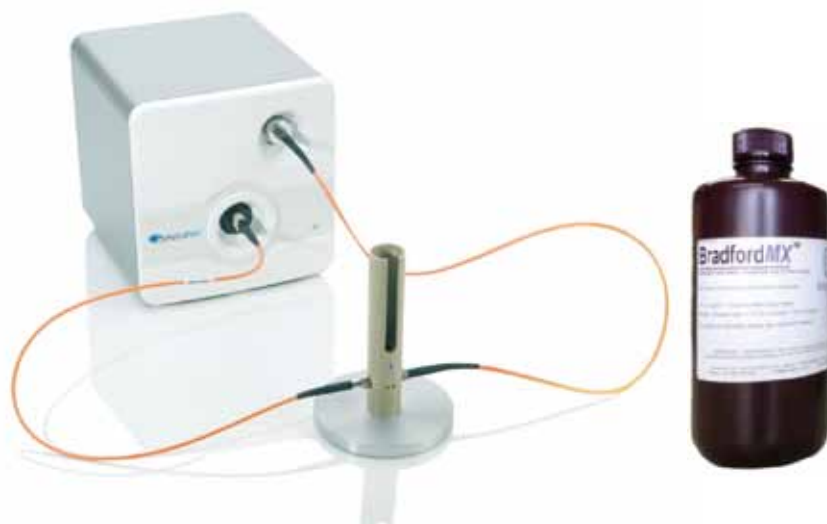


Versa Wave -Bradford MX™によるタンパク質定量-

データご提供：東京工業大学大学院生命理工学研究科分子生命科学専攻 准教授 林 宣宏先生



Bradford MX™

～特徴～

- ・直線性
- ・低バックグラウンド
- ・迅速な反応
- ・界面活性剤存在下での使用可
- ・還元剤存在下での使用可

Versa Waveはピペットチップの先端にサンプルをとらえておいてチップ先端に光を透過させることによりタンパク質、DNAなどを測定できる画期的なデバイスです。勿論サンプルは測定後全量回収可能であり、サンプルのロスもありません。本検討ではBradford MX™によるタンパク質定量とVersa Waveを組み合わせてタンパク質アッセイの性能評価を行いました。

-ポイント-

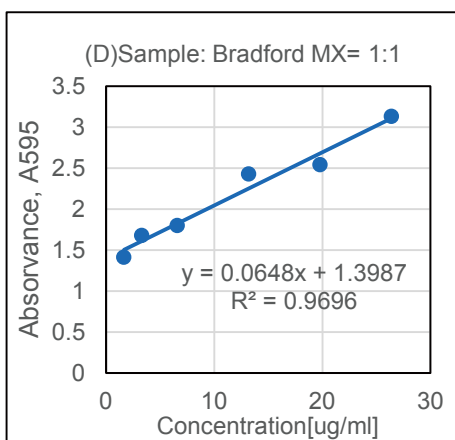
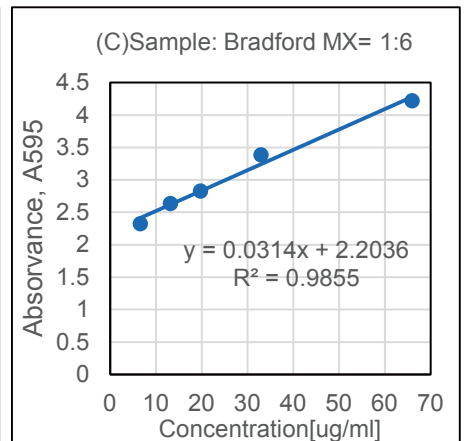
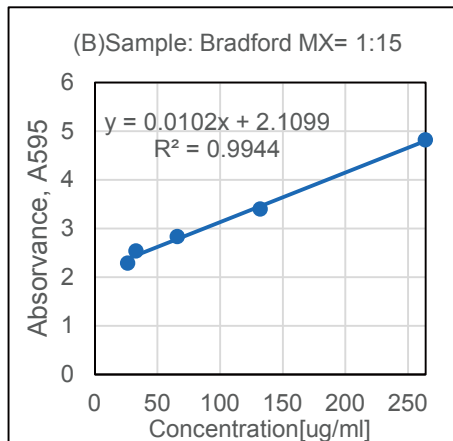
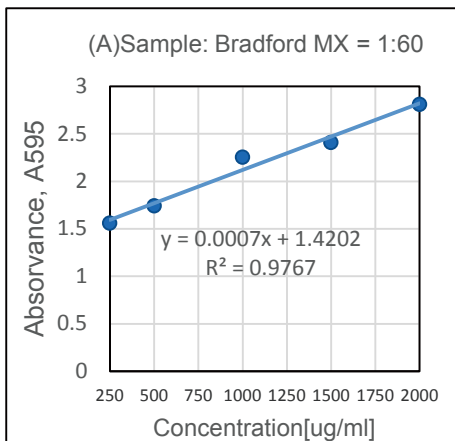
感度と、微量サンプル(タンパク質量、体積)によるタンパク質定量評価の有効性に注目しました。

～実験の方法～

評価サンプルとしてBSAを使用し段階希釈溶液による検量線の作成を試みました。検量線作成に使用したBSA濃度(ug/ml)は1.65、3.3、6.6、13.2、19.8、26.4、33、66、132、264(1.65 – 264 ug/ml)と250、500、1000、1500、2000(250 – 2000 ug/ml)です。タンパク質溶液とBradford MX™との混合割合をそれぞれ1:60、1:15、1:6、1:1によって高濃度ならびに低濃度での有効性を確認しました。発色反応はBradford MX™と混合して室温にて反応を開始し、15分後にVersa Waveによる測定を行いました。Versa Waveの測定条件は次の通りです。

Mode: Indirect protein、Measurementλ: 595 nm、Normalizationλ: 850 nm

タンパク質濃度 (ug/ml)	反応体積 (ul)	タンパク質消費量(ug)
6.6	2.5	0.0165
13.2	2.5	0.033
19.8	2.5	0.0495
26.4	2.5	0.066
33	2.5	0.0825
66	2.5	0.165
132	2.5	0.33
264	2.5	0.66
250	2.5	0.625
500	2.5	1.25
1000	2.5	2.5
1500	2.5	3.75
2000	2.5	5



BSA standard curve

- (A) BSA濃度範囲: 250 – 2000 ug/ml
- (B) BSA濃度範囲: 26.4 – 264 ug/ml
- (C) BSA濃度範囲: 6.6 – 66 ug/ml
- (D) BSA濃度範囲: 1.65 – 26.4 ug/ml

～結果～

(A)では200-2000 ug/mlの濃度では1:60の比率が有効でした。また1:15、1:6、1:1ではいずれにおいても濃度相関性を示す結果が得られました。1:15 の比率の場合は、26.4-264 ug/mlの濃度範囲で直線性を示しました(B)。1:6の比率では、6.6-66 ug/mlの範囲において(C)、1:1では1.65-26.4 ug/mlの範囲(D)において濃度相関性を示す結果となりました。

★1-25 ug/mlのタンパク質濃度サンプルの場合

	サンプル必要量
Versa Wave & Bradford MX™	1.25 ul
標準Bradford試薬	500 ul

★タンパク質定量に必要な量

	タンパク質必要量
Versa Wave & Bradford MX™	0.00125 ug*
他社発色試薬	10 ug

*1.0 ug/mlのタンパク質溶液を1.25ul、BradfordMXIに1:1で反応した場合

-まとめ-

Bradford法による微量タンパク質アッセイでは通常サンプル量として最小でも500 ulのタンパク質溶液を必要とします。Versa Waveでは2.5 ulあれば測定可能であり、Bradford MXを用いて1:1で発色反応を行ったとしてもタンパク質溶液が理論上1.25 ulあれば評価が可能です。今回の実験では1 - 2000 ug/mlでのワイドレンジに微量でのアッセイに対応できることを確認しました。微量・低濃度でも高感度でのアッセイが可能のため、臨床サンプルへの適用も可能です。