

# EZ-Bradford Assay Dye Reagent

Cat. No. DG-BRA500

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

## ▪ Product Description

Bradford 단백질 정량법은 Coomassie Brilliant Blue G-250 (이하 Coomassie)를 사용하여 단백질의 농도를 측정하는 방법입니다. Coomassie는 산성 환경에서 갈색이며 단백질과 결합하게 되면 푸른색으로 변합니다. 색깔의 변화로 단백질의 농도를 정량화할 수 있습니다.

EZ-Bradford Assay Dye Reagent는 Coomassie를 이용하여 단백질의 농도를 정확하게 측정할 수 있는 제품입니다. 간편한 사용과 짧은 반응 시간으로 실험 효율이 우수한 제품입니다.

## ▪ Contents

Component	Volume	Storage
Bradford Assay Dye Reagent	500 mL	4 °C
Bradford Standard Solution (1.5 mg/mL)	1 mL X 10 ea	

\* 본 제품은 연구 목적으로만 사용되어야 하며, 인체용 또는 진단을 목적으로 사용되어서는 안됩니다.

## ▪ Storage and Stability

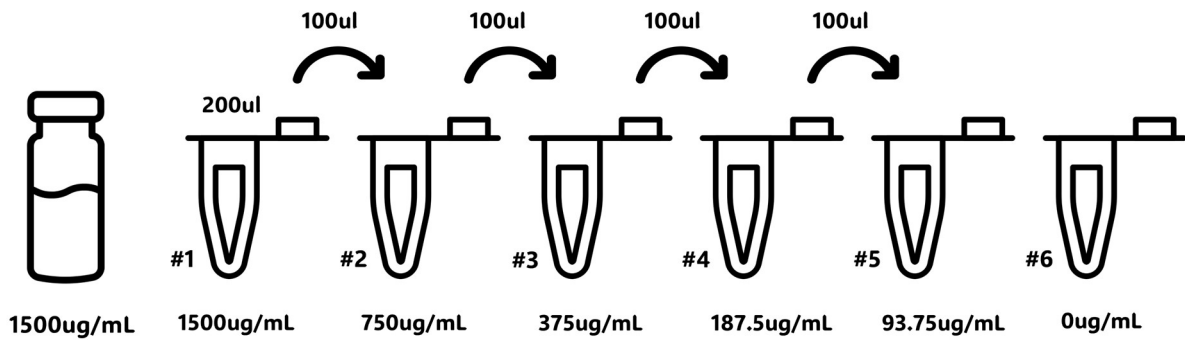
2 ~ 8 °C에서 냉장 보관하며, 제조일로부터 1년간 안정합니다.

## ▪ General Protocol

- 실험 전 모든 시약을 실온에 두어 충분히 warm up 후 사용합니다.
- Bradford Reagent는 D.W로 5배 희석하여 사용합니다.
- 측정하려는 시료의 **Working range**를 선택하여 실험을 진행하십시오.

### 1-1. Spectrophotometer를 이용한 측정 (Working range = 100 ~ 1,500 µg/mL)

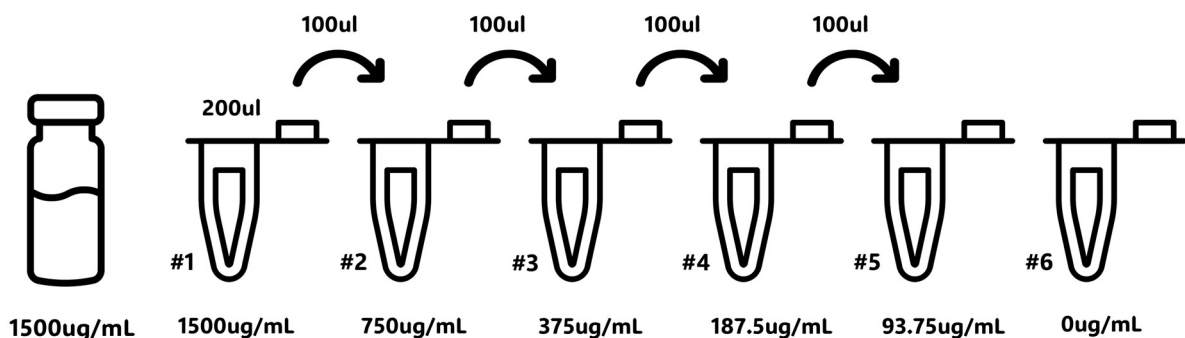
- 1) 다음 같이 standard를 준비하십시오.
  - (1) #1부터 #6까지 6개의 vial(e-tube)을 준비합니다.
  - (2) #1 vial에 Bradford Standard solution(1.5 mg/mL) 200 µL를 넣고, 나머지 #2 ~ #6 vial에는 각각 100 µL의 D.W를 넣습니다.
  - (3) #1 vial(1.5 mg/mL)에서 100 µL 취해 #2 vial에 넣고 #5 vial까지 serial dilution을 진행합니다. #6 vial은 Blank 입니다.



- 2) 준비한 Standard와 측정 시료를 30  $\mu$ l씩 큐벳(Cuvette)에 옮깁니다.
- 3) Bradford Assay Dye Reagent를 D.W로 5배 희석하여 준비합니다. 분석할 샘플 수에 따라 충분한 양을 만들어 사용하십시오.  
 Ex) 측정할 샘플이 10개일 경우
  - 필요량 계산:  $\{1.5 \text{ mL} \times 6 \text{ ea(standard)}\} + \{1.5 \text{ mL} \times 10 \text{ ea(sample)}\} = 24 \text{ mL}$
  - 여유량 포함:  $24 \text{ mL} + 1 \text{ mL(여유량)} = 25 \text{ mL}$  준비
  - 희석 방법: Bradford Assay Dye Reagent 5 mL + D.W 20 mL (총 25 mL)
- 4) 희석한 Bradford Assay Dye Reagent를 모든 큐벳(Cuvette)에 1.5 mL씩 넣고 잘 섞어 줍니다.
- 5) 상온에서 10 분간 반응시킵니다.
- 6) Spectrophotometer를 사용해 595 nm와 450 nm에서 각각 흡광도를 측정합니다.

## 1-2. Microplate reader를 이용한 측정 (Working range = 100 ~ 1,500 $\mu$ g/mL)

- 1) 다음과 같이 standard를 준비하십시오.
  - (1) #1부터 #6까지 vial(e-tube)을 준비합니다.
  - (2) #1 vial에 Bradford Standard solution(1.5 mg/mL) 200  $\mu$ l를 넣고, 나머지 #2 ~ #6 vial에는 각각 100  $\mu$ l의 D.W를 넣습니다.
  - (3) #1 vial(1.5 mg/mL)에서 100  $\mu$ l 취해 #2 vial에 넣고 #5 vial까지 serial dilution을 진행합니다. #6 vial은 Blank 입니다.



- 2) 준비한 Standard와 측정 시료를 5  $\mu$ l씩 well에 옮깁니다.
  - 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것을 권장합니다.

- Bradford Assay Dye Reagent를 D.W로 5배 희석하여 준비합니다. 분석할 샘플 수에 따라 충분한 양을 만들어 사용하십시오.

Ex) 샘플이 10개일 경우

- 필요량 계산:  $\{250 \mu\ell \times 6\text{개(standard)} \times 2\text{(two replicates)}\} + \{250 \mu\ell \times 10\text{개(sample)} \times 2\text{(two replicates)}\} = 8 \text{ mL}$
- 여유량 계산:  $8 \text{ mL} + 2 \text{ mL(여유량)} = 10 \text{ mL}$  준비
- 희석 방법: Bradford Assay Dye Reagent  $2 \text{ mL} + \text{D.W } 8 \text{ mL}$  (총  $10 \text{ mL}$ )

- 희석한 Bradford Assay Dye Reagent를 모든 well에  $250 \mu\ell$ 씩 넣고 잘 섞어줍니다.
- 상온에서 10분간 반응시킵니다.
- Microplate reader를 사용해  $595\text{nm}$ 와  $450\text{nm}$ 에서 각각 흡광도를 측정합니다.

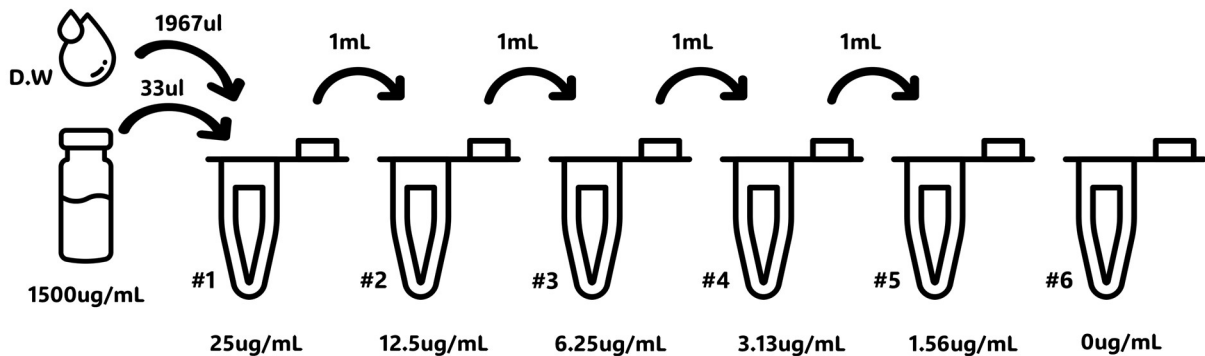
\*\* 측정한 O.D값이 낮다면 Standard와 시료를  $7\sim 10\mu\ell$ 로 증가시켜 실험을 진행하십시오.

### 1-3. 낮은 농도의 단백질 시료 측정 시 Microplate reader를 이용한 측정

(Working range =  $1 \sim 25 \mu\text{g/mL}$ )

- 다음과 같이 standard를 준비하십시오.

- (1) #1부터 #6까지 vial(e-tube)을 준비합니다.
  - (2) #1 vial에 D.W  $1967 \mu\ell$ , Bradford Standard solution( $1.5 \text{ mg/mL}$ )  $33 \mu\ell$ 를 넣고, 나머지 #2 ~ #6 vial에는 각각  $1 \text{ mL}$ 의 D.W를 넣습니다.
  - (3) #1 vial( $25 \mu\text{g/mL}$ )에서  $1 \text{ mL}$  취해 #2 vial에 넣고 #5 vial까지 serial dilution을 진행합니다. #6 vial은 Blank 입니다.
- Serial dilution 후 vial(e-tube)에 남아있는 volume은  $1 \text{ mL}$  입니다.



- 측정 시료를  $1 \text{ mL}$ 씩 vial(e-tube)에 옮깁니다.
- Bradford Assay Dye Reagent를 D.W로 5배 희석하여 준비합니다. 분석할 샘플 수에 따라 충분한 양을 만들어 사용하십시오.

Ex) 샘플이 10개일 경우

- 필요량 계산:  $\{1 \text{ mL} \times 6 \text{ 개(standard)}\} + \{1 \text{ mL} \times 10\text{개(sample)}\} = 16 \text{ mL}$
- 여유량 계산:  $16 \text{ mL} + 4 \text{ mL(여유량)} = 20 \text{ mL}$  준비
- 희석 방법: Bradford Assay Dye Reagent  $4 \text{ mL} + \text{D.W } 16 \text{ mL}$  (총  $20 \text{ mL}$ )

- 희석한 Bradford Assay Dye Reagent를 모든 tube에  $1 \text{ mL}$ 씩 넣고 잘 섞어줍니다.

- 5) 상온에서 10 분간 반응시킵니다.
- 6) 각 tube에서 200  $\mu\text{l}$ 씩 취하여, 각 sample을 two replicates 이상으로 Microplate에 옮깁니다.
- 7) Microplate reader를 사용해 595 nm와 450 nm에서 각각 흡광도를 측정합니다.

## 2. Calculation

- 1) 595 nm의 O.D  $\div$  450 nm의 O.D 로 값을 보정합니다.

$$\Delta O.D_{595nm} \div \Delta O.D_{450nm}$$

- 2) 모든 standard와 시료의 측정값에서 blank 값을 뺍니다.
- 3) Standard curve를 이용하여 시료의 단백질 양을 결정합니다.

## ▪ Notice

1. Bradford 단백질 분석에서 간섭을 일으키는 물질이 여러 가지가 있으며, 특히 Coomassie Brilliant Blue G-250 염색에 영향을 줌으로써 정확한 단백질 정량을 방해할 수 있습니다. 주요 간섭 물질과 그에 따른 해결 방안은 다음과 같습니다.

간섭물질	간섭물질의 영향	해결방법
세제 (Detergents)	이온성 세제: SDS 등이 포함된 세제는 Bradford 측정 시 흡광도 값에 오차를 유발.  비이온성 세제: Triton X-100, Tween-20 등은 염색을 방해하여 발색 강도를 감소시킴.	저농도로 실험을 하거나 완전히 제거 후 진행하는 것을 권장.
고농도 염 (Salts)	황산 암모늄, 염화 나트륨 등의 염이 고농도로 존재할 경우, 단백질의 구조나 염색제의 결합에 영향을 미쳐 정확한 측정이 어려워질 수 있음.	투석이나 탈염 방법을 이용하여 최대한 제거하거나, 샘플 희석을 충분히 하여 진행하는 것을 권장.
완충 용액 (Buffers)	Tris, HEPES, PBS와 같은 완충 용액은 특정 농도 이상일 때 Coomassie Brilliant Blue G-250 염료와 용하여 정확도를 낮출 수 있음. 특히 Tris Buffer는 595 nm에서의 흡광도 측정에 영향을 줄 수 있음.	Buffer를 최소한의 농도로 소량 사용하거나 Bicarbonate Buffer로 대체하여 사용하는 것을 권장.
환원제 (Reducing Agents)	DTT(Dithiothreitol), $\beta$ -Mercaptoethanol 등의 환원제는 Bradford 시약에 반응을 일으켜 단백질 정량을 방해함.	환원제의 농도를 낮추어 사용하거나 제거 후 진행하는 것을 권장.
착화제 (Chelating Agents)	EDTA와 같은 착화제는 금속 이온과 결합하여 단백질 - 염료간의 상호작용에 영향을 줄 수 있음.	EDTA가 포함되지 않은 Buffer를 사용하거나 제거 후 진행하는 것을 권장.
방부제 (Preservatives)	$\text{NaN}_3$ 와 같은 방부제는 Bradford 염색 반응을 방해할 수 있음.	방부제가 제거된 용액 사용을 권장.
글리세롤 (Glycerol)	고농도의 글리세롤은 Bradford 시약의 흡광도를 변경시켜 측정 오차를 유발.	글리세롤을 제거하거나 충분히 희석된 샘플로 진행하는 것을 권장.

2. Coomassie Brilliant Blue G-250가 단백질에 결합할 때뿐만 아니라 Coomassie Brilliant 6  
Blue G-250 자체의 흡광도 영향으로 인해, 595 nm에서만 측정한 값으로 standard  
curve를 그리면  $R^2$  값이 낮게 나올 수 있습니다. 595 nm O.D를 495nm O.D로 나눈 보  
정값을 사용해 standard curve를 작성하면 이를 개선할 수 있습니다.
3. 측정 시 시약의 온도가 영향을 줄 수 있으므로, 사용 전에 제품을 실온에서 충분히  
warm up 후 사용하십시오.
4. 사용하는 측정 장비에 595 nm 측정 필터가 없는 경우, 570 ~ 610nm 중 가능한 파장  
에서 흡광도를 측정할 수 있습니다. 다만, 595nm 이외의 파장에서 측정 시 standard  
curve의 기울기가 낮아질 수 있습니다.

## ■ Related Product

7

Product	Catalog No.	size
EZ-Western ( Nano~mid picogram )	DG-W100	100 mL (A: 50 mL + B: 50 mL)
	DG-W250	250 mL (A: 125 mL + B: 125 mL)
	DG-W500	500 mL (A: 125 mL X 2 + B: 125 mL X 2)
EZ-Western Lumi Pico ( Low picogram )	DG-WP100	100 mL (A: 50 mL + B: 50 mL)
	DG-WP250	250 mL (A: 125 mL + B: 125 mL)
	DG-WP500	500 mL (A: 125 mL X 2 + B: 125 mL X 2)
EZ-Western Lumi Pico Alpha ( Low picogram )	DG-WPAL120	120 mL (A: 60 mL + B: 60 mL)
	DG-WPAL250	200 mL (A: 125 mL + B: 125 mL)
EZ-Western Lumi La ( Mid femtogram, Long duration )	DG-WD100	100 mL (A: 50 mL + B: 50 mL)
	DG-WD200	200 mL (A: 100 mL + B: 100 mL)
EZ-Western Lumi Femto ( Low femtogram )	DG-WF100	100 mL (A: 50 mL + B: 50 mL)
	DG-WF200	200 mL (A: 100 mL + B: 100 mL)
EZ-Western Membrane Tray	DG-WMT8	1 set (8 EA, 10 X 6 X 2 cm)
EZ-Western Stripping Buffer	DG-WSB500	500 mL
3-Color Regular Range Protein Marker, 10-245kDa	DG-PMC245	250 $\mu$ l x 2
3-Color Broad Range Protein Marker PLUS, 5-245kDa	DG-PMP245	250 $\mu$ l x 2
EZ-BCA Protein Quantification Kit	DG-BCA500	Reagent A : 500 mL Reagent B : 25 mL Standard Sol. : 1 mL X 10
EZ-Bradford Assay Dye Reagent	DG-BRA500	Reagent : 500 mL Standard Sol. : 1 mL X 10
EZ-Gel staining solution ( without de-staining )	DG-GS1000	1000 mL