

GEBRAUCHSANLEITUNG

Bradford Reagent, 5x

Reagenz für die Proteinkonzentrationsbestimmung
(Kat.-Nr. 39222)



Carl-Benz-Str. 7, D-69115 Heidelberg
Telefon: +49-6221-138400, Fax +49-6221-1384010
Mail: info@serva.de

Inhaltsverzeichnis

1. Bradford Assay	1
1.1. Allgemeine Hinweise	1
1.2. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	2
1.3. Lagerbedingungen	2
2. Durchführung der Proteinbestimmung nach Bradford	2
2.1. Mikrobestimmung (1 - 25 µg/ml Protein)	2
2.1.1. Ansetzen der Lösungen	2
2.1.2. Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen	3
2.1.3. Durchführung der Proteinbestimmung	3
2.1.4. Berechnung der Proteinkonzentration	4
2.2. Makrobestimmung (100 -1000 µg/ml Protein)	5
2.2.1. Ansetzen der Lösungen	5
2.2.2. Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen	5
2.2.3. Durchführung der Proteinbestimmung	6
2.2.4. Berechnung der Proteinkonzentration	6
2.3. Proteinbestimmungen in Mikrotiterplatten	8
2.3.1. Ansetzen der Lösung	8
2.3.2. Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen	8
2.3.4. Durchführung der Proteinbestimmung	9
2.3.5. Berechnung der Proteinkonzentration	9
3. Literatur	10

1. Bradford Assay

1.1. Allgemeine Hinweise

Die Proteinbestimmung nach Bradford ist eine der am häufigsten verwendeten kolorimetrischen Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Der Assay beruht auf der Verschiebung des Coomassie®-Absorptionsmaximums von 470 nm nach 595 nm nach Proteinbindung in saurem Medium (Abb. 1). Durch gleichzeitige Erstellung einer Kalibrierungsgerade kann die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe quantifiziert werden. Die Farbreaktion ist abhängig vom Gehalt an aromatischen und basischen Aminosäuren. Somit ergeben sich unterschiedlich starke Absorptionen bei verschiedenen Proteinen. Zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden empfiehlt sich die Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA) als Standard.

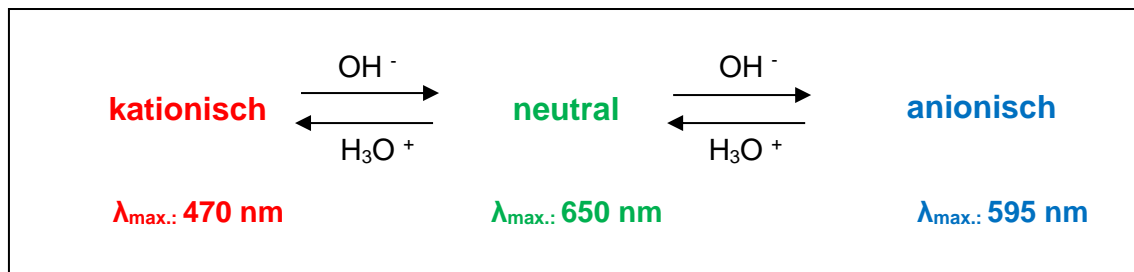


Abbildung 1: pH-abhängige Absorptionsmaxima des Coomassie® Brilliant Blue G 250

Vorteile der Methode:

- Kostengünstig und schnell
- Sehr sensitiv
- Hochspezifisch für Proteine; wenig störende Substanzen
- Farbstoff-Protein-Komplex ist relativ stabil

Coomassie® = eingetragenes Warenzeichen von ICI Ltd.

1.2. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Zentrifuge (geeignet zum Zentrifugieren von 1,5 ml bzw. 15 ml Reaktionsgefäße bei 12 000xg)
- Vortex-Mixer
- Spektralphotometer bzw. ELISA-Reader für Absorptionsmessung bei 595 nm
- Kunststoffküvetten (**Wichtig:** Keine Verwendung von Quarzküvetten, da der Farbstoff daran bindet.), Mikrotiter-Platten

1.3. Lagerbedingungen

Das Bradford-Reagenz ist bei der empfohlenen Lagertemperatur von + 2 °C bis + 8 °C mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

2. Durchführung der Proteinbestimmung nach Bradford

2.1. Mikrobestimmung (1 - 25 µg/ml Protein)

2.1.1. Ansetzen der Lösungen

Für die Durchführung der Mikrobestimmung wird das 5x Bradford-Reagenz unverdünnt eingesetzt. Mischen Sie das 5x Bradford-Reagenz vor Gebrauch durch mehrmaliges Invertieren der Flasche (Bitte nicht schütteln!). Anschließend entnehmen Sie das benötigte Lösungsvolumen und temperieren es auf Raumtemperatur.

Zur Erstellung der Kalibrierungskurve wird das Referenzprotein in Probenpuffer wie folgt verdünnt: 1, 5, 10, 15, 20, 25 µg/ml. Jeder Ansatz wird als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Kalibrierungskurve sollte für jede Testreihe separat erstellt werden.

2.1.2. Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen

Das Pipettierschema für die Herstellung der Referenzlösungen für Mikrobestimmungen ist in Tabelle 1 zu finden. Als Diluent zur Erstellung der Kalibrierungskurve sollte der Puffer verwendet werden, indem auch die zu bestimmende Proteinprobe vorliegt.

Tabelle 1: Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen für die Mikrobestimmung

Konzentration Referenzprotein (z.B. BSA) [$\mu\text{g/ml}$]	Volumen Stocklösung (1 mg/ml) [μl]	Volumen Diluent [μl]
0	0	10
1	10	9,990
5	50	9,950
10	100	9,900
15	150	9,850
20	200	9,800
25	250	9,750

2.1.3. Durchführung der Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird in einer 3-fachen Bestimmung durchgeführt.

Vorlegen von **800 μl** dest. H₂O bzw. Puffer für die Blindwerte, Referenzlösungen und Proteinproben in Reaktionsgefäße



Zugabe von **200 μl 5x Bradford-Reagenz**



Reaktionsgefäße verschließen



auf Vortex mischen



5 min bei RT inkubieren



Überführen der Lösung in Küvette
Messung der Absorption bei 595 nm ($A_{595\text{nm}}$)
innerhalb von 30 min

2.1.4. Berechnung der Proteinkonzentration

Erstellen Sie eine Tabelle mit den im Test erhaltenen Absorptionswerten. Aus den erhaltenen Werten für das Referenzprotein erstellen Sie eine Kalibrierungskurve, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration der unbekannt Probe bestimmt werden kann. Tabelle 1 zeigt beispielhaft Messwerte für die Erstellung einer Kalibrierungskurve mit BSA (Proben wurden in dest. H₂O gelöst bzw. verdünnt). Graph 1 zeigt die daraus resultierende BSA-Kalibrierungskurve.

Tabelle 2: Beispieltabelle für Messwerte der BSA-Referenzlösungen

c(BSA) [µg/ml]	1	5	10	15	20	25
A _{595 nm}	0,066	0,224	0,402	0,573	0,720	0,851
	0,068	0,225	0,410	0,569	0,705	0,892
	0,067	0,222	0,406	0,570	0,710	0,860

Die Berechnung erfolgt über lineare Regression der Referenzlösungen und anschließende Umrechnung der Absorptionswerte der Untersuchungslösung in die Proteinkonzentration mit Hilfe der Regressionsgleichung.

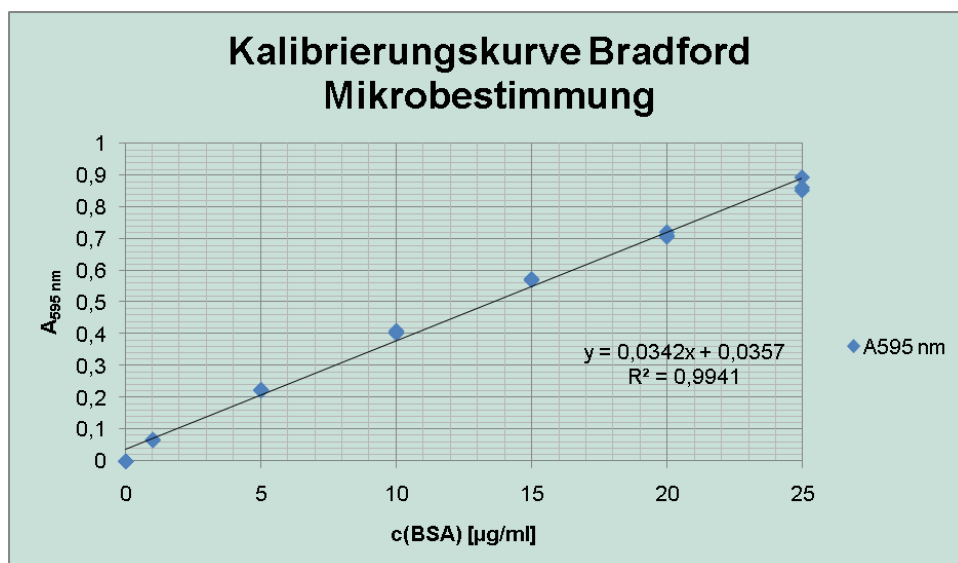


Abbildung 2: Beispiel für Kalibrierungskurve der BSA-Referenzlösungen. Die Standardkurve wurde mittels linearer Regressionsanalyse mit der Gleichung $y = 0,0342x + 0,0357$ berechnet. Der Regressionskoeffizient beträgt $R^2 = 0,9941$. c = Konzentration

Hinweis:

Beachten Sie bitte, dass diese **Werte nicht als Ersatz für die Erstellung einer Kalibrierungskurve dienen können**, da die **Absorptionswerte der BSA-Referenzlösung** in jeder Testreihe von den hier aufgeführten Werten **abweichen werden**.

2.2. Makrobestimmung (100 -1000 µg/ml Protein)

2.2.1. Ansetzen der Lösungen

Mischen Sie das 5x Bradford-Reagenz vor Gebrauch durch mehrmaliges Invertieren der Flasche (Bitte nicht schütteln!). Anschließend entnehmen Sie das benötigte Lösungsvolumen und temperieren es auf Raumtemperatur. Zur Durchführung der Makrobestimmung wird das 5x Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:5 (1 Volumenteil Bradford-Reagenz plus 4 Volumenteile bidest. H₂O) verdünnt. Anschließend wird die verdünnte Lösung über einen Faltenfilter filtriert. Die 1x Bradford-Lösung ist bei Raumtemperatur ca. 1 Woche haltbar.

Zur Erstellung der Kalibrierungskurve wird das Referenzprotein in Probenpuffer wie folgt verdünnt: 100, 125, 250, 500 und 1000 µg/ml. Jeder Ansatz wird als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Kalibrierungskurve sollte für jede Testreihe separat erstellt werden.

2.2.2. Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen

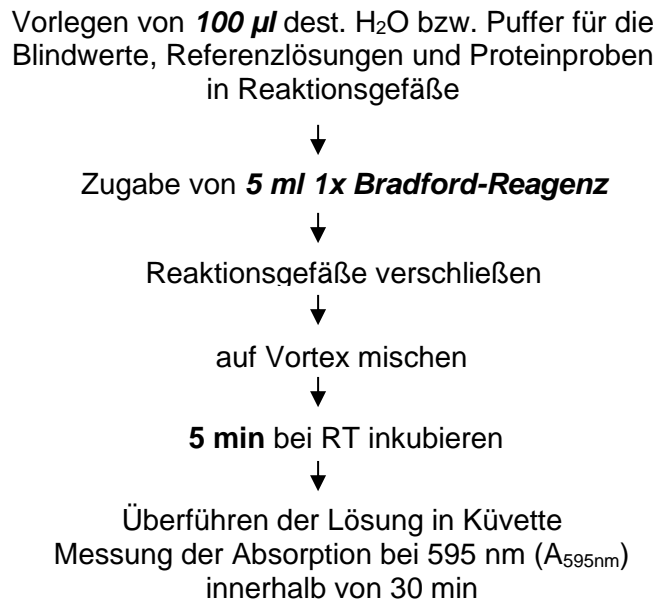
Das Pipettierschema für die Herstellung der Referenzlösungen für Makrobestimmungen ist in Tabelle 3 zu finden. Als Diluent zur Erstellung der Kalibrierungskurve sollte der Puffer verwendet werden, indem auch die zu bestimmende Proteinprobe vorliegt.

Tabelle 3: Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen für Makrobestimmungen.

Konzentration Referenzprotein (z.B. BSA) [µg/ml]	Volumen Stocklösung (1 mg/ml) [µl]	Volumen Diluent [µl]
0	0	500
100	50	450
125	63	437
250	125	375
500	250	250
1000	500	0

2.2.3. Durchführung der Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird in einer 3-fachen Bestimmung durchgeführt.



2.2.4. Berechnung der Proteinkonzentration

Erstellen Sie eine Tabelle mit den im Test erhaltenen Absorptionswerten. Aus den erhaltenen Werten für das Referenzprotein erstellen Sie eine Kalibrierungsgerade, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration der unbekannt Probe bestimmt werden kann. In Tabelle 4 sind beispielhaft Messwerte für die Erstellung einer Kalibrierungskurve mit BSA (Proben wurden in dest. H₂O gelöst bzw. verdünnt) dargestellt. In Abbildung 3 ist die daraus resultierend BSA-Kalibrierungskurve dargestellt.

Tabelle 4: Beispieltabelle für Messwerte der BSA-Referenzlösungen

c(BSA) [μg/ml]	100	125	250	500	1000
$A_{595\text{ nm}}$	0,161	0,190	0,359	0,587	0,896
	0,166	0,193	0,384	0,583	0,902
	0,164	0,192	0,369	0,593	0,892

Die Berechnung erfolgt über Polynome-Regression der Referenzlösungen und anschließende Umrechnung der Absorptionswerte der Untersuchungslösung in die Proteinkonzentration mit Hilfe der Regressionsgleichung.

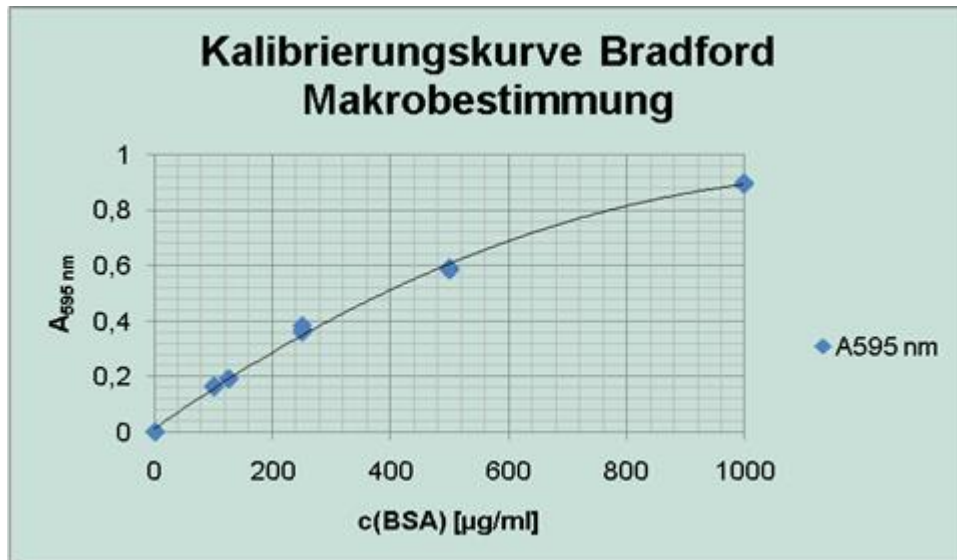


Abbildung 3: Beispieltabelle für Messwerte der BSA-Referenzlösungen für die Makrobestimmung. Die Standardkurve wurde mittels polynomer Regressionsanalyse mit der Gleichung $y = -5 \cdot 10^{-7}x^2 + 0,0014x + 0,0205$ berechnet. Der Regressionskoeffizient beträgt $R^2 = 0,9979$. c = Konzentration

Hinweis:

Beachten Sie bitte, dass diese **Werte nicht als Ersatz für die Erstellung einer Kalibrierungskurve dienen können**, da die **Absorptionswerte der BSA Referenzlösung** in jeder Testreihe von den hier aufgeführten Werten **abweichen werden**.

2.3. Proteinbestimmungen in Mikrotiterplatten

2.3.1. Ansetzen der Lösung

Mischen Sie das 5x Bradford-Reagenz vor Gebrauch durch mehrmaliges Invertieren der Flasche (Bitte nicht schütteln!). Anschließend entnehmen Sie das benötigte Lösungsvolumen und temperieren es auf Raumtemperatur. Zur Durchführung der Proteinbestimmung in Mikrotiterplatten wird das 5x Bradford-Reagenz im Verhältnis 2:7,5 (2 Volumenteile Bradford-Reagenz plus 5,5 Volumenteile bidest. H₂O) verdünnt.

Zur Erstellung der Kalibrierungskurve wird das Referenzprotein in Probenpuffer wie folgt verdünnt: 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 µg/ml. Jeder Ansatz wird als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Kalibrierungskurve sollte für jede Testreihe separat erstellt werden.

2.3.2. Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen für Mikrotiterplatten

Das Pipettierschema für die Herstellung der Referenzlösungen für Mikrotiterplatten ist in Tabelle 5 zu finden. Als Diluent zur Erstellung der Kalibrierungskurve sollte der Puffer verwendet werden, indem auch die zu bestimmende Proteinprobe vorliegt.

Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösung für Mikrotiterplatten

Konzentration Referenzprotein (z.B. BSA) [µg/ml]	Volumen Stocklösung (100 µg/ml) [µl]	Volumen Diluent [µl]
0	0	200
20	40	160
30	60	140
40	80	120
50	100	100
60	120	80
80	160	40
100	200	0

2.3.3. Verdünnen der Proben

Bitte verdünnen Sie die zu messenden Proben.

Beispiel:

1:20-Verdünnung: 10 μ l Probe + 190 μ l Probenpuffer

1:40-Verdünnung: 5 μ l Probe + 195 μ l Probenpuffer

2.3.4. Durchführung der Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird in einer 3-fachen Bestimmung durchgeführt.

Vorlegen von **50 μ l** dest. H₂O bzw. Puffer für die Blindwerte, Referenzlösungen und Proteinproben in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte



Zugabe von **200 μ l 2:7,5** verdünntes **Bradford-Reagenz**



5 min bei RT inkubieren



Messung der Absorption bei 595 nm (A_{590nm}) innerhalb von 30 min

2.3.5. Berechnung der Proteinkonzentration

Erstellen Sie eine Tabelle mit den im Test erhaltenen Absorptionswerten. Aus den erhaltenen Werten für das Referenzprotein erstellen Sie eine Kalibrierungsgerade, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration der unbekannt Probe bestimmt werden kann.

3. Literatur

- **Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- **Compton, S.J. and Jones, C.J.** Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* 1985; 151: 369-374.
- **Davies, E.M. Protein assays:** A review of common techniques. *Amer. Biotech. Lab.* 1988; July 28-37.