

Product Information

Bradford Reagent

製品番号 B6916

保存温度 2~8 °C

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

製品概要

Bradford Reagent は溶液中のタンパク質濃度の測定に使用できます。本法は溶液中でブリリアントブルーG 色素とタンパク質が複合体を形成することに基づいています。タンパク質と色素の複合体が形成されると、色素の最大吸収波長が 465 nm から 595 nm に変化します。吸光度は存在するタンパク質の量に比例します¹。本製品は希釈する必要がなく、マイクロ/マルチウェルプレートによるアッセイや標準的なアッセイに適しています。スタンダードタンパク質として BSA (ウシ血清アルブミン) を使用した場合、タンパク質の検量線濃度範囲は 0.1~1.4 mg/mL です。

Bradford Reagent は還元剤と適合性があります。還元剤は溶液中のタンパク質の安定化によく用いられます。他のタンパク質アッセイ (Lowry 法、BCA 法) は還元剤と適合しません。還元剤を用いた場合は、これらのタンパク質アッセイに代わって Bradford Reagent を使用する必要があります。しかし、Bradford Reagent は低濃度の界面活性剤としか適合しません (適合性チャートを参照して下さい)。定量するタンパク質サンプルのバッファー中に界面活性剤が含まれる場合は、BCA 法によるアッセイをお勧めします。

試薬

本製品には、ブリリアントブルーG(リン酸、メタノールに溶解)から構成されています。500 mL の包装で、3.1 mL の標準的なアッセイが 160 回はできます。

必要な試薬および器具(行う形式によって異なります)

- 吸光度 595 nm 領域が測定可能な分光光度計
- 96 ウェルプレート、製品番号 M0156
- 96 ウェルプレート用シール、製品番号 Z36,966-7
- 試験管、13 x 100 mm、製品番号 Z25,512-2
- 3 mL ディスポーザブルのプラスチック製キュベット、製品番号 C5291
- 1 mL ディスポーザブルのプラスチック製キュベット、製品番号 C5416

- タンパク質スタンダード品 (BSA) 溶液、(2 mg/mL)
製品番号 P0834
- タンパク質スタンダード品 (BSA) 溶液、(1 mg/mL)、製品番号 P0914、低濃度タンパク質測定用

ご使用前の注意と免責事項

弊社の製品は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート (MSDS) をご覧ください。

保存/安定性

本製品は 2~8 °C で保存して下さい。2~8 °C で未開封の場合、1 年間は安定です。

手順

3.1 mL のスタンダード的なブラッドフォード法によるアッセイでは、タンパク質サンプルと Bradford Reagent を 1:30 で混合します。サンプルにはブランク、タンパク質スタンダード品、未知のサンプルを用います。ブランクは、タンパク質を含まないバッファーです。タンパク質スタンダード品は、既知濃度のタンパク質で、未知のサンプルは定量する溶液です。

ブラッドフォード法によるアッセイは、通常室温で行います。すぐに発色します。595 nm の吸光度を記録して、検量線と比較することによりタンパク質濃度が決まります。

3 種類の方法がありますが、初めての場合はまず 3.1 mL の標準的なアッセイを行うことをお勧めします。マイクロアッセイは低濃度のタンパク質サンプル用です。96 ウェルプレートアッセイはプレートを用いてブラッドフォード法によるアッセイを行いたい人向きです。

A. 3.1 mLのスタンダード的なブラッドフォード法によるアッセイプロトコール

(0.1 mLの0.1~1.4 mg/mLのタンパク質サンプルを用います。)

本アッセイは試験管で行います。本アッセイでは、試験管1本あたり0.1 mLのタンパク質サンプルと3 mLのBradford Reagentを用います。キュベット中の0.05 mLのサンプルに1.5 mLのBradford Reagentを加えることで直接行うことも可能です。

注: 用いる形式にかかわらずアッセイ毎の検量線の作成が必要です。

- ボトルに入ったBradford Reagentを穏やかに混和して、室温にします。
- 未知のサンプルと同じバッファーで適切な濃度のスタンダードタンパク質を調製します。2 mg/mLまたは1 mg/mLのBSAタンパク質スタンダード品を連續希釈してスタンダードタンパク質を作成します(表1)。バッファーの代わりに脱イオン水も使用できますが、スタンダードタンパク質におけるバッファー成分による干渉は補正されません。スタンダードタンパク質の使用可能範囲は0.1~1.4 mg/mLです。表1と同様のスタンダードアッセイ表を作成して下さい。

表1.

標準的なアッセイの例(一覧表)

未知の濃度のタンパク質サンプルについては、検量線の0.1~1.4 mg/mLの範囲に濃度が入っているかを確かめるために希釈系列を作る必要がある場合があります。チューブ6は2倍希釈の未知のサンプルを示しています。研究者が各未知のサンプルの濃度の推定に基づき希釈系列を決定する必要があります。

チューブ番号	サンプル(mL)	[BSA]スタンダードタンパク質(mg/mL)	Bradford Reagent(mL)
1	0.1	0	3
2	0.1	0.25	3
3	0.1	0.5	3
4	0.1	1.0	3
5	0.1	1.4	3
6	0.1	(未知)	3

スタンダードタンパク質の調製のため、1 mg/mLタンパク質スタンダード品(P0914)または2 mg/mLスタンダード品(P0834)を使用して下さい。

各チューブには0.1 mLの既知スタンダードタンパク質、ブランク(バッファーのみ)または未知のサンプルを入れます。

- 各チューブに3 mLのBradford Reagentを添加後、完全に混和するように穏やかにボルテックスする必要があります。各チューブの総液量は3.1 mLです。
- サンプルを室温で5~45分間インキュベートします。
- サンプルをキュベットに移します。
- 595 nmで吸光度を測定します。タンパク質-色素複合体は60分まで安定です。サンプルの吸光度の測定は60分の制限時間内に、また全サンプルの測定は10分以内に行う必要があります。
- 未知のサンプルをスタンダードタンパク質を用いて作成した検量線と比較することによりタンパク質濃度が決まります。

表2.

アッセイデータ例(表)

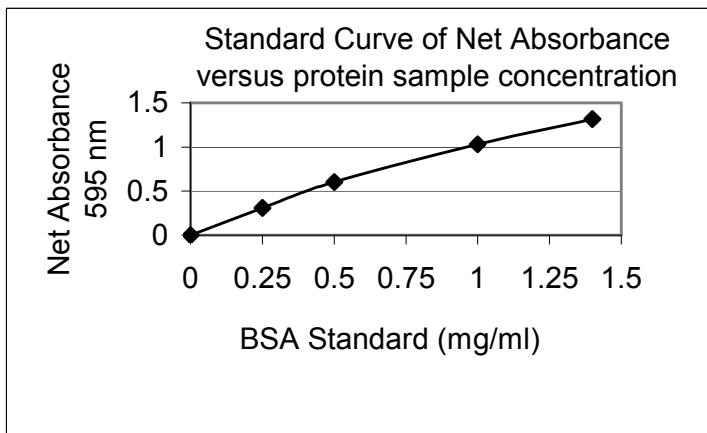
アッセイから得られた吸光度の結果を用いて表を作成します。

注: 下に示した表を検量線の代わりに使用しないで下さい。各アッセイにおけるBSAスタンダードタンパク質(チューブ1~5)の吸光度はここに示した数値とは異なります。

チューブ番号	A_{595}	NET A_{595}	[タンパク質]/アッセイ(mg/mL)	希釈度
1	0.433	0	0	1
2	0.742	0.308	0.25	1
3	1.036	0.602	0.5	1
4	1.463	1.029	1.0	1
5	1.750	1.316	1.4	1
6	1.245	0.811	0.75	2

結果が得られたら、未知のサンプルのタンパク質濃度を決めるために検量線を作成します。スタンダードタンパク質濃度に対して595 nmの実質の吸光度(Net A595)をプロットします(チューブ1~5)。

図 1.
アッセイデータから作成した検量線



検量線から、チューブ 6 (Net A₅₉₅ = 0.811) の未知のサンプルには 0.75 mg/mL のタンパク質が含まれていることが示されています。

最初の未知のタンパク質溶液中に存在するタンパク質の総濃度は次のように計算します：

$$(mg/mL \text{ 未知のタンパク質サンプル}) \times (\text{希釈度}) \\ (0.75 \text{ mg/mL}) \times (2) = 1.5 \text{ mg/mL タンパク質}$$

B. 2 mLマイクロアッセイプロトコール

(1 mL の 1~10 µg/mL のタンパク質サンプルを用います。)
マイクロアッセイは大量 (1 mL 以上) の希釈サンプルが測定用に使用できる場合に用います。本アッセイの検量線濃度範囲は、スタンダードやマルチウェルプレートアッセイよりも低くなります (1 mL 中の総タンパク質量が 1~10 µg)。

1. ボトルに入ったブレッドフォード試薬を穏やかに混和して、室温にします。
2. BSA スタンダード品または相当するタンパク質スタンダード品を用いて、1~10 µg/mL の範囲でバッファーに溶解したスタンダードタンパク質を調製します。
3. 別々のチューブに 1 mL の各スタンダードタンパク質を加えます。ブランクのチューブには 1 mL のバッファーを加えます。
4. およその濃度が 1~10 µg/mL の範囲の未知のサンプルを調製します。別々のチューブに 1 mL の各サンプルを加えます。
5. 各チューブに、1 mL の Bradford Reagent を加え混和します。
6. サンプルを室温で 5~45 分間インキュベートします。
7. サンプルをキュベットに移します。

8. 595 nm で吸光度を測定します。タンパク質一色素複合体は 60 分まで安定です。サンプルの吸光度の測定は 60 分の制限時間内に、また全サンプルの測定は 10 分以内に行う必要があります。
9. 各スタンダードタンパク質濃度に対して Net A₅₉₅ の値をプロットします。
10. 検量線に対して Net A₅₉₅ 値を比較することにより未知のサンプルのタンパク質濃度が決まります。

C. 96 ウェルプレートアッセイプロトコール

(5 µL の 0.1~1.4 mg/mL のタンパク質サンプルを用います。)

本アッセイは 96 ウェルプレートで行います。本アッセイでは、少量のサンプル (5 µL) を用いて複数のタンパク質サンプルのアッセイを迅速に行うことができます。
また、このマルチウェルプレートアッセイではタンパク質定量を自動化することも可能です。

1. ボトルに入ったブレッドフォード試薬を穏やかに混和して、室温にします。
2. BSA スタンダード品または相当するタンパク質スタンダード品を用いて、0.1~1.4 mg/mL の範囲でバッファーに溶解したスタンダードタンパク質を調製します。
3. 96 ウェルプレートの別々のウェルに 5 µL のスタンダードタンパク質を加えます。ブランクのウェルには 5 µL のバッファーを加えます。
4. およその濃度が 0.1~1.4 mg/mL の範囲の未知のサンプルを調製します。
5. サンプルの入っているウェルに 250 µL の Bradford Reagent を加え、シェーカーで約 30 秒間混和します。
6. サンプルを室温で 5~45 分間インキュベートします。
その後、595 nm で吸光度を測定します。タンパク質一色素複合体は 60 分まで安定です。サンプルの吸光度の測定は 60 分の制限時間内に、また全サンプルの測定は 10 分以内に行う必要があります。
7. 各スタンダードタンパク質濃度に対して Net A₅₉₅ の値をプロットします。
8. 検量線に対して Net A₅₉₅ 値を比較することにより未知のサンプルのタンパク質濃度が決まります。

適合性チャート

下記の濃度は、スタンダードまたは 96 ウエルプレートアッセイプロトコールにおいてタンパク質サンプル中に存在しても干渉を招かない上限量です。マイクロアッセイでは大量のタンパク質サンプルを用いるので、マイクロアッセイにおける適合量は下記よりも低くなります。

非適合物質	適合量
バッファー系	
ACES (pH 7.8)	100 mM
N-アセチルグルコサミン (PBS に溶解) pH 7.2	100 mM
ビシン (pH 8.4)	100 mM
Bis-Tris (pH 6.5)	100 mM
塩化カルシウム (TBS に溶解, pH 7.2)	10 mM
CelLytic B™試薬	未希釀 干渉なし
CHES (pH 9.0)	100 mM
塩化コバルト (TBS に溶解, pH 7.2)	10 mM
EPPS (pH 8.0)	100 mM
塩化第二鉄 (TBS に溶解, pH 7.2)	10 mM
グリシン	100 mM
HEPES (pH 7.5)	100 mM
イミダゾール (pH 7.0)	200 mM
MES (0.1 M), NaCl (0.9%) (pH 4.7)	未希釀
MES (pH 6.1)	100 mM
MOPS (pH 7.2)	100 mM
塩化ニッケル (TBS に溶解, pH 7.2)	10 mM
PBS; リン酸 (0.1 M), NaCl (0.15 M) (pH 7.2)	未希釀
PIPES (pH 6.8)	100 mM
酢酸ナトリウム (pH 4.8)	180 mM
炭酸水素ナトリウム	0.1 M
クエン酸ナトリウム (pH 4.8 または pH 6.4)	200 mM
クエン酸ナトリウム (0.6 M), MOPS (0.1 M), pH 7.5	未希釀
リン酸ナトリウム	0.1 M
TBS; Tris (25 mM), NaCl (0.15 M), pH 7.6	未希釀
Tricine (pH 8.0)	100 mM
トリエタノールアミン (pH 7.8)	100 mM
Tris	2.0 M
Tris (25 mM), グリシン (192 mM), pH 8.0	未希釀
Tris (25 mM), グリシン (192 mM), SDS (0.1%) (pH 8.3)	1:2 希釀
塩化亜鉛 (TBS に溶解, pH 7.2)	10 mM

非適合物質 (続き)	適合量
バッファー添加物	
硫酸アンモニウム (硫安)	1.0 M
アプロチニン、ウシ肺由来	10 mg/L
アスパラギン	10 mM
炭酸水素セシウム	0.1 M
グルコース	1.0 M
グリセロール	10%
グアニジン塩酸塩	3.5 M
塩酸	0.1 M
イミダゾール (pH 7.0)	200 mM
ロイペプチド	10 mg/L
フェノールレッド	0.5 mg/mL
PMSF	1 mM
アジ化ナトリウム	0.5%
塩化ナトリウム	5.0 M
水酸化ナトリウム	0.1 M
オルトバナジウム酸ナトリウム (PBS に溶解) 1 mM	1 mM
チメロサール	0.01%
スクロース	10%
TLCK	0.1 mg/L
TPCK	0.1 mg/L
尿素 3.0 M	3.0 M
界面活性剤	
BRIJ®-35	0.125%
BRIJ-52	0.031%
CHAPS	5%
CHAPSO	5%
デオキシコール酸	0.050%
Nonidet P-40 (IGEPAL® CA-630)	0.5%
SB3-14	0.125%
界面活性剤	
オクチル β - グルコシド	0.5%
オクチル β - チオグルコピラノンド	3%
SDS	0.125%
SPAN® 20	0.5%
TRITON™ X-100	0.125%
TRITON X-114	0.125%
TRITON X-305	0.5%
TRITON X-405	0.5%
TWEEN® 20	0.062%
ツイーン 60	0.1%
ツイーン 80	0.062%

非適合物質 (続き)	適合量
キレート剤	
EDTA 100 mM	100 mM
EGTA 2 mM	2 mM
クエン酸ナトリウム (pH 4.8 または pH 6.4)	200 mM
還元剤およびチオール含有化合物	
2-メルカプトエタノール	1.0 M
アスコルビン酸	50 mM
システイン	10 mM
ジチオエリスリトール (DTE)	1 mM
チオオスレイトール (DTT)	5 mM
チオシアン酸カリウム	3.0 M
溶媒	
アセトン	10%
アセトニトリル	10%
DMF	10%
DMSO	10%
エタノール	10%
メタノール	10%

注: これは完全な適合性チャートではありません。さまざまなタンパク質に、さまざまな方法で影響を与える可能性のある物質が数多くあります。脱イオン化水のみで目的のタンパク質を測定した後、干渉の可能性のある物質を含むバッファーで測定して下さい。吸光度の比較から干渉物質が存在するかどうかがわかります。干渉物質に関する追加の情報については以下の参考文献を参照して下さい。¹⁻⁷

注: アッセイのpHを変化させたり、高濃度の界面活性剤を含む試薬はブラッドフォード法によるアッセイに影響を及ぼします。

トラブルシューティングガイド

未知のタンパク質サンプルの吸光度が高すぎる

1. バッファー中に干渉物質が存在しないことを確認して下さい。スタンダードタンパク質サンプルを未知のサンプルと同じバッファーで希釈して測定してみて下さい。
2. 未知のサンプル中のタンパク質濃度が高い可能性があります。未知のサンプルを適宜希釈して下さい。
3. タンパク質サンプル量が少ない場合は、マイクロアッセイを試すか、QuantiPro BCA assay kit (QP-BCA) を使用して下さい。

タンパク質サンプルに非適合物質が含まれている

1. タンパク質サンプルの濃度が十分に高い場合は、干渉物質の濃度を下げるためにサンプルを希釈して下さい。

テクニカルチップ

1. 使用するガラス器具は十分に洗浄されているか確認して下さい。
2. Bradford Reagent がアッセイを行うときに室温になっていることを確認して下さい。Bradford Reagent が穏やかに混和されていることも確認して下さい。
3. 別のタンパク質アッセイを検討して下さい。アッセイから非適合物質を除去できない場合は、BCA アッセイ (製品番号 BCA-1) で行うことを検討して下さい。
4. タンパク質濃度が低すぎる場合は、QuantiPro BCA Kit (製品番号 QP-BCA) を試して下さい。

参考文献

1. Bradford, M.M., Anal. Biochem., **72**, 248 (1976).
2. Compton, S.J. et al., Anal. Biochem., **151**, 369-374 (1985).
3. Friedenauer, D. et al., Anal. Biochem., **178**, 263-268 (1989).
4. Rubein, R.W. et al., Anal. Biochem., **83**, 773-777 (1977).
5. Sedmak, J.J. and Grossberg, S.E., Anal. Biochem., **79**, 544 (1977).
6. Sokutgerber, A.G. et al., Anal. Biochem., **179**, 198-201 (1989).
7. Tal, M. et al., J. Biol. Chem., **260**, 9976-9980 (1985).

TRITON は Union Carbide Corporation の商標です。
BRIJ、TWEEN、SPAN は ICI Americas の登録商標です。
IGEPAL は Rhone-Poulenc AG Co.の登録商標です。

MAM/JDS 6/04