KIAZIST Life Sciences

کیت اندازه گیری پروتئین

به روش برادفوورد

KBRD96

اصول کار

روش برادفورد یکی از چند روش معروف برای اندازه گیری پروتئین با حساسیت بالا می باشد. این روش بسیار سریع است و مقادیر دقیقی از مقدار پروتئین ارائه می کند.

از معایب این روش واکنش شدید با مواد دترجنت از قبیل SDS, Triton X100 و NP-40 می باشد که به طور جایگزین میتوان از روش BCA استفاده کرد..

پیوند های پپتیدی با رنگ کوماسی بلو واکنش داده و مقدار جذب در طول موج 595 نانومتر اندازه گیری می شود.

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

در دمای 4°C نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.

محدوده اندازه گیری دینامیک: **High Range 100-500 µg/mL**

Low Range 2.5-25 µg/mL

حساسیت:1 µg/mL

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissues from animal/plant	20 mg	10 mg
Cells	1.5×10^7	100000
Serum	10 µL	5 µL

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	Bradford Reagent	20 mL
2	Albumin Standard (1 mg/mL)	100 µL
3	96-well Clean Plate	1 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر
- سمپلر چند کاناله
- سرسمپلر مناسب
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- آب دیونیزه
- دستگاه Plate Reader با طول موج 595 nm (570-630 nm)

نکته: قبل از شروع با یک نمونه جهت مشخص ساختن مقدار نمونه به صورت پایلت (Pilot) انجام شود.

***کل پروتکل را قبل از انجام تا انتها مطالعه کنید.**

آماده سازی کیت

آماده سازی مواد کیت:

- پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید. محلول ها تا یک روز پس از آماده سازی پایدار هستند. همه محلولها را در دمای اتاق گرم کرده و خوب هم زده بزنید.

Bradford Reagent: آماده مصرف.

-محلول استاندارد را در میکروتیوب ها تقسیم بندی کرده و در دمای $-20^{\circ}C$ ذخیره کنید.

-استاندارد برای حد پایین پروتئین بر طبق جدول ۲: برای آماده سازی منحنی در محدوده پروتئین پایین (2.5-25 µg/mL)، ابتدا 80 µL از ویال استاندارد برداشته و با 720 µL آب دیونیزه ترکیب کنید.سپس به جدول ۲ در صفحه بعد مراجعه کنید.

آماده سازی استاندارد

استفاده از جدول های استاندارد زیر بستگی به غلظت نمونه شما و حجم نمونه دارد.
محلول های غلیظ حتما رقیق شوند.
- در تعدادی میکروتیوب به ترتیب زیر مواد را ترکیب کنید.

جدول ۱- آماده سازی استاندارد در محدوده 100-500 µg/mL

شماره	غلظت نهایی استاندارد (µg/mL)	مقدار از ویال استاندارد (µL)	مقدار آب دیونیزه (µL)
1	0	0	50
2	100	5	45
3	200	10	40
4	300	15	35
5	400	20	30
6	500	25	25

جدول ۲- آماده سازی استاندارد در محدوده پایین 2.5-25 µg/mL

شماره	غلظت نهایی استاندارد (µg/mL)	مقدار از استاندارد رقیق شده (µL)	مقدار آب دیونیزه (µL)
1	0	0	1000
2	2.5	25	975
3	5	50	950
4	10	100	900
5	15	150	850
6	20	200	800
7	25	250	750

نحوه انجام آزمایش

۱- ابتدا به هرچاهک µL 10 از نمونه و یا استاندارد اضافه کنید. توصیه می شود هر نمونه و یا استاندارد را به صورت دوتایی (Duplicate) انجام دهید. برای نمونه در محدوده پایین µL 50 از نمونه یا استاندارد اضافه کنید.

۲- از محلولی که در آن نمونه را لیز کرده اید به عنوان بلانک استفاده کرده و µL 10 (µL 50 برای محدوده پایین) آن را به چاهک نمایید.

۳- سپس از Bradford Reagent µL 190 به هرچاهک اضافه کرده و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه نمایید.

۴- در نهایت جذب پلیت را در طول موج 570-620 nM خوانده بخوانید.

*سیگنال تا ۲ ساعت پایدار می باشد.

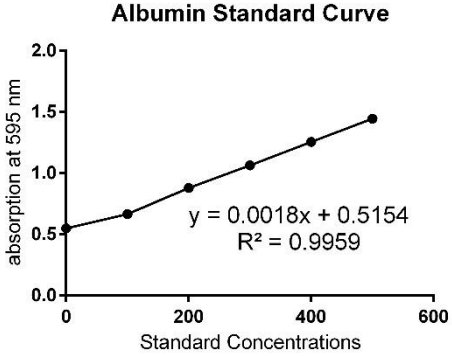
نحوه محاسبه

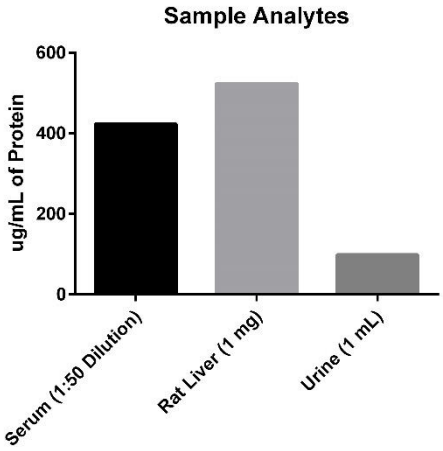
۱- مقدار میانگین جذب بلانک را از هر نمونه و استاندارد کم کنید.

۲- با استفاده از یک نرم افزار مناسب مانند اکسل و با استفاده از جذب استانداردها منحنی استاندارد را رسم کنید و غلظت نمونه ها را حساب نمایید.

۳- ضریب رقت را در عدد نهایی ضرب کنید.

$$\text{Protein } (\mu g/mL) = \frac{\text{مقدار محاسبه شده از منحنی}}{\text{حجم نمونه ریخته شده در چاهک}} \times 10 \times \text{ضریب رقت}$$


Albumin Standard Curve
absorption at 595 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
y = 0.0018x + 0.5154
R² = 0.9959
0
200
400
600
Standard Concentrations


Sample Analytes
ug/mL of Protein
600
400
200
0
Serum (1:50 Dilution)
Rat Liver (1 mg)
Urine (1 mL)

مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
جذب بالای منحنی استاندارد	مقدار نمونه اولیه بالا	- مقدار نمونه اولیه را کم کنید -رقیق سازی نمونه در Assay Buffer
جذب پایین منحنی استاندارد	-مقدار نمونه اولیه کم -خراب شدن بافر Chromogen	-مقدار نمونه را افزایش دهید -بافر Chromogen را تازه آماده کنید

.....

.....

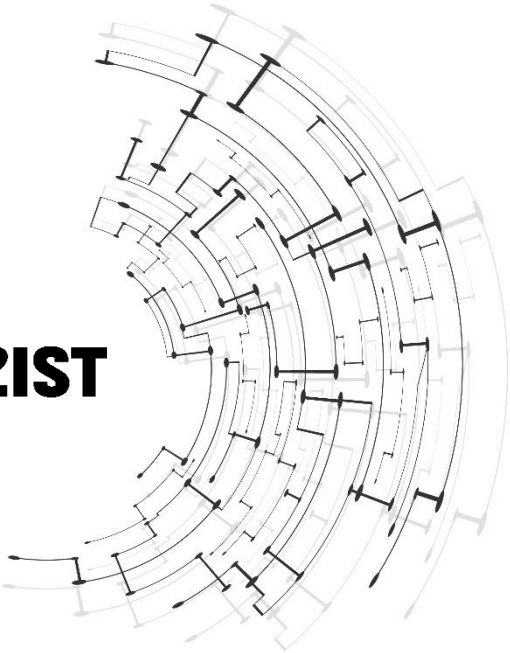
.....

.....

.....

.....

.....



KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com