

製品コード T9310A

研究用

TaKaRa

TaKaRa Bradford Protein Assay Kit

説明書

v201906Da

TaKaRa Bradford Protein Assay Kit は、Coomassie Dye を用いる Bradford 法に基づいたキットであり、簡単な操作で迅速に、濃度範囲が 1 ~ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ のタンパク質溶液の定量を行うことができます。本キットの定量の原理は、Coomassie Dye がタンパク質と結合することにより、溶液の最大吸収波長が 465 nm から 595 nm (茶色から青色) にシフトすることによります。この色の変化は、タンパク質量に比例して起こるので、595 nm の吸光度を測定することにより、溶液のタンパク質濃度が定量できます。タンパク質と色素の複合体は、反応開始後 5 分から 60 分の間安定です。本キットは、還元剤の存在下でも測定可能ですが、界面活性剤の存在下では測定値が不正確になるので、注意が必要です。詳しくは、5 ページの表 1 をご参照ください。また、タンパク質によって発色率が大きく異なるので、注意してください。タンパク質の発色率の比較は、6 ページの表 2 をご参照ください。本製品は、標準プロトコルを用いた場合、1 ml 反応系において 500 回、200 μl 反応系において 2,500 回の測定が可能です。また、希釈プロトコルを用いた場合、1 ml 反応系において 1,000 回、200 μl 反応系において 5,000 回の測定が可能です。

I. 内容

- | | |
|-------------------------------------|------------|
| 1. Bradford Dye Reagent | 250 ml × 2 |
| 2. BSA Standard Solution (2 mg/ml)* | 1 ml × 10 |

* : BSA Standard Solution は、安定剤として 0.9% NaCl、0.05% NaN_3 を含みます。

II. 保存

4°C

III. キット以外に必要なもの

- 1 ml のキュベット (1 ml 反応系の場合)
※ポリスチレン製のディスポーザブルキュベットを推奨
- マイクロタイタープレート (200 μl 反応系の場合)
- マイクロチューブ (2 ml または 1.5 ml)
- 分光光度計またはマイクロプレートリーダー

IV. 操作上の注意

本製品を使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. Bradford Dye Reagent は使用前に室温に戻しておきます。使用直前に 3 ~ 5 回軽く転倒混和します。激しく振ることは避けてください。
2. BSA Standard Solution は、使用前に室温に戻すか、20 ~ 50°C の水浴中で完全に溶解します。溶解後、軽くタッピングして、卓上遠心機などで軽く遠心しておきます。
3. 標準液とサンプルの希釈には、脱イオン水、0.9% NaCl または PBS を用いてください。
4. タンパク質溶液と Bradford Dye Reagent の反応後、タンパク質と色素の複合体が沈殿することがあります。吸光度測定を行う前に、必ず反応液が均一となるように混和してください。
5. 595 nm のフィルターがない場合は、575 nm から 620 nm の間の任意の波長で測定することが可能です。この場合も定量結果に影響はありません。
6. 色素によりキュベットが汚染されるので、ガラスや石英製のキュベットの使用は推奨しません。ポリスチレン製のディスポーザブルキュベットをご使用ください。キュベットを再利用する場合は、測定後直ちにエタノールまたはメタノールで洗浄します。

V. 操作

V-a. 標準プロトコール (定量範囲：25～1,000 µg/ml) 【1 ml 反応系】

1. 表の通り、BSA 標準溶液の希釈系列を作製する。BSA 標準溶液とサンプルの希釈には、脱イオン水、0.9% NaCl または PBS が使用できる。

2 mg/ml BSA Standard (µl)	希釈液 (µl)	BSA の終濃度 (µg/ml)
50	50	1,000
30	50	750
20	60	500
20	140	250
10	150	125
5	395	25
0	100	0 (Blank)

2. 1.5 ml のマイクロチューブに 1. で作製した BSA 標準溶液の各希釈液、サンプル (必要に応じて希釈系列を作製する) をそれぞれ 20 µl 分注する。各希釈液、サンプルともに 2 連 (n=2) 以上並行で測定する。
3. Bradford Dye Reagent を各チューブに 1 ml 加え、よく混合する。25°C の水浴もしくは、25°C 前後の室温において、5 分間反応する。
4. 595 nm の吸光度を測定する。(吸光度の測定は、反応後 1 時間以内に行う。)
5. Blank 値を差し引いた後、2 連 (以上) で測定したサンプルの平均値をとる。BSA 標準液の希釈系列から作成した標準曲線を用いて、サンプルの濃度を求める。

V-b. 標準プロトコール (定量範囲：25～1,000 µg/ml) 【200 µl 反応系】

1. V-a-1. と同様に BSA 標準溶液の希釈系列を作製する。
2. マイクロタイタープレート各ウェルに 1. で作製した BSA 標準溶液の各希釈液、サンプル (必要に応じて希釈系列を作製する) をそれぞれ 4 µl 分注する。各希釈液、サンプルともに 2 連 (n=2) 以上並行で測定する。
3. 200 µl の Bradford Dye Reagent を各ウェルに加え、よく混合する。25°C 前後の室温において、5 分間反応する。
4. プレートリーダーを用いて、595 nm の吸光度を測定する。(吸光度の測定は、反応後 1 時間以内に行う。)
5. Blank 値を差し引いた後、2 連 (以上) で測定したサンプルの平均値をとる。BSA 標準液の希釈系列から作成した標準曲線を用いて、サンプルの濃度を求める。

V-c. 低濃度測定プロトコール (定量範囲：1～25 µg/ml) 【1 ml 反応系】

- 1) あらかじめ、マイクロチューブに BSA Standard Solution (2 mg/ml) 50 µl を取り、950 µl の希釈液を加えてよく混合し、0.1 mg/ml の BSA 標準溶液を作製する。
- 2) 1.5 ml のマイクロチューブに、表の通り、BSA 標準溶液の希釈系列を各 2 セットずつ作製する (7 種類×2 セット (14 本))。BSA 標準溶液とサンプルの希釈には、脱イオン水、0.9% NaCl または PBS が使用できる。

0.1 mg/ml BSA 標準溶液 (µl)	希釈液 (µl)	BSA 終濃度 (µg/ml)
125	375	25
100	400	20
75	425	15
50	450	10
25	475	5
12.5	487.5	2.5
0	500	0 (Blank)

2. 1.5 ml のマイクロチューブに、サンプル (必要に応じて希釈系列を作製する) を 500 µl 分注する。1. で作製した BSA 標準溶液の希釈系列 (各 500 µl) とサンプルともに 2 連 (n=2) 以上並行で測定する。
3. Bradford Dye Reagent を各チューブに 0.5 ml 加え、よく混合する。25°C の水浴もしくは、25°C 前後の室温において、5 分間反応する。
4. 595 nm の吸光度を測定する。(吸光度の測定は、反応後 1 時間以内に行う。)
5. Blank 値を差し引いた後、2 連 (以上) で測定したサンプルの平均値をとる。BSA 標準液の希釈系列から作成した標準曲線を用いて、サンプルの濃度を求める。

V-d. 低濃度測定プロトコール (定量範囲：1～25 µg/ml) 【200 µl 反応系】

1. V-c-1. と同様に BSA 標準溶液の希釈系列を作製する。
2. マイクロタイタープレートの各ウェルに 1. で作製した BSA 標準溶液の各希釈液、サンプル (必要に応じて希釈系列を作製する) をそれぞれ 100 µl 分注する。各希釈液、サンプルともに 2 連 (n=2) 以上並行で測定する。
3. 100 µl の Bradford Dye Reagent を各ウェルに加え、よく混合する。25°C 前後の室温において、5 分間反応する。
4. プレートリーダーを用いて、595 nm の吸光度を測定する。(吸光度の測定は、反応後 1 時間以内に行う。)
5. Blank 値を差し引いた後、2 連 (以上) で測定したサンプルの平均値をとる。BSA 標準液の希釈系列から作成した標準曲線を用いて、サンプルの濃度を求める。

VI. Appendix

共存物質の影響

本キットは、還元剤の影響は比較的受けにくいですが、界面活性剤の濃度が高い場合は、測定に影響を受けます。本キットでの測定に影響がない濃度を表1に示します。

表1. 標準プロトコールにおける各種試薬の許容濃度

物質名	共存物質 許容濃度
Salts/ Buffers	
Ammonium sulfate	1 M
Borate pH9.5	50 mM
Calcium chloride	10 mM
Glycine	100 mM
Guanidine-HCl	3.5 M
HEPES, pH7.5	100 mM
Imidazole, pH7.0	200 mM
KPB, pH7.0	100 mM
Magnesium chloride	100 mM
MES, pH6.1	100 mM
MOPS, pH7.2	100 mM
NaPB, pH7.0	100 mM
Nickel chloride	10 mM
PBS	undiluted
PIPES, pH6.8	500 mM
Sodium acetate, pH5.0	600 mM
Sodium azide	0.5%
Sodium chloride	5 M
Sodium citrate, pH6.4	200 mM
Tricine, pH8.0	100 mM
Tris-HCl, pH8.0	2 M
Zinc chloride	10 mM
Detergents	
Brij-35	0.125%
CHAPS	5%
NP-40	0.1%
Triton X-100	0.125%
Tween-20	0.1%
SDS	0.015%

物質名	共存物質 許容濃度
Chelating agents	
EDTA	100 mM
EGTA	50 mM
Reducing agents	
Cysteine	10 mM
Dithiothreitol (DTT)	100 mM
Glucose	1 M
2-Mercaptoethanol	1 M
Organic solvents	
Acetone	10%
DMSO	10%
Ethanol	10%
Methanol	10%
Misc. Reagents	
Glycerol	50%
Hydrochloric Acid	100 mM
PMSF	1 mM
16S, 23S rRNA	1 mg/ml
Sodium Hydroxide	100 mM
Streptomycin sulfate	20%
Tryptophan	1 mM
Urea	6 M

タンパク質の種類による影響

タンパク質と色素の結合は、主にタンパク質中の塩基性アミノ酸または芳香族系アミノ酸と色素の結合（特にアルギニンとの結合）によるものです。そのため、タンパク質の種類によって発色率は異なります。図1は、一般的に標準物質として用いられるBSA (Bovine Serum Albumin) とBGG (Bovine Gamma Globulin) の標準曲線です。また、表2に15種類のタンパク質のBSAに対する発色率を示します。

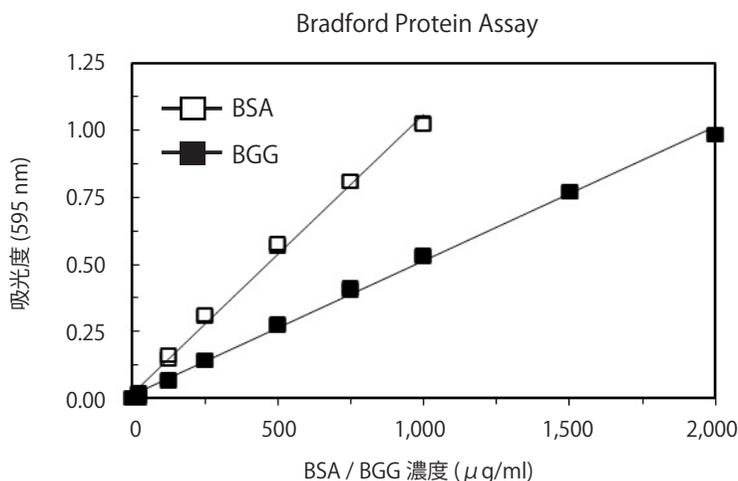


図1. BSA と BGG の標準曲線

表2. BSA に対する各種タンパク質の発色率

タンパク質	Ratio*
Albumin, bovine serum (BSA)	1.00
Alcohol Dehydrogenase, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.64
Aldolase, rabbit muscle	0.80
Carbonic Anhydrase, bovine erythrocytes	0.89
α-Chymotrypsin, bovine pancreas	0.52
Cytochrome C, bovine heart	1.31
Gamma globulin, bovine (BGG)	0.51
Hemoglobin, bovine	1.01
IgG, rabbit	0.40
IgG, mouse	0.58
Insulin, human	0.84
Lysozyme, chicken egg white	0.73
Myoglobin, equine skeletal muscle	1.15
Ovalbumin, chicken egg white	0.68
Transferrin, human	0.79

* : Ratio = (各種タンパク質の吸光度の平均値) / (BSA の吸光度の平均値)

VII. 関連製品

TaKaRa BCA Protein Assay Kit (製品コード T9300A)

VIII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社