

GEBRAUCHSANLEITUNG

Bradford Reagent, 5x

Reagenz für die Proteinkonzentrationsbestimmung

(Kat.-Nr. 39222)



SERVA Electrophoresis GmbH • Carl-Benz-Str. 7 • D-69115 Heidelberg Phone +49-6221-138400, Fax +49-6221-1384010
e-mail: info@serva.de • <http://www.serva.de>

Inhaltsverzeichnis

1. Bradford Assay	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	3
1.3. Lagerbedingungen	3
2. Durchführung der Proteinbestimmung nach Bradford	3
2.1. Mikrobestimmung (1 - 25 µg/ml Protein)	3
2.1.1. Ansetzen der Lösungen	3
2.1.2. Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen	4
2.1.3. Durchführung der Proteinbestimmung	4
2.1.4. Berechnung der Proteinkonzentration	4
2.2. Makrobestimmung (100 -1000 µg/ml Protein)	6
2.2.1. Ansetzen der Lösungen	6
2.2.2. Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen	6
2.2.3. Durchführung der Proteinbestimmung	7
2.2.4. Berechnung der Proteinkonzentration	7
2.3. Proteinbestimmungen in Mikrotiterplatten	9
2.3.1. Ansetzen der Lösung	9
2.3.2. Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen	9
2.3.4. Durchführung der Proteinbestimmung	10
2.3.5. Berechnung der Proteinkonzentration	10
3. Literatur	11

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 unbekannten 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.

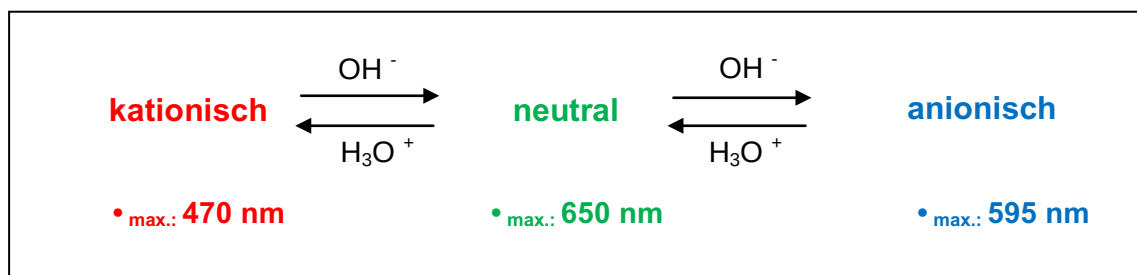


Abb. 1: pH-abhängige Absorptionsmaxima des Coomassie® Brilliant Blue G 250

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 - +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

Konzentration Referenzprotein (z.B. BSA) [µg/ml]	Volumen Stocklösung (1 mg/ml) [µl]	Volumen Diluent [ml]
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

Als Diluent zur Erstellung der Kalibrierungskurve sollte der Puffer verwendet werden, indem auch die zu bestimmende Proteinprobe vorliegt.

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 unbekannten 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.

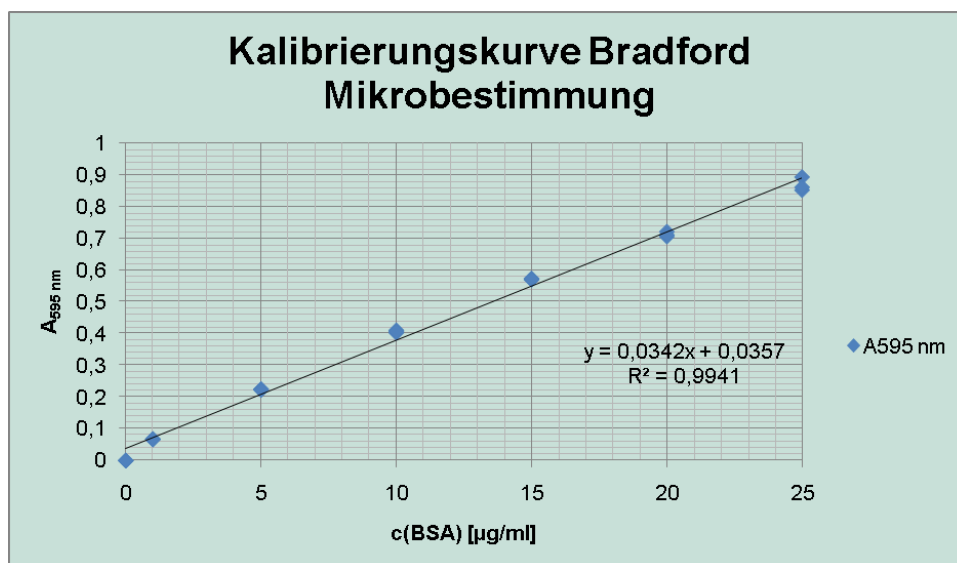
Tabelle 1: Beispieltabelle für Messwerte der BSA-Referenzlösungen

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

Graph 1: Beispiel für Kalibrierungskurve der BSA-Referenzlösungen.

c = Konzentration

Die Standardkurve wurde mittels linearer Regressionsanalyse mit der Gleichung $y = 0,0342x + 0,0357$ berechnet. Der Regressionskoeffizient beträgt $R^2 = 0,9941$.



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

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

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

Als Diluent zur Erstellung der Kalibrierungskurve sollte der Puffer verwendet werden, indem auch die zu bestimmende Proteinprobe vorliegt.

2.2.3. Durchführung der Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird in einer 3-fachen Bestimmung durchgeführt.

Vorlegen von **100 μ l** dest. H₂O bzw. Puffer für die
Blindwerte, Referenzlösungen und Proteinproben
in Reaktionsgefäße



Zugabe von **5ml 1x Bradford-Reagenz**



Reaktionsgefäße verschließen



auf Vortex mischen



5 Min. bei RT inkubieren



Überführen der Lösung in Küvette
Messung der Absorption bei 595 nm (A_{595nm})
innerhalb von 30 Min.

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 unbekannten Probe bestimmt werden kann.

Tabelle 2 zeigt beispielhaft Messwerte für die Erstellung einer Kalibrierungskurve mit BSA (Proben wurden in dest. H₂O gelöst bzw. verdünnt).

Graph 2 zeigt die daraus resultierende BSA-Kalibrierungskurve.

Tabelle 2: Beispieltabelle für Messwerte der BSA-Referenzlösungen

c(BSA) [µg/ml]	100	125	250	500	1000
A_{595 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

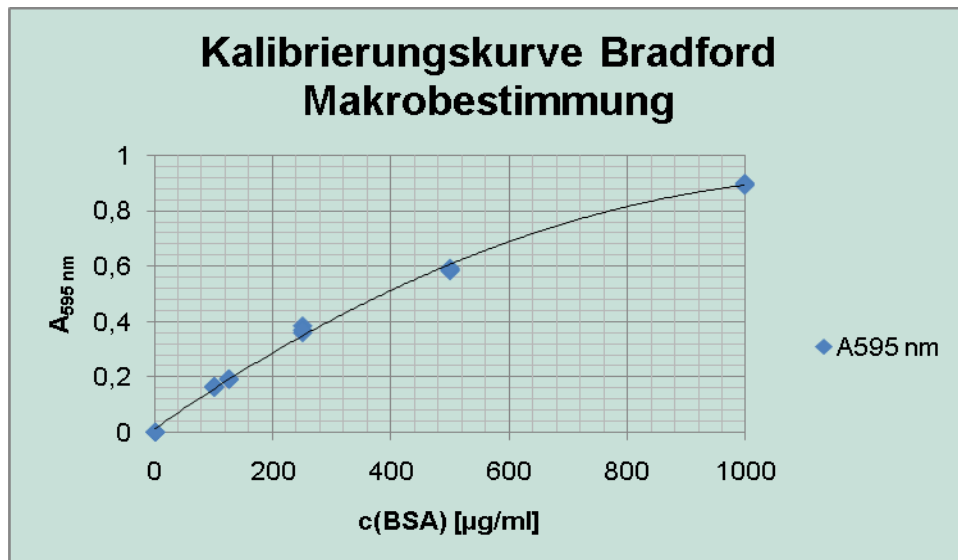
Graph 2: Beispieltabelle für Messwerte der BSA-Referenzlösungen.

c = Konzentration

Die Standardkurve wurde mittels polynomer Regressionsanalyse mit der Gleichung

$y = -5 \cdot 10^{-7} x^2 + 0,0014x + 0,0205$ berechnet. Der Regressionskoeffizient beträgt

$R^2 = 0,9979$.



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

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

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 µl Probe + 190 µl Probenpuffer

1:40-Verdünnung: 5 µl Probe + 195 µl 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 ($A_{590\text{nm}}$) 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 unbekannten 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.