

#9 ブラッドフォードアッセイの微量測定

序文

タンパク質濃度の迅速かつ正確な測定は研究に不可欠です。使用するタンパク質サンプルとバッファーに応じて、最適な吸光光度法を実施する必要があります。280nm におけるタンパク質の測定には、吸光に影響しないようなバッファーで溶解したタンパク質が必要です。この条件を満たせない場合、ブラッドフォード、BCA またはローリーなどの測定法を推奨します。

最適な測定法は、以下の項目に応じて選択する必要があります。

- ・アッセイの測定範囲
- ・バッファー成分のアッセイ試薬への影響

詳細については、製造元のプロトコルを参照してください。

本テクニカルノートは、ブラッドフォード法(Bradford 1976)について記述します。

ブラッドフォード法は、溶液中の総タンパク質を迅速に検出および定量するための測定法です。タンパク質と色素の複合体形成に依存します。色素のクマシーブリリアントブルーは、陽イオン型、陰イオン型、中性型の3つが存在します(Compton and Jones 1985)。酸性環境下では色素は溶液中のタンパク質に結合します。陽イオン型（赤）がタンパク質に結合すると陰イオン型（青）に変化します。陰イオン型は590nmで吸収極大を示します（ $A_{max} = 590\text{nm}$ ）。タンパク質-色素複合体は、595nmで最適に検出できます。したがって、タンパク質の濃度は形成された陰イオン型の色素の量を検出することで測定できます (Kruger 2002)。

未知のタンパク質の濃度は、595nmでの濃度既知の標準溶液と比較することで測定できます。アッセイは室温で行うことができ、特別な機器は必要ありません。

材料

- Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Reagent
Thermo Scientific # 23238
- Pierce Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set
Thermo Scientific # 23208

上記を測定に使用しました。

測定は NanoPhotometer NP80 / N60 / N50 の Protein Assay で行いました。

プロトコル

本テクニカルノートでは、微量測定について記述します。キュベット測定については、製造元のプロトコルを参照してください。

NanoPhotometer でのブラッドフォード法の測定範囲は以下の通りです。

NP80/N60 : 0–2000 $\mu\text{g/mL}$

N50 : 0–1000 $\mu\text{g/mL}$

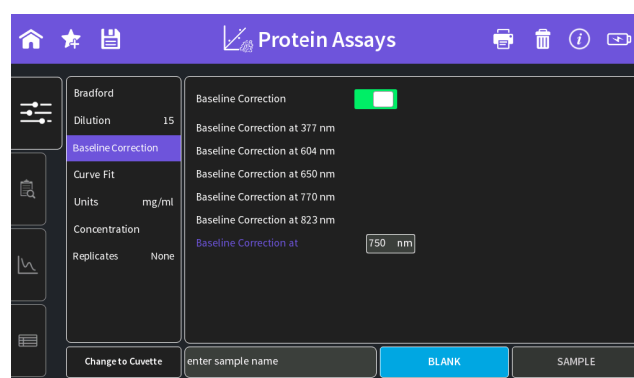
アッセイ試薬とサンプルは 50 : 1 で使用します。室温で 10 分間インキュベートします。

未知濃度サンプルと標準液との調製 :

1. アッセイ試薬、BSA 標準溶液、濃度未知サンプルを室温で平衡化します。
2. リアクションチューブにアッセイ試薬 250 μL を加えます。
Note : replicate 用に別のチューブを用意してください。
Note : 標準曲線にゼロ点を追加することをお勧めします。
アッセイ試薬と ddH₂O でゼロ標準液を準備してください。
3. 5 μL の標準溶液または濃度未知サンプルを添加します。
4. ボルテックスでよく混合します。
5. 室温でインキュベートします。

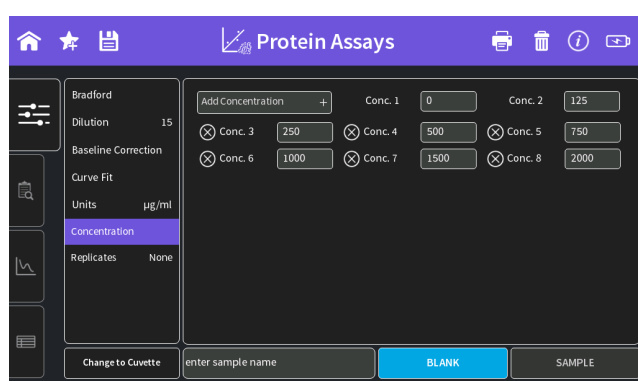
NanoPhotometer Protein Assay でのパラメーター設定

- **Bradford** : (595 nm)
- **Dilution** : 15 / 0.67 mm path
- **Baseline Correction** :
NanoPhotometer NP80 / N60 : 750nm まで
NanoPhotometer N50 : 350nm まで



#9 ブラッドフォードアッセイの微量測定

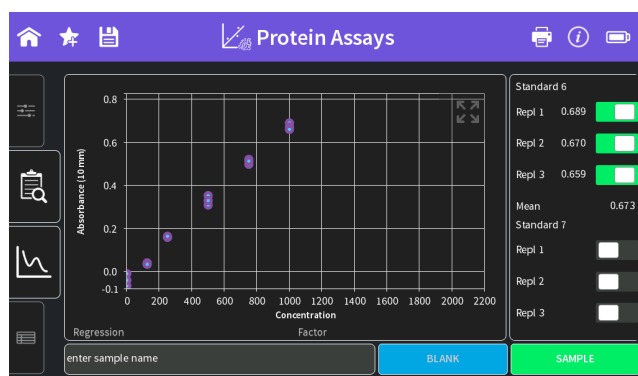
- **Curve Fit** : Regression 2nd order (2次回帰曲線)
- **Units** : 使用する標準溶液の単位を入力
- **Concentration** : 使用する標準溶液の濃度を入力
画面上[Add Concentration]を押して、濃度を追加できます。Thermo Scientific 社 #23208 の標準溶液の濃度は次の通りです。
0 µg/ml; 125 µg/ml; 250 µg/ml; 500 µg/ml; 750 µg/ml; 1000 µg/ml; 1500 µg/ml and 2000 µg/ml.



- **Replicates** :
3をお勧めします。

標準曲線を作成 :

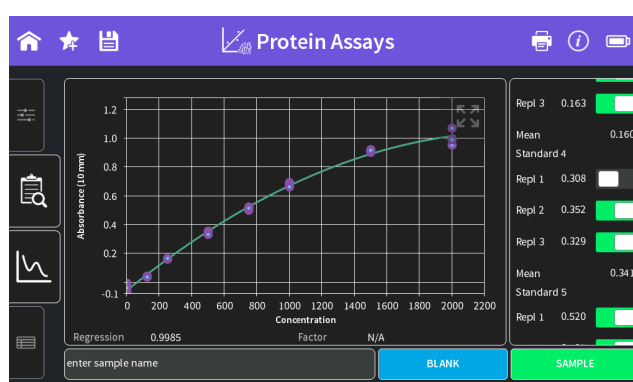
1. ブランクで 2 µL の ddH₂O を測定します。
2. 標準溶液 2 µL を順番に測定します。



3. 標準溶液を全て測定すると標準曲線が表示され、回帰曲線が計算され、表示されます。

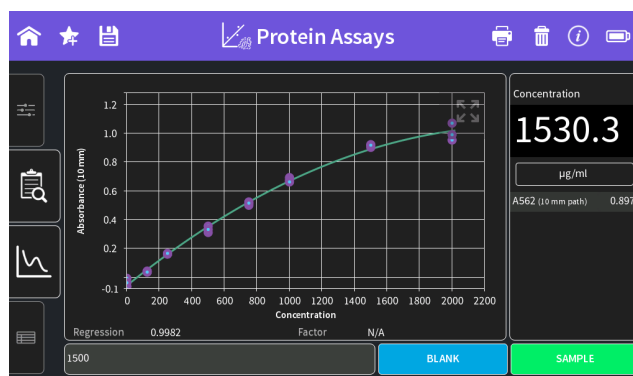
画面右側のトグルスイッチ (ON 緑/OFF 灰色) をオフにすることにより、標準溶液または Replicates を標準曲線の計算から除外することができます。

標準曲線の変更は、濃度未知サンプルの測定前にのみ可能ですので注意してください。



濃度未知のサンプル測定 :

測定には、2 µL のサンプルを使用します。濃度は、結果とテーブルビューに表示されます。



クリーニング :

ブランク、標準溶液、サンプルをそれぞれ測定する毎に、少し濡らしたリントフリーのティッシュでサンプルアームの測定部とミラー部を丁寧に拭いてください。

#9 ブラッドフォードアッセイの微量測定

結果

図 1 と 2 は、ブラッドフォードアッセイでの典型的な標準曲線です。

図 1 では BSA 標準溶液 0–2000 µg/mL を NanoPhotometer N60 で測定し、 $R^2=0.9978$ でした。

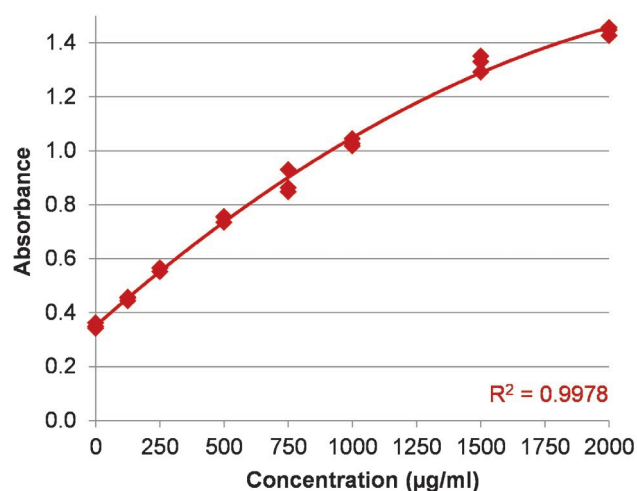
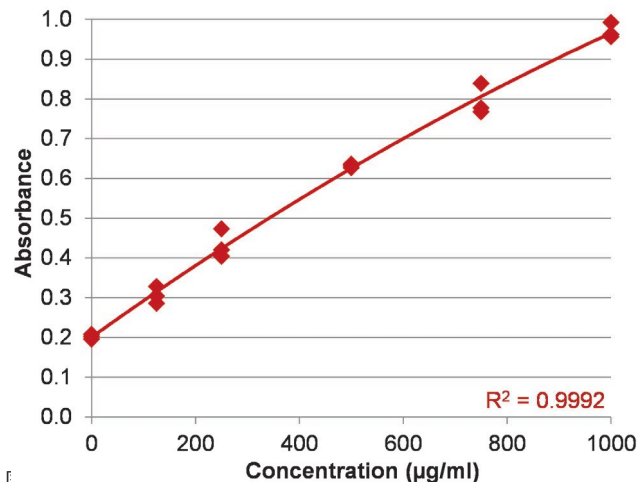


図 1 : 0–2000 µg/ml の標準曲線 (N60)

図 2 では BSA 標準溶液 0–1000 µg/mL を NanoPhotometer N50 で測定し、 $R^2=0.9992$ でした。



参考文献

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248–254.

Compton, S. J. and Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analyt. Biochem.* 151, 369–374.

Kruger N.J. (2002). The Bradford Method for Protein Quantitation. In: Walker J.M. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press