

Proteinbestimmung nach Bradford (Halbmikro-Küvetten im Photometer)

Master-Anweisung, letzte Bearb. Jan 2016

- Verdünne vor Beginn der Bestimmung das Bradford-Reagenz 1:5 mit deion. Wasser (1 ml pro Probe, Standard und Leerwert), bei RT lagern
- Gib je 1 ml des verdünnten Reagenzes in jede der Proben- und Standardküvetten (Halbmikroküvetten), Doppelbestimmungen durchführen
- Gib je 5 μ l BSA-Probenstandard oder Probe in die Küvette und mische gründlich mit der Pipettenspitze, so dass die sich entwickelnde Färbung völlig homogen ist (optische Kontrolle)
- erst wenn alle Proben und Standards auf diese Weise vorbereitet sind, miss die Proben im Photometer in der Reihenfolge des Pipettierens
- Bedenke, dass zwischen der Pipettierung und der photometrischen Messung nicht mehr als 10 min liegen sollten, da die Coomassie-Proteinkomplexe Flocken bilden können, die die Messung verfälschen!
- Miss die Extinktion im Photometer bei 595 nm Wellenlänge (ABS-Modus)
- Bilde den Mittelwert aus den Doppelbestimmungen
- Zeichne eine Eichkurve, trage die Probenwerte ein und lies die Proteinkonzentrationen (mg/ml) ab

Extinktionsmessung mit Spekol 1300 (Analytik Jena):

- Gerät einschalten
- MODE drücken → ABS-Modus: Wellenlänge 595 einstellen (mit Pfeiltasten)
- Nullwert festlegen
 - Als Nullwert erfolgt die Messung gegen die Küvette mit 1 ml Reagenz + 5 μ l Lysispuffer (100%T drücken)
- Küvetten der Standards und Proben einsetzen (immer 4 pro Durchgang)
- Extinktionswerte notieren

Lösungen

5 x Bradford-Reagenz (0,05 % G250, 4 mol/l Ethanol, 8 mol/l H ₃ PO ₄)		
Coomassie Blue G250 (Brilliant Blue)	0,125 g	<ul style="list-style-type: none"> • mit deion. Wasser auf 250 ml auffüllen • bei 4 °C im Kühlschrank lagern
99,8 % Ethanol (unvergällt)	58 ml	
Phosphorsäure (85 % H ₃ PO ₄)	135 ml	

BSA-Stammlösung (10 mg/ml)		
BSA (unvergällt)	10 mg	<ul style="list-style-type: none"> • in 1ml Lysispuffer durch Vortexen lösen • bei -20 °C im Kühlschrank lagern

BSA-Eichreihe			
Endkonz.	BSA-Stammlösg.	+ Lysispuffer	
0,0 mg/ml	0,0 µl	100,0 µl	<ul style="list-style-type: none"> • BSA-Stammlösung und Lysispuffer im angegebenen Verhältnis mischen • aliquotieren in Eppis (25 µl) • bei -20 °C lagern
1,25 mg/ml	12,5 µl	87,5 µl	
2,5 mg/ml	25,0 µl	75,0 µl	
5,0 mg/ml	50,0 µl	50,0 µl	
10,0 mg/ml	100,0 µl	0,0 µl	