

Quantitation of Protein by Colormetric Assays

Masuda 030731

- * Reducing reagent や detergent など Assay に使えないものがあるので、Table1, 2 を見て、確認する。
- * 通常は、Bradford 法に基づく、Method A) でよい。Reagent は 4°C 保存されている。
- * SDS を 0.1% 以上含む溶液などの場合、Lowry 法に基づく Method B) を用いる。Reagents は室温保存されている。
- * Protein Standard として、BSA と Bovine Gamma Globulin (BGG) が使えるが、ここでは BGG を使う (1 mg/ml の frozen stock がある)。

96穴のマイクロタイタープレートを使ったアッセイ法を以下に示す。
(「Protein Assay.suppl」フォルダに参考 PDF ファイルあり)

A) Bio-Rad Protein Assay

- * アッセイに使える試薬の例: 0.1% DOC, 0.1% SDS, 0.1% Triton X-100, 6M urea, 1M DTT, 1 M beta-Me, 99% glycerol, 1 mM ATP, 1M MgCl₂, 1 M KCl, 5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 50 mM EGTA.
- * マイクロタイタープレートアッセイにおいて、発色がタンパク濃度に対して比例する範囲は、0.05 - 0.5 mg/ml (10 µl sample/200 µl dye/well の場合)、すなわち 0.5 - 5 µg protein/200 µl dye/well.

- 1) protein standard として 1 mg/ml BGG の 50 µl frozen stock を溶かす。サンプルに使われている buffer を用いて stock 液を希釈して 0.05-0.5 mg/ml の BGG 溶液を準備するのが、最も確かな standard の準備法。(簡便法としては、希釈液を作らず、添加する standard の量を変えることで、希釈に換える)。
- 2) dye reagent stock を 5 倍に希釈する。(dye reagent stock 1 ml に H₂O 4 ml 加えて、混ぜる)。
- 3) 10 □ の standard と sample をマイクロタイタープレートのウェルに入れる。(いい加減な方法を使う場合、1 mg/ml BGG を 0.5, 1, 2, 3, 4 µl と sample を 1-4 µl、ウェルの中央に入れる)。
- 4) 200 µl の希釈した dye reagent をウェルに加える。(簡便法を使う場合、ウェルの中央に勢いよく加えて、よく混ぜるようにする)。
- 5) 室温で5分間、incubate する。
- 6) マイクロプレートリーダーを使って 595 nm で測定する。(簡便法を使う場合、濃度ではなく、タンパク量/well 対 OD₅₉₅ でプロットする)。

B) DC Protein Assay (Bio-Rad)

- * アッセイに使えるdetergentの例(DCの意味は、detergents compatible): 10% SDS, 1% CHAPS, 2% NP-40, 1% Triton X-100, 1% CHAPSO, 1% Thesit, 1% Tween 20, 1% Octyl glucoside, 1% Brij-35, 0.2% C12E8(octaethyleneglycol dodecyl ether).
- * 2-mercaptoethanol は DC Protein Assay には使えない。
- * マイクロプレートアッセイにおいて、発色がタンパク濃度に対して比例する範囲は、0.2 - 1.5 mg/ml protein (1-7.5 µg protein/≤5µl sample for microplate assay).

- 1) Dissolve a frozen aliquot of 1 mg/ml BGG for a protein standard (Prepare 5 dilutions of a protein standard containing 0.2 mg/ml to 1.5 mg/ml in the same buffer as the sample for the best results).
- 2) Prepare reagent A' by mixing 300 µl of reagent A and 6 µl of reagent S (or 25 µl x sample and standard No.).
- 3) Pipet ≤5 µl of standards and samples into microtiter plate wells.
- 4) Add 22.5 µl of reagent A' into each well.
- 5) Add 180 µl reagent B into each well, and gently agitate the plate to mix the reagents.
- 6) After 15 min, measure absorbance at 655 nm with a Microplate Reader.

Table 1. Reagents Compatible with the Bio-Rad Protein Assay When Using the Standard Procedure.*

Acetate, 0.6 M	Acetone	Adenosine, 1 mM	AminoAcids
Ammonium sulfate, 1.0 M	Ampholytes, 0.5%	Acid pH	ATP, 1 mM
Barbital	BES, 2.5 M	Boric acid	Cacodylate-Tris, 0.1 M
CDTA, 0.05 M	Citrate, 0.05 M	Deoxycholate, 0.1%	Dithiothreitol, 1 M
DNA, 1 mg/ml	EDTA, 0.1 M	EGTA, 0.05 M	Ethanol

Eagle's MEM	Earle's salt solution	Formic acid, 1.0 M	Fructose
Glucose	Glutathione	Glycerol, 99%	Glycine, 0.1 M
Guanidine-HCl	Hank's salt solution	HEPES buffer, 0.1 M	KCl, 1.0 M
Malic acid, 0.2 M	MgCl ₂ , 1.0 M	Mercaptoethanol, 1.0 M	
MES, 0.7 M	Methanol	MOPS, 0.2 M	NaCl, 5 M
NAD, 1 mM	NaSCN, 3 M	Peptones	Phenol, 5%
Phosphate, 1.0 M	PIPES, 0.5 M	Polyadenylic acid, 1 mM	
Polypeptides (MW<3000)	Pyrophosphate, 0.2 M	rRNA, 0.25 mg/ml	tRNA, 0.4 mg/ml
total RNA, 0.30 mg/ml	SDS, 0.1%	Sodium phosphate	
Streptomycin sulfate, 20%	Triton X-100, 0.1%	Tricine	Tyrosine, 1 mM
Thymidine, 1 mM	Tris, 2.0 M	Urea, 6 M	Vitamins

* Interference may be caused by chemical-protein and/or chemical-dye interactions. Table 1 lists those chemical reagents not directly affecting the development of dye color. Since every protein-chemical reagent combination has not been assayed, it is possible that some of the listed reagents produce interference in combination with certain proteins. However, with respect to proteins such as bovine albumin and globulin, the above listed reagents show little or no interference.

Table 2. Reagents compatible with the Bio-Rad DC Protein Assay.

In some cases, the presence of one or more of these substances will effect a change in the response of the protein to the assay reagents; therefore, the standard should always be prepared in the same buffer as the sample.

10% SDS	1% CHAPS	2% NP-40	1% Triton X-100
1% CHAPSO	1% Thesit	1% Tween 20	1% Octyl glucoside
1% Brij-35	0.2% C12E8 *	0.1 M Tris, pH 8	0.5 M NaOH
0.5 M HCl	0.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	0.025 M EDTA	0.05 M CaCl ₂
0.4 M Guanidine HCl	4 M Urea	0.05% Sodium azide	1 mM DTT (dithiothreitol)

Note: The DC Protein Assay is incompatible with 2-mercaptoethanol (BME).

*octaethyleneglycol dodecyl ether