

はじめに

タンパク質濃度の検出方法として、Lowry 法、Bicinchoninate 法 (BCA 法)、Biuret 法、Bradford 法等が知られています。中でも Coomassie Brilliant Blue G (CBB) (Fig.1) は高感度で反応が速いタンパク検出用試薬として、Bradford 法で用いられています。Coomassie Brilliant Blue G はタンパク質に作用し、酸性条件で青色に呈色し ($\lambda_{\max}=595$ nm) (Fig.2)、呈色反応は 1 分以内に終了します。生じた色素は 30 分以上安定なため、数分でタンパク質量を行うことができます。本キットはマイクロプレートアッセイに対応しており、ready-to-use の状態にした CBB 溶液と検量線用の BSA 溶液が含まれています。定量できるタンパク質の濃度範囲は標準法で 10 $\mu\text{g/ml}$ ~ 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 、マイクロ法で 1 $\mu\text{g/ml}$ ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ です。

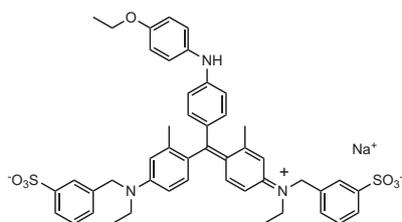


Fig.1 Coomassie Brilliant Blue G (CBB)

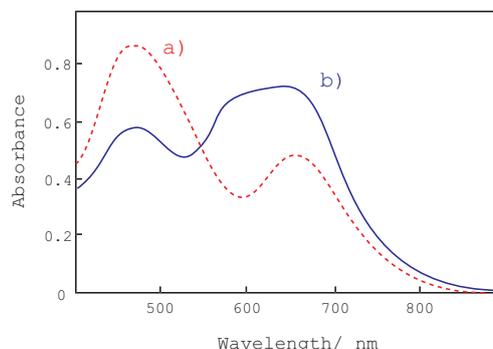


Fig.2 Coomassie Brilliant Blue G の吸収スペクトル
a) タンパク質無し b) タンパク質あり (BSA 500 $\mu\text{g/ml}$)

キット内容

<500 tests>	CBB solution	100 ml×2
	Standard BSA solution (4,000 $\mu\text{g/ml}$)	1.5 ml×1
<2500 tests>	CBB solution	1,000 ml×1
	Standard BSA solution (4,000 $\mu\text{g/ml}$)	1.5 ml×2

保存条件

0 ~ 5°Cで保存してください。CBB solution は 0 ~ 5°Cで 12 ヶ月、室温では 6 ヶ月安定です。

必要なもの
(キット以外)

- マイクロプレートリーダー (600 nm フィルター)
 - 20 μl 、200 μl マイクロピペッター (可変式)
 - 96 穴マイクロプレート
 - 1.5 ml チューブ
- (マイクロプレートリーダーがない場合、吸光光度計でも測定できます。)

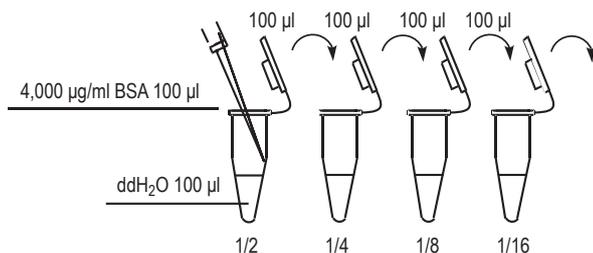
使用上のご注意

- タンパク種により感度の変化が生じますので、Table 2 の変動値を考慮して下さい。更に正確な値を得るためには同じタンパク種を検量線用の標準物としてご使用下さい。
- CBB solution は酸性です。取扱いには充分注意して下さい。
- サンプルのタンパク質の濃度が高すぎる場合、CBB solution との混合時に沈殿を起こす事があります。タンパク濃度が高い場合には、予め希釈してご使用下さい。
- 本キットにはガラス製容器を使用しております。保護手袋をご着用頂くなど取扱にはご注意ください。

プロトコール

1. 標準法

- 1) Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈して 0 ~ 2,000 $\mu\text{g/ml}$ の BSA 希釈溶液を調製する (Fig.3)。
- 2) 1) で調製した各濃度の検量線用 BSA 希釈溶液、またはサンプル 6 μl を各ウェルに加える。検量線は n=3 にすることが望ましい。



4000 $\mu\text{g/ml}$ の Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈し、2000, 1000, 500, 250, 125, 63, 32, 0 $\mu\text{g/ml}$ の BSA 希釈溶液を調製する。

Fig.3 検量線作成用 BSA 希釈溶液の調製方法

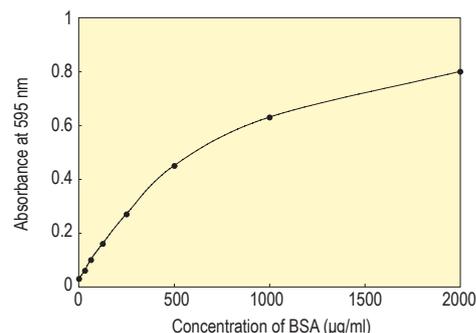


Fig.4 Standard BSA solution で作成した検量線

- 3) CBB solution 300 μl を各ウェルに加える。吸光度測定時に影響するので、加える際に液が泡立たないように注意する。
- 4) 室温で1分間静置する。
- 5) プレートリーダーを使用して570 ~ 600 nmの吸光度を測定する。
- 6) 各ウェルの吸光度からブランク (BSA: 0 $\mu\text{g/ml}$) の吸光度を差し引く。
- 7) 横軸にBSAの濃度を取り、BSA希釈溶液の吸光度から検量線を作成する (Fig.4)。
- 8) 検量線を基にサンプルのタンパク質濃度を算出する。

2. マイクロ法 [この方法は精製されたタンパク質にのみ適用できます。]

- 1) Standard BSA solution (4,000 $\mu\text{g/ml}$) 30 μl を純水で300 μl に希釈し (400 $\mu\text{g/ml}$)、更にその溶液250 μl を純水で1 ml に希釈して100 $\mu\text{g/ml}$ BSA solution を調製する。
- 2) 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA solution を純水で順次1/2に希釈して、0 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ のBSA希釈溶液を調製する (Fig.5)。
- 3) 2)で調製した各濃度の検量線用BSA希釈溶液、またはサンプル150 μl を各ウェルに加える。検量線はn=3にすることが望ましい。
- 4) CBB solution 150 μl を各ウェルに添加後、混和する。吸光度測定時に影響するので、加える際に液が泡立たないように注意する。
- 5) 室温で1分間静置する。
- 6) プレートリーダーを使用して570 ~ 600 nmの吸光度を測定する。
- 7) 各ウェルの吸光度からブランク (BSA: 0 $\mu\text{g/ml}$) の吸光度を差し引く。
- 8) 横軸にBSAの濃度を取り、BSA希釈溶液の吸光度から検量線を作成する。(Fig.6)
- 9) 検量線を基にサンプルのタンパク質濃度を算出する。
- 10) マイクロ法では界面活性剤の影響を受けやすいので、Table 1の阻害物の影響を十分考慮し、阻害作用が大きい場合には、その除去操作を施す。

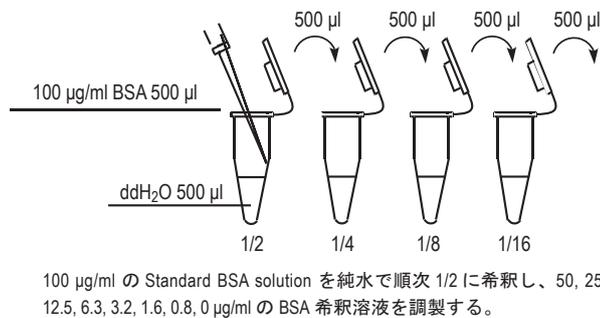


Fig.5 検量線作成用BSA希釈溶液の調製方法

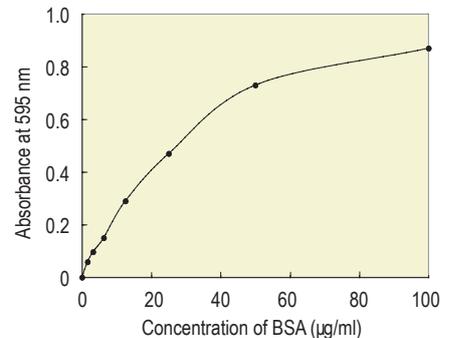


Fig.6 Standard BSA solution で作成した検量線の例 (マイクロ法)

3. セル法 [吸光度計を用いて測定を行う場合は以下のプロトコールに従って測定してください。]

- 1) Standard BSA solution を純水で順次1/2に希釈して0 ~ 2,000 $\mu\text{g/ml}$ のBSA希釈溶液を調製する。(Fig.7)
- 2) 1)で調製した各濃度の検量線用BSA希釈溶液、またはサンプル100 μl を加え、混合する。
- 3) CBB solution 2.5 ml を試験管に入れる。
- 4) 室温で30秒 ~ 1分間試験管を振って、良く混合する。
- 5) 反応溶液を分光光度計用のセル (1 cm \times 1 cm) に移し替え、600 nmの吸光度を測定する。
- 6) 測定された吸光度からブランク (BSA: 0 $\mu\text{g/ml}$) の吸光度を差し引く。
- 7) 横軸にBSAの濃度を取り、BSA希釈溶液の吸光度から検量線を作成する (Fig.8)。
- 8) 検量線を基にサンプルのタンパク質濃度を算出する。

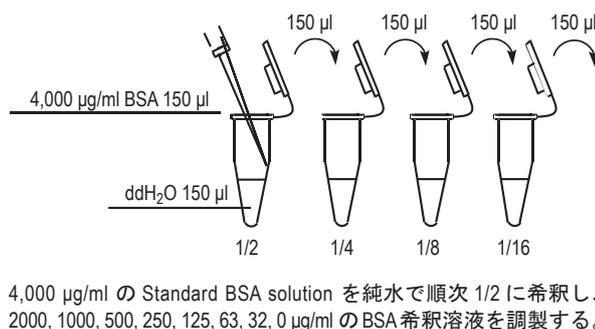


Fig.7 検量線作成用BSA希釈溶液の調製方法

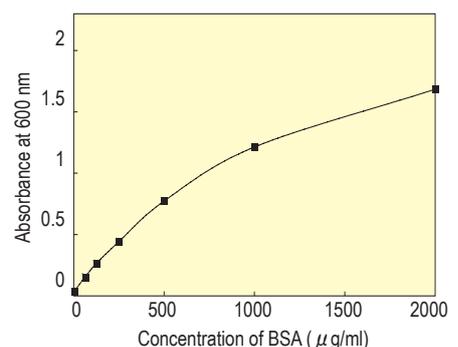


Fig.8 Standard BSA solution で作成した検量線の例 (セル法)

阻害物質の影響

このキットの測定原理はタンパク質の疎水性部位との相互作用を利用しているため、界面活性剤は正の誤差を生じ、その他の物質も高濃度であれば誤差を生じます。標準法において、測定に影響を及ぼさない阻害物質の最大濃度を Table 1 に記載します。

Table 1 測定に影響を及ぼさないサンプル中の阻害物質の最大濃度*

Chemical	Concentration	Chemical	Concentration
Detergent		Salt	
Brij 35	0.125 %	Sodium chloride	2 mol/l
Brij 56	0.025 %	Potassium chloride	2 mol/l
Brij 58	0.005 %	Sodium acetate	0.4 mol/l
Triton X-100	0.125 %	Sodium bicarbonate	0.1 mol/l
Triton X-114	0.125 %	Buffer	
Tween 20	0.25 %	Citrate pH 5.0	0.125 mol/l
Tween 80	0.1 %	MES pH 6.1	0.125 mol/l
SDS	0.1 %	Tris pH 7.4	0.0625 mol/l
CHAPS	4 %	PBS	Undiluted
CHAPSO	4 %	HEPES pH 7.5	0.125 mol/l
MEGA 10	4 %	CHES pH 9.0	0.125 mol/l
Octyl-β-D-glucoside	0.5 %	Reducing agent	
Organic solvent		Glucose	2 mol/l
Ethanol	10 %	Glutathione	0.04 mol/l
Isopropanol	10 %	Ascorbic acid	0.4 mol/l
DMSO	10 %	Dithiothreitol	0.01 mol/l
Chelating agent			
EDTA	0.4 mol/l		
DTPA	0.4 mol/l		

* 無添加の BSA による検量線との誤差が 5% 以内の濃度。

タンパク種による変動

本キットは検量線用のタンパク質として BSA を用いていますが、すべてのタンパク種に対し、この検量線を使うことはできません。タンパク種による感度の変動を Table 2 に示します。

Table 2 タンパク種による感度の変動

Protein	Protein vs. BSA ^{a)}
BSA	1.00
Chymotrypsinogen A	0.67
Transferrin	1.02
Human IgG	0.96

a) 値は検量線の傾きの比を示す。
(タンパク種の傾き / BSA での傾き)

参考文献

1) M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248.

<開発元>

Dojindo Molecular Technologies, Inc.
30W Gude Dr, Suite 260, Rockville, Maryland, 20850 U.S.A.
Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687
URL: www.dojindo.com

<委託製造元>

株式会社 同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 丁 861-2202
Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 URL:www.dojindo.co.jp/
ドージン・イースト (東京) Tel:03-3578-9651 Fax:03-3578-9650