

タンパク質定量法

主なタンパク質定量法には、紫外吸収法、Bradford法（クーマシーブルー法）、Lowry法（フェノール試薬法）、ビシンコニン酸法（BCA法）などがある。それぞれに、長所、短所があり、また同じサンプルでも定量法によって、結果に大きな差が見られることがある。したがって、それぞれの特徴を知り、自分の実験にあった方法を選択し、一連の実験では同じ測定法を使用することが望ましい。

（様々なタンパク質定量法とその原理）

1) 紫外吸収法

〔原理〕 波長280 nm におけるタンパク質中の芳香族アミノ酸（チロシン、トリプトファン）の吸光度を測定

する。（芳香族アミノ酸のベンゼン環に由来する紫外吸収）

（長所） 操作が簡便である。サンプルの回収が可能である。（他の方法にない利点）

（短所） タンパク質により吸光係数（チロシン、トリプトファンの含量）の差が大きい。

核酸など、他に吸収を持つ物質があると不正確になる。感度が低い。

（定量範囲） 100-1000 $\mu\text{g/ml}$

<測定法の概略>

紫外部が測定可能な分光光度計を用いて、タンパク質サンプル溶液の波長280 nmでの吸光度を測定する。タンパク質濃度は $A_{280}=1.0=1 \text{ mg/ml}$ として計算する。 $A_{280}/A_{260} < 1.5$ の時は核酸の混入が考えられるので、他の方法を検討した方がよい。

2) Bradford法

〔原理〕 タンパク質染色に用いられる色素クーマシーブルーが、タンパク質と結合する際の吸光度の変化を測定する。

（長所） 操作が簡単で、妨害物質が少ない。

（短所） タンパク質により発色率に差がある。界面活性剤の混入により測定値が不正確になる。

（定量範囲） 50-1000 $\mu\text{g/ml}$ (5倍希釈液使用時)、5-25 $\mu\text{g/ml}$ (原液使用時)

<測定法の概略>

タンパク質サンプル溶液とクーマシーブルー試薬をよく混和し、タンパク質を含まないバックグラウンドとの波長595 nm<における吸光度の差を分光光度計で測定する。タンパク質濃度が明らかな標準サンプル（スタン

ダード) の吸光度から描いた標準直線から、タンパク質濃度を求める。

3) Lowry法

[原理] フェノール試薬とタンパク質 (チロシン、トリプトファン、システインが関与) とが結合する際の吸光度の変化を測定する。

(長所) 感度が高い。

(短所) 妨害物質が多い。蛋白質によって発色率に差がある。時間がかかる。

(定量範囲) 50-100 $\mu\text{g/ml}$

<測定法の概略>

タンパク質サンプル溶液にアルカリ性銅溶液を加え、その後フェノール試薬をよく混和して、バックグラウンドとの波長750 nmにおける吸光度の差を分光光度計で測定する。タンパク質濃度が明らかなスタンダードの吸光度から描いた標準直線から、タンパク質濃度を求める。

4) BCA法

[原理] ビシンコニン酸と銅の錯体がタンパク質と結合する際の吸光度の変化を測定する。

(長所) 操作が簡単で、感度が高い。界面活性剤の影響をあまり受けない。

(短所) チオール、リン脂質、硫酸アンモニウムなどにより阻害を受ける。

(定量範囲) 20-1000 $\mu\text{g/ml}$

<測定法の概略>

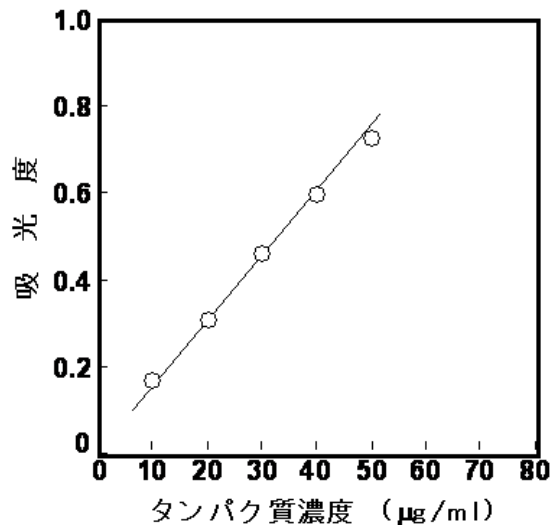
タンパク質サンプル溶液とビシンコニン酸試薬をよく混和して、バックグラウンドとの波長562 nmにおける吸光度の差を分光光度計で測定する。タンパク質濃度が明らかなスタンダードの吸光度から描いた標準直線から、タンパク質濃度を求める。

標準直線 (検量線) の作成

(2) から (4) の測定法では、タンパク質濃度を測定したいサンプルとともに、タンパク質濃度が明らかな標準サンプル (スタンダード) (定量可能範囲内で異なる濃度のものを4、5本作成するのが一般的) を実験法にしたがって処理し、それぞれのスタンダードの濃度と吸光度の関係を示すグラフを作成する。タンパク質濃度とそれぞれの試薬による発色には比例関係があるので、Lambert-Beerの法則が成立する濃度範囲では、吸光度とサンプルのタンパク質濃度との間に比例関係が成立する。したがって、作成したグラフからそれぞれのサンプルのタンパク質濃度を求めることができる。ただし、サンプルの吸光度が著しく大きい (通常1以上) 場合はLambert-Beerの法則が成立しないため、サンプルを希釈して測定し直す必要がある。

また、反応条件（溶液中の内容物、温度、反応時間など）が測定毎に少しずつ異なる可能性があるので、測定毎にスタンダードを用いて標準直線を作成し、サンプルのタンパク質濃度を決定することが望ましい。

実際のグラフの作成には、グラフ用紙が便利。また、コンピューターでグラフを作成し、比例関係を数式化してサンプルの濃度を計算で求めることも可能である。



タンパク質定量の実際

培養細胞からのタンパク質の抽出と定量

実際の研究では、臓器断片や培養細胞などからタンパク質を抽出し、解析する。臓器片からはホモジナイザーや超音波破碎機により組織を破壊し、目的とする細胞小器官を得ることも可能である。しかし、膜画分に含まれるタンパク質は界面活性剤などを用いない限り可溶化（溶媒に溶かす）が困難な場合が多い。ここでは、培養細胞のタンパク質を、界面活性剤を含むタンパク質抽出液で抽出し、タンパク質濃度を測定する。

(準備)

- * 分光光度計
- * キュベット
- * ピペットマン
- * タンパク質定量試薬
[Bio-Rad社, Protein Assay Reagent]または[Pierce社, BCA Protein Assay Reagent]
- * チューブ、ビーカー
- * スタンダード (BSA溶液 100 µg/ml、200 µg/ml、400 µg/ml、800 µg/ml)
- * 培養細胞
- * 生理食塩水あるいはPBS (Phosphate Buffered Saline)
- * マイクロチューブ (1.5 ml)
- * ポリスマンあるいはセル・スクレーパー
- * マイクロチューブ用冷却遠心分離機
- * タンパク質抽出用の溶液(これは、抽出後の実験操作により異なる)

(測定)

1. 培養皿（ディッシュ）の培養液（メディアウム）を吸い取り、培養細胞を生理食塩水あるいは、PBSでよく（2回以上）洗い、最後は水分がディッシュにできるだけ残らないように吸い取る。
2. ピペットマンで200 μ lのタンパク質抽出液をディッシュに加え、ディッシュ全面に広がるようにする。（35mmディッシュの場合）
3. 細胞をポリースマンでかき取り、ピペットマンで細胞抽出液をマイクロチューブに移す。マイクロチューブは氷づけにしておく。
3. マイクロチューブを10,000 rpmで10分間遠心分離し、沈殿した核などの不溶物を除去し、上清のタンパク質溶液を新しいマイクロチューブに回収し、これをサンプルとする。
5. ここでは、タンパク質濃度の予想が見つからないので、サンプル10 μ l、20 μ l、50 μ lをとり、Bradford法またはBCA法で、タンパク質濃度を測定する。試験管に入る溶液量が一定になるように、必要量のタンパク質抽出液を加える。バックグラウンド、スタンダードのサンプルを用意するのを忘れないようにする。

（注意）

反応条件（溶液中の内容物、温度、反応時間など）が測定毎に少しずつ異なる可能性があるので、測定毎にスタンダードを用いて標準直線を作成することが望ましい。