏，再利用其它方法破坏细胞膜，是细胞破碎。	酶融法具有专一性，条件温和，但一般酶的价格高，不合适大规模操作，酶溶后的细胞浆液分离困难。
	化学法	改变细胞膜渗透性：化学方法可分为酸碱处理、有机溶剂处理和去垢剂处理，利用化学试剂是细胞破碎。	化学方法总释放率低，但选择性高，可提取特定位置蛋白，有效抑制核酸的释放。
	渗透压法	渗透压剧烈改变：利用介质的高渗透压，使细胞失水后突然改变环境，使细胞膨胀破裂。	破碎效率低，适用于不具有细胞壁和细胞壁强度弱的细胞破碎。
	冻融法	反复冻结-融化：冷冻过程中细胞膜的疏水键结构容易破裂，增加细胞亲水性，是细胞破碎。	破碎效率低，适用于细胞膜强度弱的细胞。

动物细胞因细胞膜强度弱易于提取，在实验室中应用于动物细胞提取的机械法主要有玻璃匀浆器和手持式组织研磨器进行研磨和匀浆，也有更加自动化的自动组织研磨仪器，每一种研磨仪器各有利弊，选择何种方式主要取决于实际操作经验。其中手持组织研磨器使用简便，可适用于多种动物组织脏器的研磨，性价比高，应用广泛。非机械破碎法主要是通过冻融、去垢剂裂解、渗透压等方法。实际应用时大多是多种破碎方法相结合使用，例如动物组织的结构致密，一般需要先研磨成浆液，然后再利用去垢剂溶解提取蛋白质。



玻璃匀浆器



手持式组织研磨仪



自动组织研磨仪



液氮冷冻研磨仪

图中展示是实验室常用组织和细胞研磨仪器

Meilunbio®细胞裂解液产品介绍

化学法中的去垢剂裂解是在提取动物蛋白时常用的提取方法，该方法可以通过不同去垢剂的组合高效提取蛋白质，或是通过不同去垢剂的先后使用，达到提取特定位置蛋白质的目的，我公司精心研制了多种细胞裂解产品，产品信息如下：

RIPA 裂解液

RIPA 裂解液是裂解哺乳动物细胞和组织的常用试剂，Meilunbio®基于经典配方推出了RIPA 裂解液（强）（货号：MA0151）、RIPA 裂解液（中）（货号：MA0152）和RIPA 裂解液（弱）（货号：MA0153）三种 RIPA 裂解液产品，RIPA 裂解液提取的蛋白主要应用于 SDS-PAGE 实验，三种 RIPA 裂解液含有相同的 pH 缓冲剂和盐离子浓度，三者的不同主要是去垢剂的种类和浓度，具体操作步骤可参考产品说明书。详细信息见下表：

产品名称	RIPA 裂解液（强） （货号：MA0151）	RIPA 裂解液（中） （货号：MA0152）	RIPA 裂解液（弱） （货号：MA0153）
去垢剂种类及浓度	1%TritonX-100, 1%deoxycholate, 0.1% SDS	1%NP-40, 0.5%deoxycholate, 0.1% SDS	1%NP-40, 0.25%deoxycholate
对蛋白样品的裂解程度	强	中	弱
对蛋白样品的裂解时间	3-5min	5-7min	5-10min
主要用途	SDS-PAGE , Western , IP	SDS-PAGE , Western , IP	SDS-PAGE , Western , IP 及 COIP

NP-40 裂解液和 Western 及 IP 细胞裂解液

NP-40 裂解液 (货号:MA0156) 主要成分是 50mMTris(pH7.4), 150mMNaCl, 1%NP-40 和多种蛋白酶抑制剂, 而 Western 及 IP 细胞裂解液 (货号:MB9900) 主要成分为 20mMTris (pH7.5), 150mMNaCl, 1% Triton X-100 和多种蛋白酶抑制剂, 两种裂解液的区别实际上是去垢剂 NP-40 和 Triton X-100 的区别。具体操作步骤可参考产品说明书。

细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒

细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒 (货号:MA0211) 提供了一种简单、方便的从培养细胞或新鲜组织中抽提核蛋白与浆蛋白的方法。约 90 分钟就可以完成培养细胞的核蛋白与浆蛋白的分离。抽提得到的蛋白为非变性、有活性的, 可以用于 Western、EMSA、footprinting、报告基因检测以及酶活力测定等后续操作。

本试剂盒的抽提原理是, 在低渗透压条件下, 细胞会膨胀细胞膜破碎, 释放出浆蛋白, 然后通过离心得到细胞核沉淀。最后通过高盐试剂抽提得到核蛋白。具体操作步骤可参考产品说明书。

以上细胞裂解液产品的核心是去垢剂, 以下是对去垢剂的详细介绍。

去垢剂简介

去垢剂也称为表面活性剂, 是双极性分子, 如图 1 所示去垢剂同时包含亲水和疏水区域, 除胆酸盐以外, 去垢剂分子基本是由线性或带有分枝的碳氢化合物尾部和结构各不相同的亲水性头部组成。



图 1. a 图为去垢剂单体的一般结构示意图, b 图为阴离子去垢剂——烷基硫酸盐的分子结构, 碳长链为疏水区域, 硫酸根为亲水区域。

生物医学实验中使用的去垢剂一般是温和型, 通过覆盖细胞膜蛋白的疏水区或穿膜区, 破坏蛋白质与蛋白质、蛋白质与脂质和脂质与脂质之间的缔合, 使其能够与水性缓冲液相溶, 另外, 某些去垢剂可以防止免疫化学测定和蛋白质结晶中的非特异性结合。

在水溶液中低浓度的去垢剂在气液界面形成单层, 当去垢剂在水溶液中浓度升高, 去垢剂的单体会聚集形成胶束, 胶束中去污剂分子的数量称为聚集数, 去垢剂疏水区的长度与疏水的强度成正比, 所以同种去垢剂的疏水强度在不同溶液环境内是恒定的, 而带电荷

的亲水性头部，会被温度、pH 值和离子强度，以及多价金属离子影响，从而间接影响了去垢剂的性质，在给定温度下观察到的形成胶束的最小去垢剂浓度称为临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)，临界胶束浓度是去垢剂与疏水蛋白结合形成微胶粒时的最低浓度。在使用去垢剂增溶蛋白质时，一般在使用其临界胶束浓度的 10-20 倍时，能达到最好的增容效果。图 2 所示为去垢剂向细胞膜渗透溶解的示意简图。

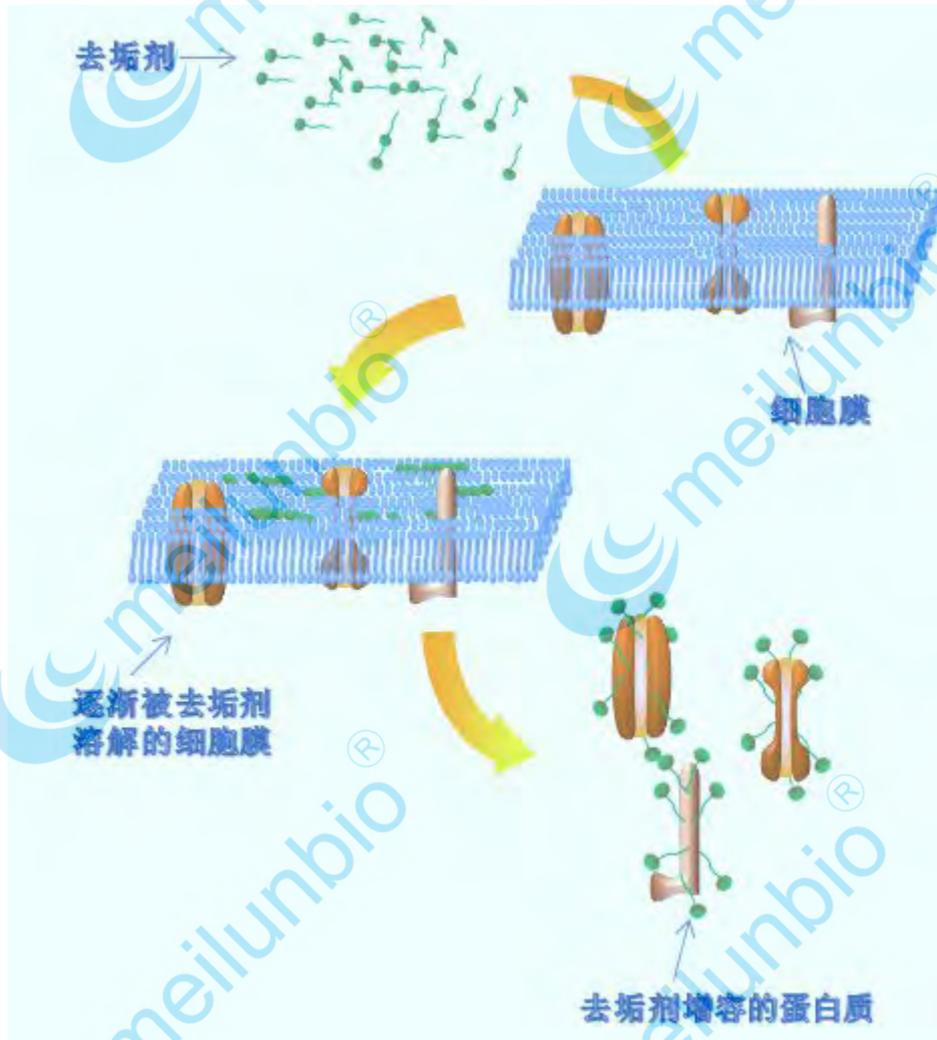


图 2.去垢剂渗透溶解哺乳动物细胞膜示意图。

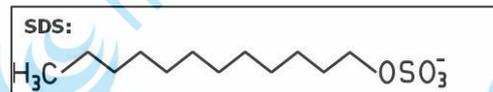
去垢剂根据其特性可以分为三类：离子型去垢剂（包括阴离子型和阳离子型），非离子去垢剂，以及两性离子去垢剂。去垢剂的详细信息请见下表：

去垢剂	分类	单体分子质量 (Da)	分子团大小 (KDa)	CMC (mM) 25°C	浊点	是否可透析

SDS	阴离子型	288.5	18	7-10	>100	是
Triton X-100	非离子型	约 625	90	0.2-0.9	64	否
NP-40	非离子型	约 617	149	0.059	80	否
CHAPS	两性离子型	615	6	6-10	>100	是
CHAPSO	两性离子型	631	7	8-10	90	是
脱氧胆酸钠	阴离子型	414.55	4.2	1-1-2	-	-
Tween20	非离子型	1230	-	0.06	95	否
Tween80	非离子型	1310	76	0.01	-	否

常用去垢剂用途详解：

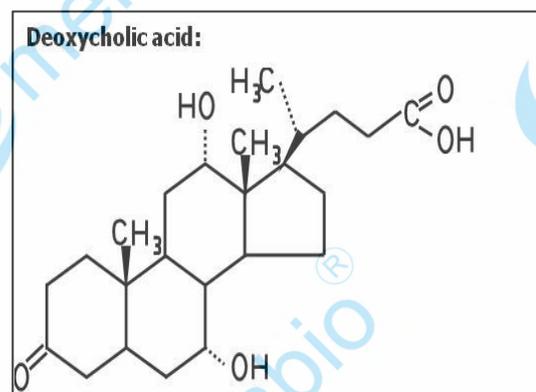
十二烷基硫酸钠 (SDS)：



十二烷基硫酸钠是阴离子型去垢剂，它可以增容大多数的蛋白质，可以破坏蛋白质内部和蛋白质之间的非共价键，使蛋白质丧失天然构象和功能。SDS 以 1.4:1 (W/W) 的比率与蛋白质结合 (相当于两个氨基酸对应一个 SDS 分子)，两者结合后会掩盖蛋白质的电荷，也就是说 SDS 会为所有蛋白质增加一个整体的负电荷，这一现象被应用于聚丙烯酰胺凝胶电泳实验 (SDS-PAGE)。需要注意的是 SDS 在低温时 (4℃) 会沉淀，而且在含钾离子的缓冲液和硫酸铵的缓冲液中使用 SDS 室温下易发生沉淀。

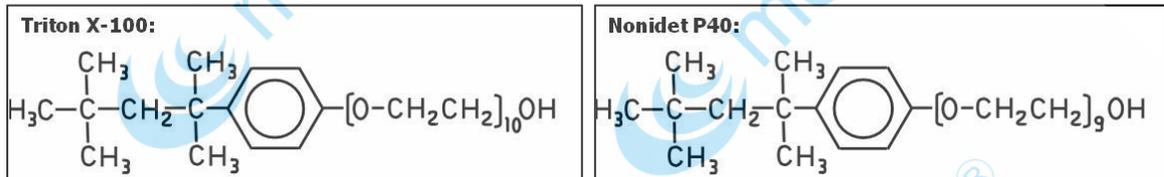
脱氧胆酸钠 (Deoxycholic acid)：

脱氧胆酸钠为阴离子型去垢剂，与其他离子型去垢剂相比其对蛋白质的变性作用较弱，通常用于破坏细胞膜和提取膜蛋白。脱氧胆酸钠的 pKa 值为 8-9，在 pH 低于 7.5 时，去垢剂分子的酸性形式将发生沉淀，还有二价阳离子也可使脱氧胆酸钠发生沉淀。脱氧胆酸钠胶束分子团较小，在后续操作中可以通过透析将其从样品中去除，有助于蛋白质的定量和后续分析。



TritonX-100 和 Nonidet-P40 (NP-40)：

TritonX-100 和 Nonidet-P40 两种都属于 Triton 系列非离子去垢剂，在 1%浓度时许多蛋白质的活性保持不变。两者非常相似，仅在每个胶束的单体数量(TritonX-100:9.6; Nonidet-P40:9.0)和基于 PEG 的头端基团的大小分布上有区别。TritonX-100 增容膜蛋白的能力稍强于 NP-40，需注意 TritonX-100 在 280nm 处有强的吸收值，而 NP-40 在 280nm 处有较弱的吸收值，NP-40 更适用于蛋白分离纯化中使用。



在组织研磨和蛋白溶解的过程中，会使本身存在于细胞特定区域的内源性蛋白酶和磷酸酶释放游离出来，这会导致已经提取出来的蛋白质被降解和去磷酸化，所以需要在提取蛋白质过程中迅速的抑制蛋白酶。在蛋白质提取过程中，要加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂，抑制蛋白酶和磷酸酶活性，保证提取蛋白的稳定性。目前市面上各种蛋白酶抑制剂和蛋白酶抑制剂组合种类很多。

常用蛋白酶抑制剂如下表：

蛋白酶抑制剂名称及货号	PMSF (MA0001)	EDTA (MB2514)	胃蛋白酶抑制剂 (pepstatin) (MB3064)	亮抑蛋白酶肽 (leupeptin) (MB3063)	胰蛋白酶抑制剂 (aprotinin) (MB2850)
抑制的蛋白酶名称	丝氨酸蛋白酶和巯基蛋白酶	金属蛋白水解酶	酸性蛋白酶 如为蛋白酶、血管紧张肽原酶、组织蛋白酶 L 和凝乳酶	丝氨酸和巯基蛋白酶， 如木瓜蛋白酶、血浆酶和组织蛋白酶 B	丝氨酸蛋白酶，如血浆酶，血管舒缓素，胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶
工作浓度	0.1-1.0mmol/L	0.5-1.5 mmol/L	1μmol/L	0.5mg/mL	0.06-2.0μg/mL (0.01-0.3μmol/L)
常用溶剂及母液浓度	异丙醇 (10mg/ml)	水溶液 (0.5mol/L)	甲醇 (1mg/ml)	水溶液 (10mg/ml)	水溶液 (10mg/ml)

稳定性	室温可保存一年	4℃可保存6个月以上	4℃一周内有效, -20℃稳定6个月	4℃一周内有效, -20℃稳定6个月	4℃一周内有效, -20℃稳定6个月
-----	---------	------------	--------------------	--------------------	--------------------

以上是常用蛋白酶抑制剂的基本信息, 蛋白酶抑制剂种类较多, 单独配制和使用会花费大量时间和精力, 可以尝试购买商品化的蛋白酶抑制剂混合试剂, 基本是使用 DMSO 配制的 100×浓缩液, 以上介绍的蛋白酶和磷酸酶抑制剂以及混合物我公司均有销售。

蛋白定量基础知识

蛋白质的精确定量是蛋白质相关实验所必需的，蛋白质定量可以分为总蛋白定量和单种蛋白定量，总蛋白定量分析有多种不同方法，包括紫外吸光值检测法、Lowry 检测法、BCA 检测法和 Bradford 检测法等。单种蛋白定量主要包括酶联免疫吸附实验 (ELISA)、Western blot 和质谱分析等。本部分内容主要介绍总蛋白定量相关内容。

1. 280nm 紫外吸收法

因为芳香族氨基酸、酪氨酸 (Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸 (Phe) 残基在 280nm 有强吸收值，其吸收值与蛋白浓度成正比，所以可以通过在 280nm 处的吸光值来间接计算总蛋白质浓度。如果一种蛋白质中没有上述氨基酸残基，则不能使用此方法检测总蛋白浓度。这种方法简单快速，所需样品量小，对蛋白质没有破坏性，一般应用于蛋白纯化中检测蛋白质的洗脱峰。

2. 二喹啉甲酸 (BCA) 检测法

BCA 检测法是在 1985 年由 Pierce Chemical 公司发明的，与 Lowery 检测法的原理相同，是 Lowery 检测法的改进方法。在碱性环境中蛋白质分子中的肽键结构能与 Cu^{2+} 生成络合物，同时将 Cu^{2+} 还原成 Cu^{1+} ，BCA 也可以特异地与 Cu^{1+} 结合，两个 BCA 分子可以和一个 Cu^{1+} 发生络合反应生成稳定的有颜色的复合物，在 562nm 处有高的光吸收值。 Cu^{2+} 被还原的数量是蛋白质浓度的成正比，而 Cu^{1+} 与 BCA 的复合物与 562nm 处的吸光值成正比，所以可根据吸收值的大小来计算蛋白质的浓度，然后通过已知蛋白浓度的标准品估算未知样品中蛋白质含量。

BCA 检测方法具有试剂种类少，终产物单一，与其他检测法相比干扰物质很少的优点，尤其是对在蛋白质提取实验中广泛使用的去垢剂具有很强的兼容性，一般溶液中去垢剂浓度小于 5% 时，都可以使用 BCA 测定蛋白质浓度。

BCA 检测法的干扰物质主要是能够影响铜离子的氧化还原，以及影响铜一价和二价离子在溶液内浓度的物质，包括金属螯合剂、还原剂 (如二硫苏糖醇 (DTT)，2-巯基乙醇 (BME)，TCEP 和其他二硫键还原剂)、以及一些具有还原性质的糖类，以上会干扰 BCA 检测的物质，通过透析等方式过滤去除干扰物质，另外，也可以选用其他的蛋白定量方法。BCA 检测法所需仪器和耗材，以及详细操作步骤见下文。Meilunbio® 可为您提供此类方法的检测试剂盒 (货号 MA0082)。

BCA 蛋白浓度测定实验所需仪器和耗材

1. 分光光度计/酶标仪
2. 水浴锅/金属浴

3. 枪头和移液器
4. 试管
5. 酶标板

BCA 蛋白浓度测定实验操作步骤

1. 蛋白标准溶液制备

1) 取出试剂盒中蛋白标准配制液和蛋白标准 (BSA)，从蛋白标准配制液内取出 1ml 液体，加入到标签名为蛋白标准 (BSA) 的 1.5ml 可立式离心管中，充分溶解。注意：不同规格产品中蛋白标准 (BSA) 试管内的 BSA 质量不同，200T，500T 和 5000T 三种规格产品的 BSA 质量分别是 20mg，50mg 和 100mg，同理配制成溶液后，各规格产品的 BSA 浓度分别是 20mg/ml，50 mg/ml，100 mg/ml。配制后可立即使用，溶解后的蛋白标准溶液应在 -20℃ 保存。

2) 将各种规格产品的蛋白标准 BSA 溶液稀释成 2mg/ml，可参考下表进行稀释。注意在稀释时尽量保证蛋白标准溶液的稀释液与待检测蛋白样品的溶剂相同。

产品规格	稀释液体积 (μl)	蛋白标准液体积 (μl)	最终浓度 (mg/ml)
200T	900	100	2
500T	960	40	2
5000T	980	20	2

3) 将上步骤制备的浓度为 2mg/ml 的蛋白标准 BSA 母液稀释到试管中，同样注意稀释液尽量与蛋白样品的溶剂相同。可按照下表来稀释蛋白标准曲线，为满足大部分客户需求，稀释范围为 0.025mg/ml-2mg/ml，表格内体积适用于 96 孔酶标板测定，如使用分光光度计测定，请按照实际需要按比例扩大溶液体积。注意：母液浓度为 2mg/ml，I 管为空白对照组。

编号	稀释液体积 (μl)	蛋白标准溶液体积 (μl)	最终高浓度 (mg/ml)
A	0	从母液取 150	2
B	50	从母液取 150	1.5
C	150	从母液取 150	1
D	50	从 B 管取 50	0.75

E	150	从 C 管取 150	0.5
F	150	从 E 管取 150	0.25
G	150	从 F 管取 150	0.125
H	200	从 G 管取 50	0.025
I	200	0	0

2. BCA 工作液配制：

- 1) 计算实验所需工作液浓度，使用酶标仪检测时，每个检测孔所需工作液体积为 200 μ l，统计蛋白标准样品和待检测蛋白样品的数量（注意平行检测所需孔数量），然后总数量乘以 200，就是所需工作液的总体积（单位： μ l）。
- 2) BCA 工作液配制是按照试剂（A）和试剂（B）体积比 50:1 的比例，即取 50 份试剂（A）和 1 份试剂（B）。两种试剂混合充分混匀，BCA 工作液室温 24 小时内稳定。例如：如果计划要配制 5.1mlBCA 工作液，需要取 5mlBCA 试剂（A）和 0.1mlBCA 试剂（B）。

3. 蛋白标准和蛋白样品浓度测定

- 1) 取 20 μ l 上一步骤已稀释好的不同浓度蛋白标准溶液和待测蛋白样品依次加入到 96 孔酶标板中。注意如果蛋白样品浓度过大，需用同蛋白标准稀释液相同的溶液稀释蛋白样品。
- 2) 每孔再加入 200 μ l BCA 工作液，使用酶标仪震板功能震荡 30s，也可用手轻弹酶标板使溶液混匀。在 37 $^{\circ}$ C 放置 30min。
- 3) 使用酶标仪测定 562nm 的吸光值。以蛋白标准的浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，注意吸光值应减去空白对照的吸光值，绘制标准曲线，得出线性公式及 R² 值。
- 4) 按照上一步骤所得公式，根据所测得的待测蛋白样品吸光值，计算对应蛋白样品浓度。
- 5) 如使用分光光度计测定，可根据实际需要扩大溶液体积。因为 BCA 检测结果是动态的，吸光值一直在增加，分光光度计测定需要时间较长，注意将检测时间控制在 10 分钟以内。

3. Bradford 或考马斯亮蓝蛋白测定

Bradford 检测法是在 1976 年由 Dr. Marion Bradford 定义的。原理是基于考马斯亮蓝 G250 染料有红和蓝两种不同颜色，在酸性条件下考马斯亮蓝 G250 溶液呈红棕色，而当与溶液中的蛋白质结合形成复合物后，溶液会变为蓝色，在 595nm 处有最大的吸光值，吸光值的大小与蛋白质的浓度成正比。考马斯亮蓝 G250 染料主要是与蛋白质的精氨酸、色氨酸、酪氨酸、组氨酸和苯丙氨酸残基结合。

Bradford 检测法在测定未知蛋白样品浓度时，需要同时使用已知浓度的蛋白做标准曲线。Bradford 法的优点是孵育时间短，检测速度快，可以兼容溶液中用于稳定蛋白质的还原剂，另外因为考马斯亮蓝 G250 染料不与低分子量的多肽结合，所以可以特定的检测高分子量的蛋白质。但要注意考马斯亮蓝 G250 染料在溶液中以聚集体的形式存在，长时间静置时染料会聚集沉淀，在使用前需要上下翻转混匀，使染料在溶液内均匀分散，保证蛋白浓度测定的结果准确。

因为 Bradford 法不能兼容通常用来提取组织和细胞蛋白质的去垢剂，所以大大限制了这种检测方法的应用。但随着对 Bradford 法检测原理的逐步认识，目前已经开发出了去垢剂兼容型的 Bradford 试剂，可兼容大部分常用于蛋白提取的去垢剂，去垢剂兼容型的 Bradford 试剂和经典 Bradford 法同样所需仪器和耗材，以及详细操作步骤基本相同，同样具有检测速度快，只需室温孵育的优点。

下文详细介绍使用范围更广的去垢剂兼容型 Bradford 检测法。Meilunbio®可为您提供此类方法的检测试剂盒（货号 MA0079）。

Bradford 蛋白测定实验仪器和耗材

1. 分光光度计/酶标仪
2. 枪头和移液器
3. 试管
4. 酶标板

Bradford 蛋白测定实验操作步骤

经典 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒与去垢剂兼容型操作方法相同，所以只讲述去垢剂兼容型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒（货号：MA0079）的操作步骤。

1. 制备蛋白标准溶液

- 1) 将 20mg/ml 的蛋白标准溶液按照下表进行稀释，注意在稀释时尽量保证蛋白标准溶液的稀释液与待检测蛋白样品的溶剂相同，在稀释时要保证每个浓度的标准蛋白溶液都充分混匀。以下表格内的体积适用于 96 孔酶标板测定，如使用分光光度计测定，按实际需要扩大溶液体积。

编号	稀释液 (μl)	蛋白标准溶液体积 (μl)	最终浓度 (mg/ml)
A	97.5	从蛋白标准溶液 BSA 取 2.5	0.5
B	20	从 A 管取 80	0.4
C	20	从 B 管取 60	0.3
D	20	从 C 管取 40	0.2
E	20	从 C 管取 20	0.15
F	20	从 D 管取 20	0.1
G	20	0	0

2. 蛋白标准和蛋白样品浓度测定

- 1) 取 10 μl 上步骤已稀释好的不同浓度蛋白标准溶液依次加入到 96 孔酶标板中。
- 2) 取 10 μl 待测蛋白样品加入到 96 孔酶标板中。注意如蛋白样品浓度过大，需要用同蛋白标准稀释液相同的溶液稀释蛋白样品。
- 3) 每孔加入 300 μl Bradford 蛋白定量试剂（去垢剂兼容型）。用手轻弹酶标板混匀，室温放置 3-5min，注意不可以使用酶标仪震板功能，防止液体洒出污染机器。
- 4) 设置酶标仪测定 595nm 的吸光值，以不含 BSA 的吸光值做为空白对照。
- 5) 以蛋白标准液的浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制标准曲线，注意将零点去除，得出标准曲线线性公式及 R² 值。
- 6) 按照上述步骤所得公式，根据所测得的蛋白样品吸光值，计算蛋白样品的浓度。
- 7) 如使用分光光度计测定，可根据实际需要扩大溶液体积，保证蛋白标准溶液和蛋白样品与 Bradford 蛋白定量试剂的体积比为 10:300，例如，如果需要 1.5ml，可取蛋白样品 50 μl ，Bradford 蛋白定量试剂 1.5ml。

3. 注意事项

本产品说明书建议蛋白标准 BSA 浓度范围是 0.1-0.5mg/ml，在这个范围内标准曲线 R² 值可大于 0.995 以上，所测定蛋白浓度值准确。但因为 Bradford 法的标准曲线线性相关性没有 BCA 测定法好，所以如果检测到 1.5mg/ml 时，有可能线性相关性 R²

值会低于 0.99，这时可尝试在制作趋势线时选择“多项式”，这样 R^2 值一般可大于 0.995，多项式为二元一次方程代入公式计算即可得目标蛋白浓度。