

XL-Bradford [界面活性剤適応]

Cat No. KY-1040、1041

【目的・用途】

一般的な Bradford 法によるタンパク質定量試薬は、界面活性剤の影響を大きく受けてしまいます。本試薬は、様々な界面活性剤を含む溶液に溶解されたタンパク質濃度を正確に測定できるように、Bradford 試薬を改良したものです。タンパク質抽出や精製の工程で添加した界面活性剤の存在を気にせずに正確なタンパク質定量ができます。

操作手順は本試薬とタンパク質溶液を混合して 595nm の吸光度を測定するだけで迅速・簡便な定量が可能です。混合してから加温する必要なく、また、混合後 1 時間程度は吸光度が変化しませんので、多検体を処理する場合にも最適です。

SDS-PAGE サンプルバッファー (2%SDS 含有) 中のタンパク質濃度を測定したい場合は、XL-Bradford[SDS-PAGE 適応] (Cat No. KY-1030) をご使用ください。

【特徴】

- 様々な界面活性剤を含む試料中のタンパク質定量が可能
- 簡便な操作

【内容・保存方法】

Cat No.	容量	保管温度	使用期限
KY-1040	100mL (5×)	4°C	1 年
KY-1041	500mL (5×)		

【基本情報】

表 1 定量できるタンパク質濃度の範囲

通常法	微量法
0.1~1.0 mg/mL	2~50 µg/mL

表 2 サンプルに含まれていても測定に影響がない化学物質の上限濃度

成分	許容上限		
	通常法	微量法	
酸・塩基	HCl	100mM	2.5mM
	NaOH	100mM	2.5mM
バッファー	Acetate	600mM	15mM
	Ammonium sulfate	1M	25mM
	Citrate	50mM	1.25mM
	Glycine	100mM	2.5mM
	HEPES	100mM	2.5mM
	Phosphate	2M	50mM
	Tris	2M	50mM
界面活性剤	SDS	1%	0.025%
	Deoxycholate	2%	0.05%
	Triton X-100	5%	0.125%
	o-β-D thioglucoside	10%	0.25%
	Tween20	2%	0.05%
	Brij35	7.5%	0.188%
	D-β-D maltoside	5%	0.125%
	Zwittergent	4%	0.10%
	o-β-D glucoside	10%	0.25%
	CHAPS	10%	0.25%
	NP-40	7.5%	0.188%
還元剤	Dithiothreitol	1M	25mM
	2-Mercaptoethanol	1M	25mM
その他	EDTA	100mM	2.5mM
	Glycerol	100%	2.5%
	KCl	1M	25mM
	NaCl	5M	125mM
	Sucrose	300mM	7.5mM
	Urea	6M	150mM

【本品以外に準備が必要な器具】

- 595nm の吸光度測定が可能な分光光度計もしくはプレートリーダー
- 分光光度計に適したキュベット(試験管・チューブを使用する場合)
- 試験管・チューブ・マイクロプレート
- ボルテックスミキサー
- 0.45 µm フィルター
- 正確なピペット

【通常法プロトコール】

1) BSA スタンダード溶液の調製

0.0~1.0mg/mL の範囲で 6 点以上、n=2 で BSA スタンダード溶液を調製します。

※BSA 以外のタンパク質をスタンダードとして用いることもできます。

(例) 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg/mL の BSA スタンダードを調製する場合

①2mg/mL の BSA 溶液を調製します。

BSA 粉末を溶解して調製する場合は、測定する濃度未知サンプルと同じバッファーで溶解します。BSA 溶液を希釈して調製する場合は、測定する濃度未知サンプルと同じ終濃度のバッファー組成となるように希釈します。

②表の通り、BSA スタンダード溶液の希釈系列を調製します。

※BSA スタンダードは n=2 で調製してください。

BSA 溶液の 終濃度 (mg/mL)	2mg/mL BSA 溶液 (µL)	希釈溶液 (µL)
1.0	50	50
0.8	40	60
0.6	30	70
0.4	20	80
0.2	10	90
0.0	0	100

2) XL-Bradford 試薬の準備

[×5] XL-Bradford 試薬を室温に戻し、超純水で 5 倍希釈した後に十分混合します。XL-Bradford 試薬 (1×) は 1 サンプルにつき 0.5 mL 必要です。※沈殿が見られる場合はろ紙などを用いてフィルトレイトします。

※5 倍希釈した試薬は、当日中に使い切ってください。

3) サンプルと XL-Bradford 試薬の混合

①濃度未知サンプル及びスタンダードタンパク質溶液を、それぞれ別のチューブに 10 µL ずつ分注します。

②①で調製した XL-Bradford 試薬 (1×) を各チューブに 0.5 mL 加え、混合します。

※液量を変更する場合は、サンプル:試薬の比率を変えないでください。
→ 例えば、サンプル 20 µL + XL-Bradford 試薬 (1×) 1.0mL

4) インキュベート

室温で 5 分間インキュベートします。

※インキュベート時間が長くなると徐々に吸光度が高くなりますので、室温で 1 時間以内にしてください。

5) 測定

濃度未知サンプル及びスタンダードを、キュベットに分注し、595nm における吸光度を測定します。

※ブランク (0mg/mL スタンダード溶液) の吸光度を 0 に合わせ、1 本のキュベットを使用する場合は濃度の低い順に測定してください。

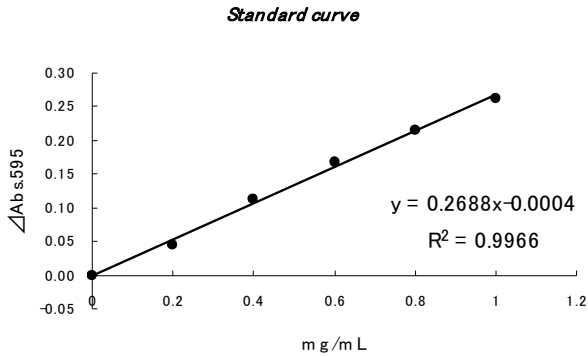
6) 検量線の作成

①n=2 で測定した BSA スタンダードの、吸光度 (Abs₅₉₅) の平均値を算出します。

②①で算出した吸光度 (Abs₅₉₅) の平均値を Y 軸、BSA スタンダードの濃度

(mg/mL) を X 軸にとり、最小二乗法により近似曲線を引き、検量線を作成します。

例)



- 7) 濃度未知サンプルのタンパク質濃度の算出
作成した検量線の数式を用いて、濃度未知サンプルのタンパク質濃度を算出します。

例) 濃度未知サンプルの吸光度が 0.4015 の場合、
(吸光度) - (ブランク) $0.4015 - 0.2468 = 0.1547$
一次式の y に代入 $0.1547 = 0.2688x - 0.0004$
 $x = 0.5770 \text{ mg/mL}$

【微量法プロトコール】

- BSA スタンダード溶液の調製
通常法と同様にスタンダード溶液を調製します。
- XL-Bradford 試薬の準備
[×5] XL-Bradford 試薬を室温に戻します。希釈はしません。
- サンプルと XL-Bradford 試薬の混合
サンプル及びスタンダード 400 μL に対して、[×5] XL-Bradford 試薬を 100 μL 加え、混合します。
- インキュベート
室温で 5 分間インキュベートします。
※インキュベート時間が長くなると徐々に吸光度が高くなりますので、室温で 1 時間以内にしてください。
- 測定
濃度未知サンプル及びスタンダードを、キュベットに分注し、595nm における吸光度を測定します。
※ブランク(0mg/mL スタンダード溶液)の吸光度を 0 に合わせ、1 本のキュベットを使用する場合は濃度の低い順に測定してください。
- 検量線の作成
 - n=2 で測定した BSA スタンダードの、吸光度(Abs.₅₉₅)の平均値を算出します。
 - ①で算出した吸光度(Abs.₅₉₅)の平均値を Y 軸、BSA スタンダードの濃度 (mg/mL) を X 軸にとり、最小二乗法により近似曲線を引き、検量線を作成します。
- 濃度未知サンプルのタンパク質濃度の算出
作成した検量線の数式を用いて、濃度未知サンプルのタンパク質濃度を算出します。



株式会社ファーマフーズ アプロサイエンスグループ
〒770-0865 徳島県徳島市南末広町 4-53 エコービル 4 階
■Tel: 088-678-6372 ■Mail: bio@apro-s.com
■URL: <https://apro-s.com/>
本社 〒615-8245 京都府京都市西京区御陵大原1-49