

XL-Bradford [SDS-PAGE 適応]

Cat No. KY-1030、1031

【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、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正確に測定できるように、Bradford 試薬を改良したものです。BPB 色素や還元剤を含んだサンプルバッファーでも測定可能です。

操作手順は通常の Bradford 法と同様で、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 以外の界面活性剤が含まれる場合は、XL-Bradford[界面活性剤適応] (Cat No. KY-1040) をご使用ください。

【特徴】

- SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解したタンパク質の定量が可能
- 還元剤や BPB 色素を含有したサンプルバッファーもそのまま適応可能
- 簡便な操作

【内容・保存方法】

Cat No.	容量	保管温度	使用期限
KY-1030	100mL (5×)	4°C	1 年
KY-1031	500mL (5×)		

【基本情報】

定量できるタンパク質濃度の範囲

0.1~1.0mg/mL

表 1 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	2%	0.05%
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またはプレートリーダー
- 分光光度計に適合したプラスチック製ディスポーザブル キュベット (試験管・チューブを使用する場合)
- 試験管・チューブまたはマイクロプレート
- ボルテックスミキサー
- 正確なマイクロピペット
- 0.45μm フィルター (必要な場合)

【1mL 反応系 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 倍希釈した後十分に混合します。XL-Bradford 試薬 (1×) は 1 サンプルにつき 1mL 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 20μL 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 1mL 加え、混合します。

※使用機器によって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。

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。

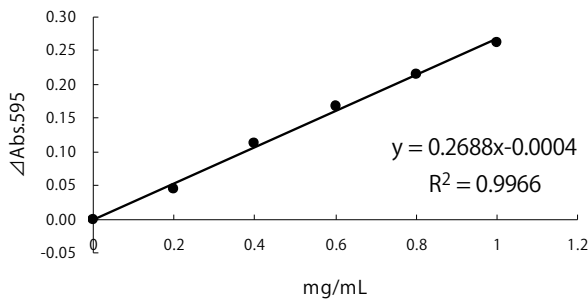
6) 検量線の作成

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)

Standard curve



- 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 mg/mL

【200 μL 反応系 プロトコール】

- BSA スタンダード溶液の調製
1mL 反応系と同様に BSA 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、超純水で 5 倍希釈した後十分に混合します。XL-Bradford 試薬 (1×) は 1 サンプルにつき 200 μL 必要です。
※沈殿が見られる場合は 0.45 μm フィルターなどを用いてフィルタレイトします。
※5 倍希釈した試薬は、当日中に使い切ってください。
- 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、マイクロプレートの各ウェルへ 4 μL ずつ分注します。
②2) で調製した XL-Bradford 試薬 (1×) を各ウェルに 200 μL 加え、よく混合します。
※使用機器によって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。
- 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
プレートリーダーを用いて、595nm の吸光度を測定します。
- 検量線の作成
①n=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。
②①で算出した吸光度の平均値から Blank 値を差し引きます。
③②で算出した、Blank 値を差し引いた吸光度(Abs.595)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。

【微量法プロトコール】

- 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。
- スタンダードの調製
①スタンダードを 100 μg/mL の濃度に希釈します。
※サンプルと同じ溶液組成になるように調製してください。
②スタンダードタンパク質溶液の希釈系列を作製します(n=2)。
表の通り「100 μg/mL スタンダード」と「希釈溶液」を混合し、0.0~50 μg/mL の範囲で 6 段階のスタンダードタンパク質溶液を作製します。
※希釈溶液はスタンダードと同様に、サンプルと同じ溶液組成となるように調製してください。

スタンダードタンパク質溶液 (μg/mL)	100 μg/mL スタンダード (μL)	希釈溶液 (μL)
0	0	1000
10	100	900
20	200	800
30	300	700
40	400	600
50	500	500

- 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。
※使用機器によって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。
- 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
595nm で吸光度を測定します。
- 検量線の作成
① n=2 で測定したスタンダードタンパク質溶液の、吸光度(OD₅₉₅)の平均値を算出します。
②①で算出した吸光度の平均値から Blank 値を差し引きます。
③②で算出した吸光度(OD₅₉₅) / 濃度(mg/mL)の検量線を作成しサンプルの濃度を算出します。
- 濃度未知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