

タンパク質を定量したい

使用製品

- Proteostain- Protein Quantification Kit-Rapid [PQ01]
- Proteostain- Protein Quantification Kit-Wide Range [PQ02]

解析装置



I はじめに

試料中のタンパクの定量法としてこれまで様々な方法が開発され、また実用化されている。例えばタンパク質濃度を直接吸光度から求める吸光光度法、Biuret 試薬を用いた Biuret 法、フェノール試薬と Biuret 法を組み合わせた Lowry 法、1 級アミンと反応する蛍光試薬を用いた蛍光法、色素のメタクロマジーを利用した Bradford 法などが知られている。まずそれぞれについてその原理および長所短所について概説する。

1. 吸光光度法

原理：タンパク質は主にチロシンやトリプトファンに起因して 280 nm 付近に吸収極大を示す。その吸収からタンパク質濃度を算出する。タンパク質の種類によりチロシンやトリプトファンの含量が異なるので 280 nm における吸光度 (A_{280}) は変動するが、一般に 1 mg/ml の濃度の時、 A_{280} は 1.0 として概算する。 $A_{280}/A_{260} < 1.5$ の時は核酸の混入が考えられるので他の方法を検討する必要がある。

長所：操作が簡便であり、測定後サンプルの回収が可能である。また、クロマトによる精製時に検出器を連結しておく、連続的にタンパク質の溶出をモニターすることができる。

短所：タンパク質の種類により吸光度が変わる。また 280 nm に吸収を持たないタンパク質(コラーゲン、ゼラチンなど)は測定できない。紫外部に吸収を持つ物質の混入は定量を妨害する。

2. Biuret 法

原理：タンパク質をアルカリ性条件下で Cu^{2+} 溶液と反応させると、赤紫色を呈する。これはアルカリ条件下で Cu^{2+} がポリペプチド鎖中の窒素原子と錯体を形成することで発色する、いわゆる Biuret 反応を利用したものである。硫酸銅と酒石酸カリウムナトリウム塩をアルカリ溶液に溶かした試薬 (Biuret 試薬) を試料に加え 540 nm の吸光度を測定する。

長所：タンパク質の種類による発色率の差が少ない。操作が簡単である。

短所：感度が低く、低濃度試料には向かない。高濃度のトリス、アミノ酸やアンモニウムイオンなどは発色に影響を与える。

3. Lowry 法

原理：リンモリブデン酸とリンタングステン酸を酸性溶液に溶解したフェノール試薬 (Folin 試薬とも言う) は、アルカリ性でタンパク質中のチロシン、トリプトファンおよびシステインと反応して青色を呈する (A_{750})。この反応に Biuret 反応を加えたものが Lowry 法である。ペプチド結合に由来する発色効果が強く表れるため Biuret 法よりはるかに感度が高く、5~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で測定することが可能と言われている。

長所：感度が高く、最も一般に使用されている方法である。
短所：還元反応によって呈色しているため、還元物質により発色が妨害される。操作が煩雑で測定までに時間がかかる。タンパク質によって発色率に差がある。

4. BCA 法

原理： Cu^{2+} はアルカリ性溶液中で、タンパク質の量に応じて Cu^+ に還元される。ピシンコニン酸は還元された Cu^+ と選択的に錯体を形成して赤紫色に呈色するため、この錯体の 560nm 吸光度を測定することによって間接的にタンパク質を定量することができる。測定範囲は 1 ~ 2,000 $\mu\text{g/ml}$ である。

長所：操作が簡便であり、高感度である。また界面活性剤や緩衝剤の影響を受けにくい。汎用性が高い。

短所：還元物質やキレート剤の影響を受けやすい。

5. 蛍光法

原理：フルオレスカミン (Fluorescamine) はそれ自体では蛍光を発しないが、1 級アミンと反応することにより 495 nm に蛍光を発する (励起: 395 nm)。その蛍光強度を測定することによりタンパク量を求めることができる。

長所：試料が少量でよい。また試料にフルオレスカミンの溶液を添加するだけで良いので非常に操作が簡単である。

短所：濃度が濃い場合、蛍光のクエンチングが起こり正確な値が出ない場合がある。また、トリスなどのアミン系試薬により測定が妨害される場合がある。

6. Bradford 法

原理：Bradford 法は、酸性溶液中、トリフェニルメタン系青色色素の Coomassie Brilliant Blue G-250(図 1) がタンパク質と結合することで、最大吸収波長が 465 nm から 595 nm にシフトすること(メタクロマジー)を利用してタンパク質を定量する方法である。吸収波長のシフトは色素とタンパク質との疎水性相互作用およびイオン相互作用に基づいている。

長所：操作が非常に簡単である。

短所：タンパク質の種類により発色率に差がある。また界面活性剤の混入により発色が妨害される。

7. WST 法

原理：還元発色剤である水溶性テトラゾリウム塩を用いた方法である。WST-8 は小社が開発した水溶性テトラゾリウム塩であり、タンパク質によって容易に還元され、WST-8 formazan を生成する。このホルマザンはアルカリ水溶液中で青色に呈色するため、このホルマザンの 650nm 吸光度を測定することによってタンパク質を定量することができる。測定範囲は 50 ~ 5,000 $\mu\text{g/ml}$ である。

長所：操作が簡便であり、測定範囲が広い。界面活性剤の影響を受けにくい。

短所：タンパク質の種類により発色率に差がある。また還元物質の影響を受けやすい。

その他タンパク質によって還元されて生じた Cu^+ を Bicinchoninic acid で定量する BCA 法や、糖タンパク質によるテトラゾリウム塩からホルマザンへの還元反応を利用した定量方法などがある。

次に、具体的な方法として小社タンパク定量キットの使用方法について示す。

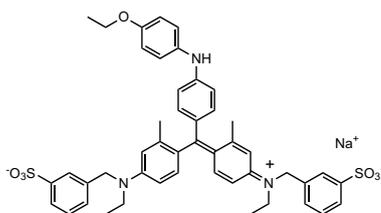


図1 Coomassie Brilliant Blue G-250 の構造

II Protein Quantification Kit-Rapid (Code: PQ01) を使用した方法

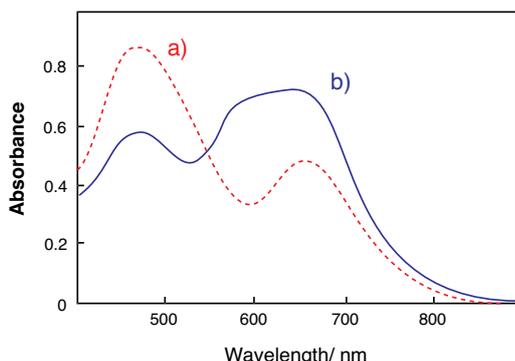


図2 Coomassie Brilliant Blue G-250 の吸収スペクトル
a) タンパク質なし b) BSA (500 µg/ml) 存在下

本キットは Bradford 法を応用した方法であり、高感度かつ迅速にタンパク質を定量することが可能である。

Coomassie Brilliant Blue G-250 はタンパク質に作用し、酸性条件下で青色に呈色する(λ_{max} =595 nm)(図2)。しかも呈色反応は1分以内に終了し、生じた色素は30分以上安定である。従ってこの方法を使うことにより数分でタンパク質の定量を行うことができる。

定量できるタンパク質の濃度範囲は Standard 法で 10 µg/ml ~2,000 µg/ml、Micro 法で 1 µg/ml~50 µg/ml である。

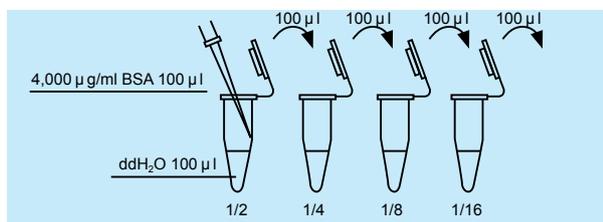
1. キット内容

- CBB solution
- Standard BSA solution (4,000 µg/ml)

2. 操作方法

(1) Standard 法

- Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈して 0~2,000 µg/ml の BSA 希釈溶液を調製する(図3)。



4,000 µg/ml の Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈し、2,000、1,000、500、250、125、63、32、0 µg/ml の BSA 希釈溶液を調製する。

図3 Standard BSA の調製法

- 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。n=3 で測定することが望ましい。
- 3) CBB solution 300 µl を各ウェルに加える。O.D. 測定時に影響するので加える際には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 µg/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(図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。



a) Standard BSA solution より b) CBB solution をリザーバーに BSA 希釈溶液を調製する。 移す(8連ピペッター使用時)。



c) CBB solution 300 µl を各ウェルに加える。 d) プレートリーダーを使用して吸光度を測定する。

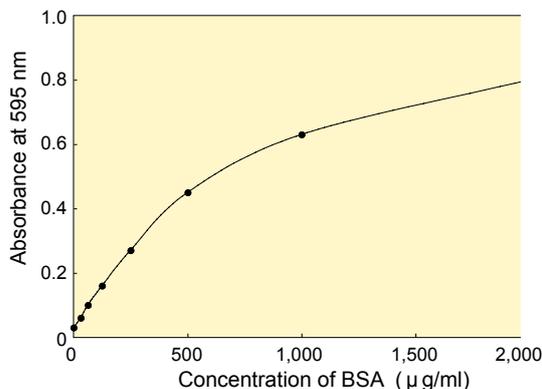
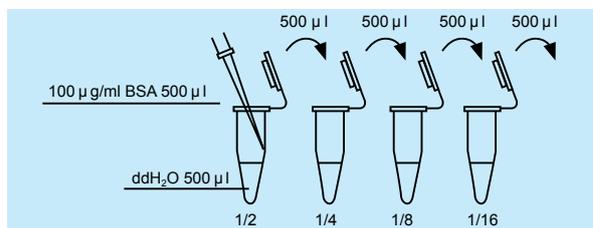


図4 Standard BSA solution で作成した検量線 (standard 法)

(2) Micro 法

[この方法は精製されたタンパク質にのみ適用される。]

- 1) Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈して 0~50 µg/ml の BSA 希釈溶液を調製する(図5)。100 µg/ml BSA は Standard BSA solution (4,000 µg/ml) 30 µl を純水で 300 µl に希釈し (400 µg/ml)、更にその溶液 250 µl を純水で 1 ml に希釈して調製する。



100 µg/ml の Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈し、50、25、12.5、6.3、3.2、1.6、0.8、0 µg/ml の BSA 希釈溶液を調製する。

図5 Standard BSA の調製法

- 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 150 µl を各ウェルに加える。n=3 で測定することが望ましい。
- 3) CBB solution 150 µl を各ウェルに加え混合する。
- 4) 室温で 30 秒~1 分間プレートを揺り動かし、良く混合する (プレートリーダーに振とう機能がついていればそれを利用して良い)。

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極

その他
機能性
有機材料

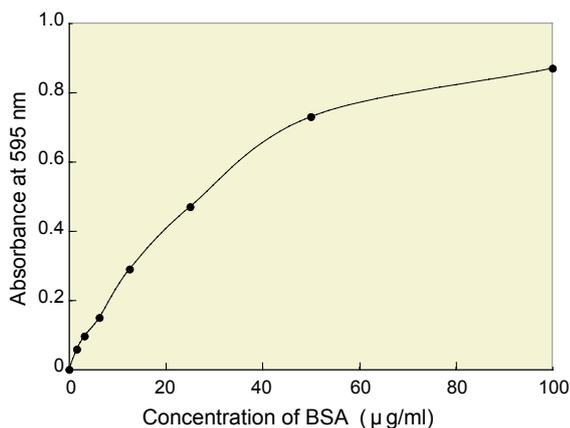


図6 Standard BSA solution で作成した検量線 (micro 法)

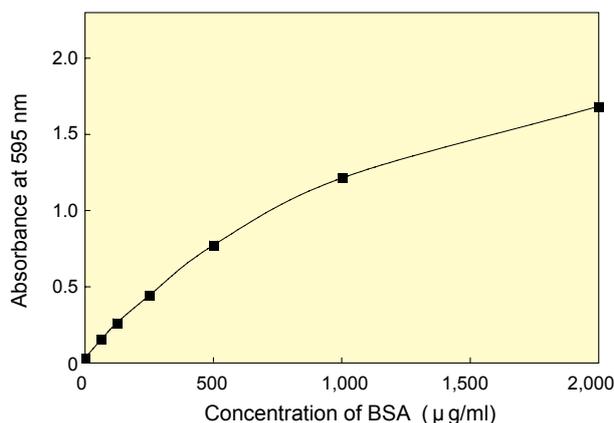


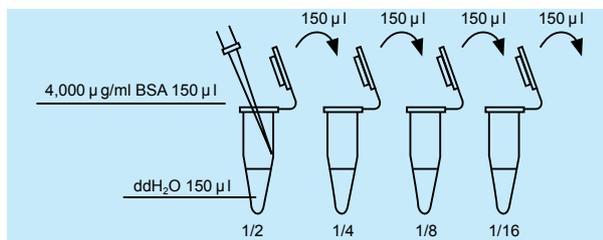
図8 Standard BSA solution で作成した検量線 (セル法)

- 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 µg/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。(図 6)
 - 8) 検量線を基にサンプルのタンパク質濃度を算出する。
- * Micro 法では界面活性剤の影響を大きく受けるので、表 1 にある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。

(3) セル法

[分光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する]

- 1) Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈して 0~2,000 µg/ml の BSA 希釈溶液を調製する。(図 7)



4,000 µg/ml の Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈し、2,000、1,000、500、250、125、63、32、0 µg/ml の BSA 希釈溶液を調製する。

図7 Standard BSA の調製法

- 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 × 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 µg/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 (図 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。

3. タンパク種による変動

このキットは検量線用のタンパク質として BSA を用いているが、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ない。タンパク種による感度の変動を下に示す。

Protein	Protein/BSA ^{a)}
BSA	1
Chymotrypsinogen A	0.67
Transferrin	1.02
Human IgG	0.96

a) 各検量線の傾きの比を示す

4. 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る。表 1 に標準法における測定に影響を及ぼさない阻害物質の最大濃度を示す。

表 1 測定に影響を及ぼさない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% 以内のサンプル中の濃度を示す。

III Protein Quantification Kit-Wide Range (Code: PQ02) を使用した方法

本キットは塩基性条件でのテトラゾリウム塩の還元反応を利用したものである。テトラゾリウム塩は、タンパク質により容易に還元されホルマザンを生成する。WST-8 formazan は中性域では黄色であるが、高 pH 域では青色を呈し、pH12.5 以上では 650 nm に極大吸収を持つ。本キットの測定レンジは 50 μg/ml ~ 5,000 μg/ml (BSA) である (図 9、図 10)。

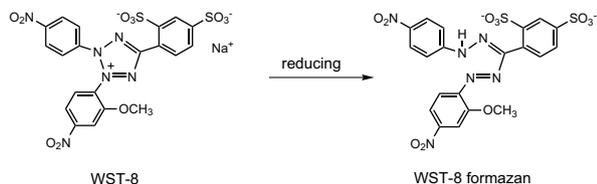


図 9 WST-8 とその formazan の構造式

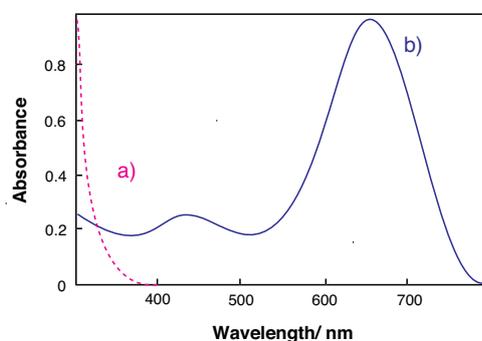


図 10 WST-8 の吸収スペクトル
a) タンパク質なし
b) タンパク質 (BSA : 2,000 μg/ml) 存在下

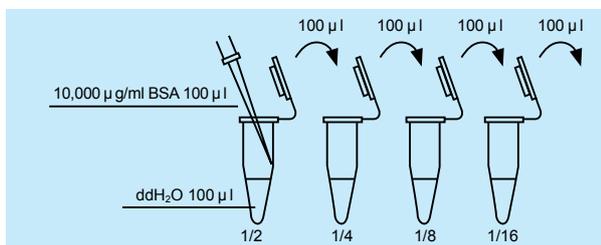
1. キット内容

- WST-8 solution
- Buffer solution
- Standard BSA solution (10,000 μg/ml)

2. 操作方法

(1) マイクロプレート法

1) Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈して 0 ~ 5,000 μg/ml の BSA 希釈溶液を調製する (図 11)。



10,000 μg/ml の Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈し、5,000、2,500、1,250、625、313、156、78、0 μg/ml の BSA 希釈溶液を調製する。

図 11 Standard BSA の調製法

- 2) Buffer solution 180 μl を各ウェルに加える。
- 3) 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 20 μl を各ウェルに加え、混合する。n=3 で測定することが望ましい。
- 4) WST-8 solution 20 μl を各ウェルに加え、良く混合する。
- 5) プレートにアルミホイル等でカバーをして 37°C で 30 分

インキュベーションする。Buffer solution との混合後の WST-8 は光安定性が低下し、バックグラウンドの吸光度が上昇する恐れがあるので、インキュベーションの間は遮光しておくこと。

- 6) プレートリーダーを使用して 650 nm の吸光度を測定する。
- 7) 各 well の吸光度からブランク (BSA : 0 μg/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 (図 12)。
- 9) 検量線を基にサンプルのタンパク質濃度を算出する。



a) Buffer solution 180 μl を各ウェルに加える。
b) BSA 希釈溶液またはサンプルを加え、WST-8 solution を加える。



c) プレートにアルミホイルでカバーをしてインキュベーションする。
d) プレートリーダーを使用して吸光度を測定する。

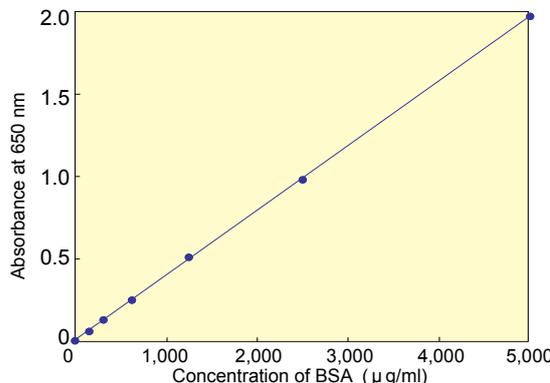


図 12 Standard BSA solution で作成した検量線 (マイクロプレート法)

(2) セル法

[分光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する。]

- 1) マイクロプレート法と同様に Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈して 0 ~ 5,000 μg/ml の BSA 希釈溶液を調製する。
- 2) Buffer solution 2.25 ml を試験管に入れる。
- 3) 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 50 μl を加え、混合する。
- 4) 更に WST-8 solution 250 μl を加え、良く混合する。
- 5) 試験管をアルミホイル等で遮光して 37°C で 1 時間インキュベーションする。Buffer solution と混合後の WST-8 は光安定性が低下し、バックグラウンドの吸光度が上昇する恐れがあるので、インキュベーションの間は遮光しておくこと。
- 6) 反応溶液を分光光度計用のセル (1 cm × 1 cm) に移し替え、650 nm の吸光度を測定する。
- 7) 測定された吸光度からブランク (BSA : 0 μg/ml) の吸光度を差し引く。

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

- 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(図 13)。
9) 検量線を基にサンプルのタンパク質濃度を算出する。

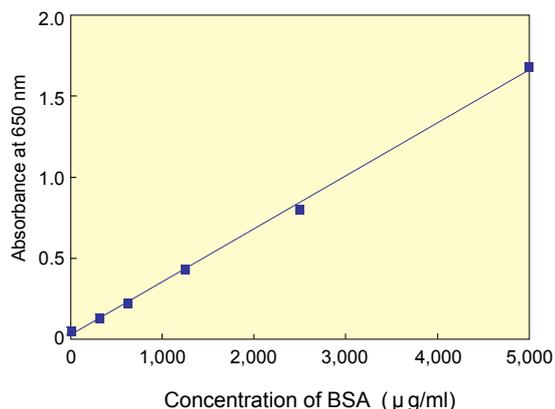


図 13 Standard BSA solution で作成した検量線 (セル法)

3. タンパク種による変動

このキットは検量線用のタンパク質として BSA を用いているが、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ない。タンパク種による感度の変動を下に示す。

Protein	Protein/BSA ^{a)}
BSA	1
Chymotrypsinogen A	0.75
Transferrin	0.97
Human IgG	0.37

a) 各検量線の傾きの比を示す