

総タンパク質の定量法

鈴木 祥夫

この度、2018年の入門講座として「タンパク質と核酸・遺伝子をはかる」を企画いたしました。

タンパク質と核酸・遺伝子は、言うまでもなく生体の重要な構成成分であり、分析化学における主要なターゲットの一つです。その分析結果は薬学、医学、農学、工学など広範な分野に応用されてきました。タンパク質、核酸・遺伝子の分析は、古くはペーパークロマトグラフィー等の手法を用いて行われてきましたが、昨今の分析機器の進歩に伴い、様々な分析方法が開発・応用されてきています。また、従前から行われている電気泳動等の分析法においても、関連機器の進歩にはめざましいものがあります。

そこで、本入門講座では、学生あるいは分析の初心者はもちろんのこと、他分野（専門外）の分析研究者が、タンパク質および核酸・遺伝子の分析法について、改めて学ぶ機会を設けたいと考えた次第です。本企画が、多くの読者の参考になれば幸いです。〔「ぶんせき」編集委員会〕

1 はじめに

総タンパク質の検出と定量は、クロマトグラフィーによるタンパク質精製、電気泳動、免疫検出などの多岐にわたるタンパク質の分析において必要不可欠であり、これまでに、総タンパク質の定量の必要性に応じて、多種多様な分析方法が開発されてきた。しかし、すべてのタンパク質をあらゆる組成の溶液中で定量できる手法は、現在のところ皆無である。その理由として、1) タンパク質ごとにその化学的構造が異なること、2) タンパク質が溶解している溶液中には、実験の目的に応じて界面活性剤、還元剤、変性剤などの共存物質が含まれており、これらの共存物質が定量分析に影響を与えること、が挙げられる。このため、複数の総タンパク質の定量方法の中から、その原理と特徴を知り、実験の目的に応じて選択する必要がある。ここでは、溶液中の総タンパク質を吸光光度法および蛍光光度法を用いて定量する方法と、ゲル電気泳動を用いてタンパク質を定量する際に必要な染色色素の特性について述べる。

2 溶液中の総タンパク質定量分析に必要な装置

紫外可視分光光度計または分光蛍光光度計を用いて測定する。サンプルは、分光光度計用のセル（光路長は10 mm）に入れる。多検体のサンプルを短時間で測定する場合、マイクロタイタープレートを利用して測定したほうが便利である。この場合、専用のプレートリーダーが必要である。また、極微量サンプルの測定を行う場合、一例として1 μ Lのサンプルを希釈することなく直接測定可能な超微量分光光度計を用いることができる。

3 吸光光度法

吸光光度法を用いて総タンパク質を定量する場合、大きく分けて以下の三つの方法に分類される。

- ①タンパク質自体の紫外光の吸収を利用した方法
- ②タンパク質と発色色素の化学結合を利用した方法
- ③タンパク質存在下で生じるCu(I)イオンのキレート錯体を利用した方法

以下に各方法について詳述する。

3・1 紫外吸光光度法

タンパク質を構成するアミノ酸の中で、チロシン、トリプトファンおよびフェニルアラニンは、ベンゼン環などの芳香族基を持つアミノ酸のため、280 nm付近の紫外光を吸収する性質を持つ（図1）。この性質を利用して、280 nmにおけるタンパク質の吸光度を測定することによってタンパク質濃度を定量するという方法である。タンパク質の種類によって、タンパク質中のチロシン、トリプトファンおよびフェニルアラニンの含量が異なるため、タンパク質間で280 nmにおける吸光度の値は変動する。しかし、様々なタンパク質を含んだ粗タンパク質溶液の場合、1 cmの光路長の光学セルを用いて測定した時の吸光度が1のとき、その溶液中のタンパク質濃度はおおむね1 mg/mLとなる。そこで、1 mg/mLのタンパク質濃度の時の吸光度を1として概算し、280 nmにおける吸光度を測定することによって、試料溶液中のタンパク質濃度を見積もることができる。

この方法の欠点の一つとして、上記芳香族アミノ酸と

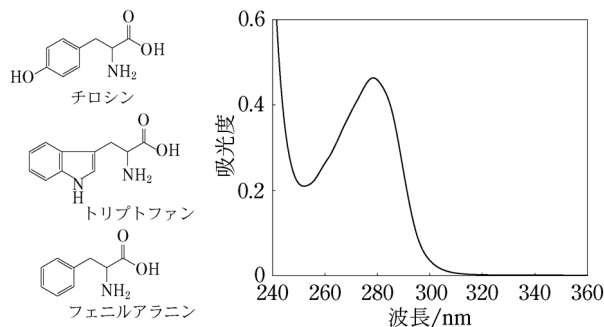


図1 タンパク質に存在する芳香族アミノ酸の構造とウシ血清アルブミンの吸収スペクトル

同じ波長の領域に光吸収を持つタンパク質以外の物質の混入は、タンパク質の定量分析を妨害する。特に核酸は、260 nmに極大吸収波長を持つと同時に、280 nmにも吸収帯があるため、少量の核酸の混入でも、タンパク質の定量分析に大きな影響を与える。 $A_{280}/A_{260} < 1.5$ のときは核酸の混入が考えられるので、別の定量法を検討する (A_{280} は280 nmにおける吸光度、 A_{260} は260 nmにおける吸光度を示す)。若干核酸が混入する程度なら、核酸の光吸収による影響を補正し、タンパク質濃度を測定するために導き出された以下の計算式を使うことができる。

$$\begin{aligned} & \text{タンパク質濃度 (mg/mL)} \\ & = 1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260} \end{aligned}$$

本法の長所として、吸光度計を用いて280 nmにおける吸光度を測定するだけでタンパク質濃度が算出されるので、分析操作が簡便であり、また分析に際し添加剤等を使用しないため、測定後のサンプルを回収することができる。一方、欠点として、本法のタンパク質の定量範囲は50~2000 $\mu\text{g/mL}$ であるため、後述の他の分析方法と比較して検出感度が低いこと、タンパク質の種類により吸光度が変動すること、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)は測定できないこと、紫外部に吸収を持つ物質の混入は、タンパク質の定量を妨害すること、が挙げられる。

3.2 Bradford法

トリフェニルメタン系色素であるCoomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250)を用いたタンパク質の定量方法である(図2)。酸性条件下、CBB G-250をタンパク質溶液に添加すると、タンパク質中の塩基性アミノ酸残基(アルギニン、リジン、ヒスチジン)およびN末端アミノ酸とCBB G-250との間の静電的相互作用、および芳香族アミノ酸との間の疎水性相互作用によって、CBB G-250とタンパク質が非共有結合を介して結合する。このとき、CBB G-250の極大吸収波長は465 nmから595 nmにシフトし、色調が赤紫色から青色に変化

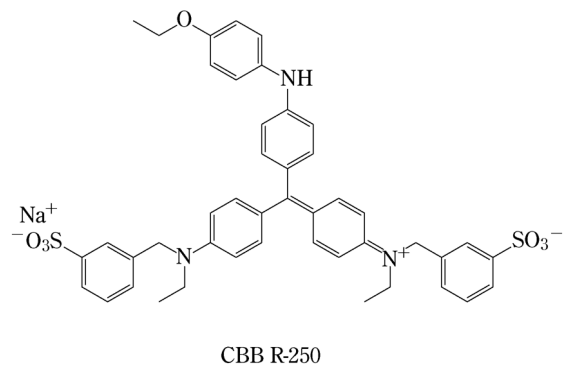
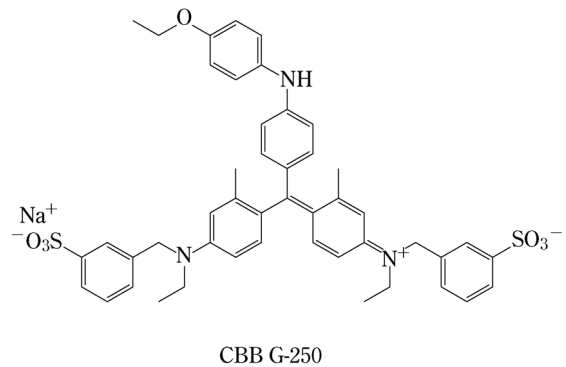


図2 CBB G-250とCBB R-250の構造

することから、595 nmにおける吸光度の変化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(図3)。

Bradford法の定量範囲は10~2000 $\mu\text{g/mL}$ である。また、測定の手続きは、タンパク質溶液をCBB G-250溶液と混合し、室温で1分間静置するだけで測定可能になるため、非常に簡便である。さらに、還元剤(DTT, 2-メルカプトエタノールなど)やキレート剤はCBB G-250の発色反応に影響を与えないため、後述のLowry法およびBCA法を用いたアッセイが不適切な場合、Bradford法を用いることができる。しかし、Bradford法は、界面活性剤の影響を大きく受けやすいため、タンパク質と界面活性剤が共存しているとタンパク質濃度の測定が困難となる(最近では、従来のBradford法では困難とされた界面活性剤共存下での総タンパク質定量測定が可能な分析キットが販売されている)。

3.3 WST法

水溶性テトラゾリウム塩(WST-8)を用いたタンパク質定量方法である(図4)。WST-8は、タンパク質中のアミノ酸(システイン、チロシン、トリプトファン)によって還元されると、ホルマザン体を生成する。生成したホルマザン体は、アルカリ水溶液中で青色に呈色することから、ホルマザン体の極大吸収波長である650 nmの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。

WST法の定量範囲は50~5000 $\mu\text{g/mL}$ であり定量範

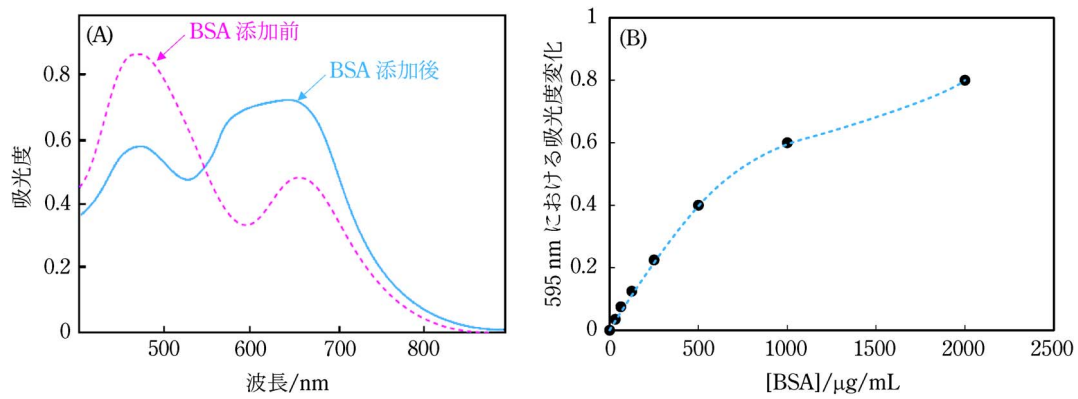


図3 BSA 添加前後における CBB G-250 の吸収スペクトル(A)および BSA 濃度を変化させた時の 595 nm における吸光度の変化(B)

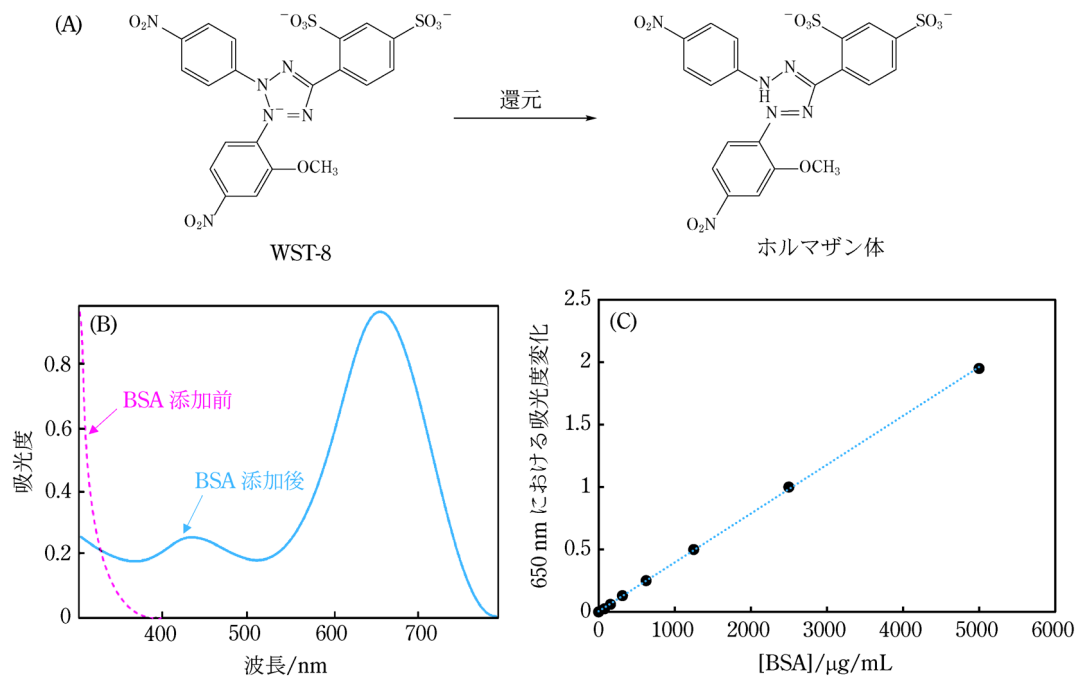


図4 WST-8 の構造と、還元反応によるホルマザン体の生成(A), BSA 添加前後における WST-8 の吸収スペクトル(B)および BSA 濃度を変化させた時の 650 nm における吸光度の変化(C)

囲が広く、測定操作も、タンパク質溶液を WST-8 と混合後、室温で1分間静置するだけで測定可能になるため、非常に簡便である。また、溶液中に混在する界面活性剤の影響を受けにくいという利点がある。一方、色素の還元反応を利用した定量方法であるため、還元物質が測定に与える影響は大きい。

3.4 Biuret 法

アミノ酸が三つ以上つながったトリペプチド以上のオリゴペプチドまたはタンパク質と Cu(II) 溶液をアルカリ性条件下で混合すると、タンパク質またはペプチド鎖中の窒素原子が Cu(II) に配位結合し、Cu(II) から Cu(I) に還元することによって、溶液の色が赤紫色に呈色する(図5)。しかも、反応による呈色の程度は、タン

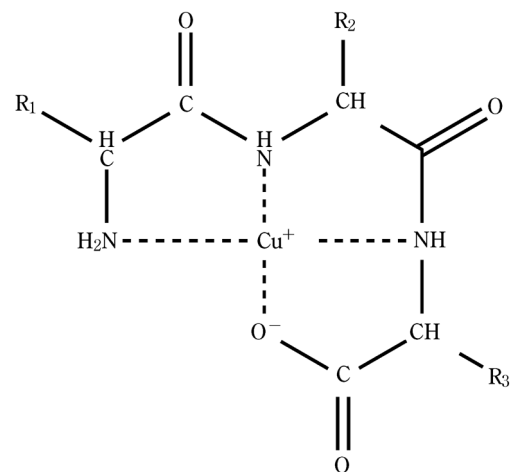


図5 ペプチドと1価銅イオンとの錯体の構造

パク質中のペプチド結合の数が多くなるほど強く呈色する。この現象を利用して、540 nmにおける吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線を用いることによって、タンパク質濃度を算出することができる。

測定方法としては、まず、硫酸銅と酒石酸カリウムナトリウム塩をアルカリ溶液（水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウム）に溶かした試薬（Biuret 試薬）を調製する。次に、Biuret 試薬を試料溶液に加え、540 nmにおける吸光度を測定し、標準タンパク質で作成した検量線と比較することによって、タンパク質を定量することができる。主に血清や尿中のタンパク質の定量に利用されている。

Biuret 法の利点として、タンパク質の単位質量当たりのペプチド結合数は、タンパク質の種類が異なってもほぼ一定であるため、上述の紫外吸光度法と比較して、タンパク質の種類による発色の強さの差が小さい。しかし、定量範囲が 5 mg/mL~160 mg/mL であり検出感度が低く、低濃度試料の測定には適さない。また、高濃度のトリス緩衝液、アミノ酸、スクロース、アンモニウムイオン等は、発色反応に影響を与えるため、測定の誤差に繋がる。

3.5 Lowry 法

上述の Biuret 法を改良し、検出感度の向上を目的として開発された方法で、Biuret 試薬と、フェノール類の検出を目的に開発された Folin-Ciocalteu 試薬（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もの）を組み合わせたタンパク質の定量方法である。原理としては、まずアルカリ性条件下、Biuret 試薬をタンパク質溶液に添加すると、Biuret 試薬中の Cu(II) とタンパク質を構成するペプチドが錯体を形成する。次に、Folin-Ciocalteu 試薬を添加すると、タンパク質中のトリプトファン、チロシン、システインによって、リンタングステン酸とリンモリブデン酸が還元され、試料溶液が青色を呈し、650~750 nm 付近に光の吸収が生じる。このときの吸光度を測定し、標準タンパク質で作成した検量線と比較することによってタンパク質を定量することができる。

Lowry 法によるタンパク質の定量範囲は 1~1500 µg/mL であり、Biuret 法と比較して検出感度が高く汎用性が高い。しかし、タンパク質と Biuret 試薬、Folin-Ciocalteu 試薬との反応に時間を要するため（約 40 分）、他の分析方法と比較して測定に長時間を要する。また、Lowry 法は還元反応を利用したタンパク質検出方法であるため、他の還元物質（チオール類、フェノール類など）により発色が妨害されるほか、タンパク質を調製する際に用いる緩衝液中の成分（界面活性剤、グリセロール、トリシン、EDTA、トリスなど）は、Lowry 法に干渉して沈殿物を生じさせる。

3.6 BCA 法

BCA 法は、Lowry 法を改良した方法で、タンパク質の可溶化に用いられる SDS, Triton-X などの界面活性剤が共存していてもタンパク質の定量分析を行うことができる分析方法である。BCA 法の原理は、上述の Biuret 法および Lowry 法と同様、まず、アルカリ性条件下でタンパク質が Cu(II) と錯体を形成し、タンパク質中システイン、チロシン、トリプトファンによって Cu(II) は Cu(I) に還元される。このときに還元されて生じた Cu(I) の量は、タンパク質量に比例する。次に、Cu(I) に対して選択性の高い比色試薬であるピシニコニン酸 (BCA) を添加すると、BCA2 分子が Cu(I) に配位することによって、562 nm に強い吸収を示す青紫色の錯体を形成する {図 6(A)}。このときの吸光度を測定し、標準タンパク質で作成した検量線を用いて、タンパク質の比色定量分析を行うことができる。

BCA の定量範囲は 1~2000 µg/mL であり、広い濃度範囲で直線性を示し、かつ検出感度が高い {図 6(B)}。また、呈色反応は、界面活性剤、尿素や塩化グアニジンなどのタンパク質の変性剤による影響を受けにくい。しかし、BCA 法は、Cu(II) から Cu(I) への還元反応と BCA と Cu(I) の錯形成反応に基づいているため、EDTA や EGTA 等のキレート試薬、ジチオスレイトールや 2-メルカプトエタノールなどの還元剤、グルコース、リン脂質、硫酸アンモニウムなどにより、タンパク質の定量分析が阻害される（最近では、タンパク質実験で使用される一般的な濃度の還元剤（例：5 mM DTT または 35 mM β-mercaptoethanol）が共存可能な分析キットが販売されている）。

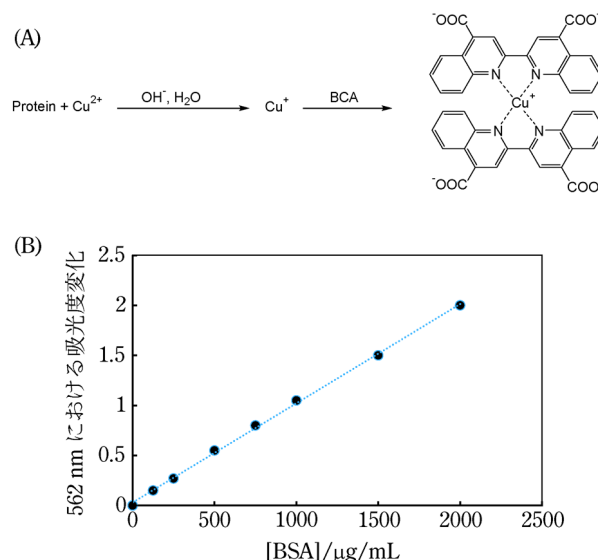


図 6 BCA 法の反応の原理 (A) とウシ血清アルブミン (BSA) との反応における検量線 (B)

4 蛍光法

蛍光法は、種々の化学物質を分析する慣習的な方法であり、高感度である、試料が少量ですむ、大掛かりな装置、熟練した技術を必要としないといった利点がある。特に極微量のタンパク質を高感度で検出する場合、BCA法を除く上述の方法では検出感度が低いため、蛍光法で検出するほうが望ましい。

蛍光法でタンパク質を検出する場合、1) タンパク質中の第一級アミン (N末端あるいはリジンなどの側鎖にあるアミノ基) との結合により蛍光を発する試薬を用いて定量する方法と、2) タンパク質をコートする界面活性剤に結合して蛍光を発する試薬を用いて定量する方法がある。以下に各方法について述べる。

4.1 第一級アミンとの反応を利用したタンパク質の定量

4.1.1 Fluorescamine

Fluorescamine は元々蛍光を生じないが、タンパク質中の第一級アミンと速やかに反応すると、青緑色の蛍光 (極大蛍光波長: 495 nm) を発する誘導体を形成する {図7(A)}。このときの蛍光強度を測定し、標準タンパク質で作成した検量線と比較することによって、タンパク質の定量分析を行うことができる。タンパク質との反応に際して、過剰量の試薬は水との反応により速やかに蛍光を生じない産物に変換されるため、fluorescamine は溶液中のタンパク質濃度の測定に適している。また、溶液中のタンパク質検出のほか、薄層クロマトグラ

フィー (TLC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、キャピラリー電気泳動 (CE) におけるタンパク質の検出にも用いることができる。

Fluorescamine を用いたタンパク質の定量範囲は、 $0.3 \mu\text{g/mL} \sim 13 \mu\text{g/mL}$ である。また、タンパク質溶液に fluorescamine の溶液を添加するだけで、反応が室温で速やかに進行するため、測定操作が簡便である。一方、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。

4.1.2 o-Phthalaldehyde (OPA)

OPA は、2-メルカプトエタノールなどの還元剤存在下、タンパク質中の第一級アミンと室温で反応すると、速やかに青色の蛍光物質を形成する {図7(B)}。極大蛍光波長は 455 nm であり、この波長における蛍光強度を測定し、標準タンパク質で作成した検量線と比較することによって、タンパク質の定量分析を行うことができる。

OPA を用いたタンパク質の定量範囲は、 $0.2 \mu\text{g/mL} \sim 25 \mu\text{g/mL}$ であり fluorescamine を用いた方法よりも高感度かつ定量範囲が広い。また、fluorescamine よりも化学的構造が安定であるため、試薬の取り扱いが容易である。さらにタンパク質との反応、室温条件下、2分以内で進行するので、測定操作が簡便である。一方、タンパク質の種類によって蛍光の発光率が異なるため、すべてのタンパク種に対して同じ検量線を用いることはできない。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。

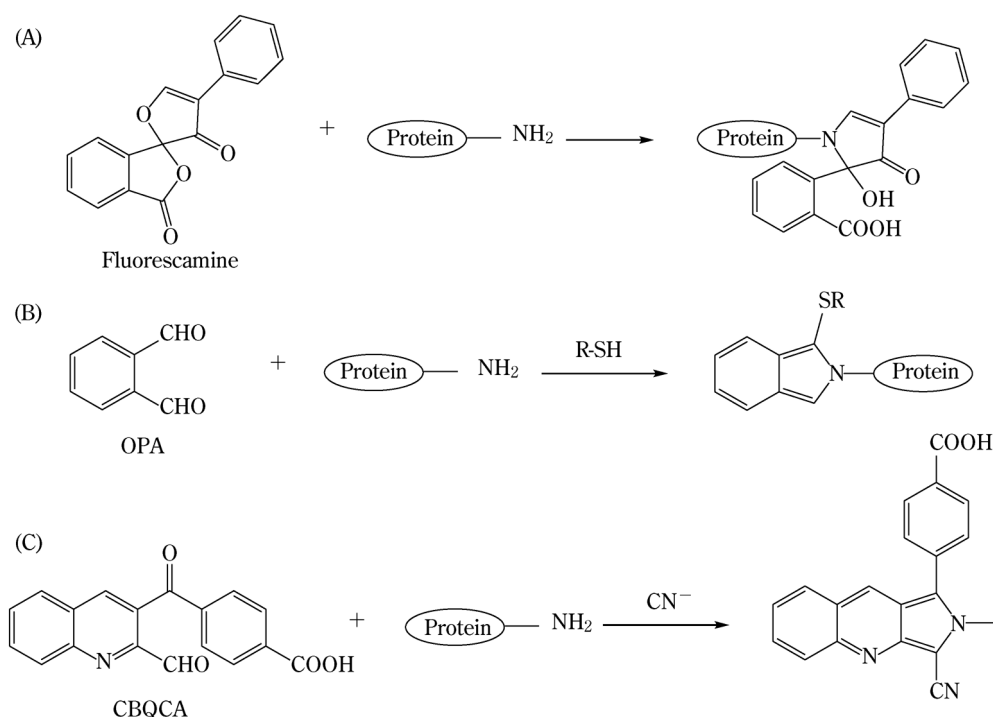


図7 各種蛍光分析試薬とタンパク質との反応

4.1.3 3-(4carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldehyde (CBQCA)

CBQCAは、未反応状態では無蛍光であるが、シアン化物イオン存在下、タンパク質中の第一級アミンと室温で1時間反応すると、緑色の蛍光物質を形成する{図7(C)}。極大蛍光波長は550 nmであり、この波長における蛍光強度を測定し、標準タンパク質で作成した検量線と比較することによって、タンパク質の定量分析を行うことができる。

タンパク質の定量範囲は10 ng/mL~150 µg/mLであり、極めて検出感度が高く、かつ定量範囲が広い。また、脂質や界面活性剤は測定に影響を与えないため、膜タンパク質やリポタンパク質の定量分析が可能である。一方、アミン類またはチオール類を含むバッファーは、測定に影響を与えるため、使用を控えなければならない。

4.2 タンパク質をコートする界面活性剤との反応を利用したタンパク質の定量

4.2.1 NanoOrange

界面活性剤を含むNanoOrange溶液単独では無蛍光状態であるが、タンパク質と10分間90~95°Cでインキュベートすると、界面活性剤によりタンパク質は変性し、界面活性剤はタンパク質表面に吸着する。続いて、タンパク質をコートした界面活性剤と蛍光試薬が反応すると、590 nmに極大波長を持つ蛍光が生じる{図8(A)}。生じた蛍光の強度を標準曲線と比較することで、タンパク質を定量することができる。

タンパク質の定量範囲は10 ng/mL~10 µg/mLであり、極めて検出感度が高い{図8(B)}。また、この分析方法は、還元剤および核酸に対する適応性を有するため、これらの物質が、タンパク質量を妨げることはない。また、タンパク質の種類が異なっても、発光の効率率はほとんど変わらない。さらに上述のCBQCA法と比

較して、検出感度はほとんど同じであるが、反応時間が短いといった利点がある。

5 ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いたタンパク質量

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は、電流による分子ふるい効果を利用して、電荷を帯びたタンパク質を、強制的にゲルマトリックスを通過させ、電荷や分子量などの物理的特性に応じてタンパク質を分離させる技術である。分離されたタンパク質の電気泳動パターンから、タンパク質の分子量決定、等電点、純度決定、定性・定量等を行うことができるため、各種タンパク質の主たる分離・分析法となっている。通常、タンパク質は目に見えないため、ゲル電気泳動によって分離されたタンパク質を検出するためには、色素などを用いて染色する必要がある。染色後、画像解析ソフトウェアによって電気泳動パターンからシグナル強度を算出し、タンパク質量が既知であるサンプルを泳動したレーン全体のバンドシグナルと比較を行い、定量したいサンプルのタンパク質量を算出することができる。本項では、電気泳動そのものの原理には触れず別途専門書に委ね、ゲル中のタンパク質を検出するために必要な染色方法とその特徴について述べる。

5.1 CBBによるタンパク質の染色

トリフェニルメタン系色素であるCoomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250)を用いたタンパク質の染色方法である(図2)。電気泳動後のゲルを洗浄後、CBB溶液中にゲルを浸し、数十分間振盪させることによって、CBBとタンパク質が結合し、タンパク質に由来する青色のバンドが現れる。必要に応じて脱イオン水などを用いて脱色操作を行うことによって、バックグラウンドが下がり、より鮮明な電気泳動パターンを得ることができ

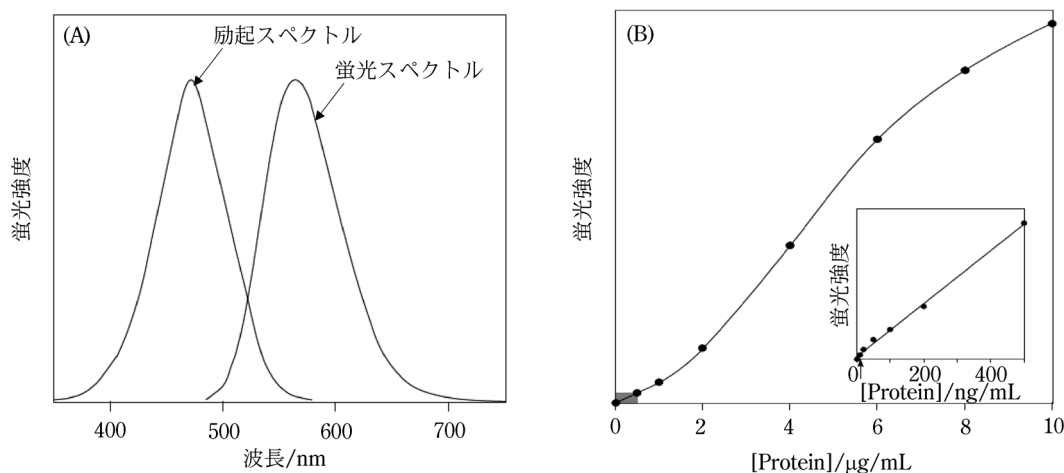
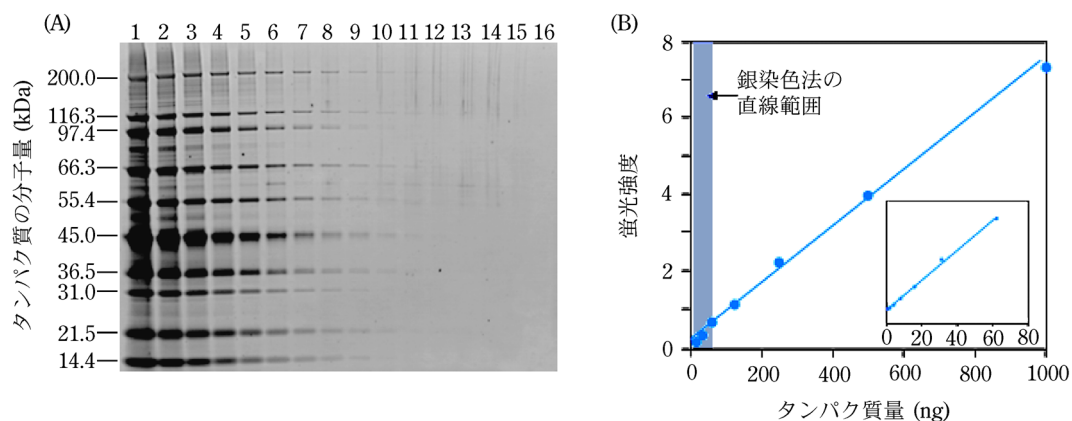


図8 タンパク質添加時におけるNanoOrangeの励起スペクトルと蛍光スペクトル(A)およびBSAタンパク質濃度を変化させた時の590 nmにおける蛍光強度の変化(B)



(A)におけるレーン 9 のタンパク質量は 1.0 ng。

図 9 SDS-PAGE 後、マーカートンパク質を SYPRO Ruby で染色した時の蛍光画像 (A) と蛍光強度とタンパク質量の関係 (B)

表 1 吸光光度法を利用した総タンパク質量法

測定方法	測定原理	検出波長	定量範囲	妨害物質	特徴
紫外吸光光度法	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, フェニルアラニン) の吸収	280 nm	50~2000 µg/mL	核酸, 芳香族アミノ酸	<ul style="list-style-type: none"> • 簡便 • 添加剤等が不要 • 試料を回収可能 • タンパク質間の変動大
Biuret 法	タンパク質と Cu (II) との錯体形成による呈色反応	540 nm	5 mg/mL ~160 mg/mL	トリス緩衝液, アミノ酸, スクロース, アンモニウムイオン等	<ul style="list-style-type: none"> • 測定操作が簡便 • 検出感度が低い
Lowry 法	チロシン, トリプトファンとリンモリブデン酸との反応と Biuret 反応との組み合わせ	750 nm	1~1500 µg/mL	還元剤, 界面活性剤, グリセロール, トリシン, EDTA, トリス	<ul style="list-style-type: none"> • 検出感度が高い • 測定操作が煩雑 • タンパク質によって発色の程度に差がある
BCA 法	タンパク質によって還元された Cu (I) と BCA との錯体形成による呈色反応	562 nm	1~2000 µg/mL	還元剤, グルコース, リン脂質, 硫酸アンモニウム	<ul style="list-style-type: none"> • 検出感度が高い • 測定操作が簡便 • タンパク質間の発色の変動が少ない
Bradford 法	CBB がタンパク質と複合体を形成することで最大吸収波長がシフトすることを利用	595 nm	10~2000 µg/mL (Standard 法) 1~50 µg/mL (Micro 法)	界面活性剤	<ul style="list-style-type: none"> • 測定操作が簡便 • 検出感度が高い • タンパク質の種類により発色に差がある
WST 法	タンパク質によって還元された WST-8 の呈色反応	650 nm	50~5000 µg/mL	還元剤	<ul style="list-style-type: none"> • 測定操作が簡便 • 定量範囲が広い • 界面活性剤の影響を受けにくい。

る。

検出感度は、各種メーカーから販売されているキットによって異なるが、おおむね 8~50 ng である。また、タンパク質濃度とタンパク質バンドのシグナル強度の間には直線性があるため、定量分析も可能である。

5.2 蛍光色素によるタンパク質の染色

蛍光色素によるタンパク質の染色方法は、上述の CBB によるタンパク質の染色方法と比較して検出感度が高いため、極微量のタンパク質を定量する上で有効である。また、タンパク質染色キットも複数販売されているが、ここでは SYPRO® Ruby と Oriole™ 蛍光ゲル

ステインの 2 種類について述べる。

SYPRO® Ruby タンパク質ゲル染色試薬の検出感度は 0.25 ng であり、CBB 法と比較して極めて高い (図 9)。また、電気泳動後の染色工程も、ゲルの固定化→染色→脱色の 3 ステップで済み、染色に必要な時間についてもマイクロ波法と組み合わせることで、90 分で終了する。さらにタンパク質の定量化範囲は 3 桁にわたるため、幅広い濃度範囲でタンパク質の定量を行うことができる。

Oriole™ 蛍光ゲルステインの検出感度は 0.5~1 ng であり、極微量のタンパク質を検出する上で有効な方法である。また、染色プロトコールは、90 分間の染色ス

表 2 蛍光光度法を利用した総タンパク質定量法

測定方法	測定原理	励起波長/蛍光波長	定量範囲	妨害物質	特 徴
Fluorescamine 法	第一級アミンとの結合により蛍光を発する	395 nm/495 nm	0.3 µg/mL ~13 µg/mL	タンパク質以外のアミノ基を有する物質	<ul style="list-style-type: none"> 検出感度が高い タンパク質間の変動が大きい 試料が不安定
o-Phthalaldehyde (OPA) 法	第一級アミンとの結合により蛍光を発する	340 nm/455 nm	0.2 µg/mL ~25 µg/mL	タンパク質以外のアミノ基を有する物質	<ul style="list-style-type: none"> 検出感度が高い タンパク質間の変動が大きい
CBQCA 法	第一級アミンとの結合により蛍光を発する	450 nm/550 nm	10 ng/mL ~150 µg/mL	タンパク質以外のアミノ基およびチオール基を有する物質	<ul style="list-style-type: none"> 検出感度が高い 脂質、界面活性剤の影響を受けない
NanoOrange 法	タンパク質をコートする界面活性剤に結合して蛍光を発する	470 nm/570 nm	10 ng/mL ~10 µg/mL		<ul style="list-style-type: none"> 検出感度が高い 測定操作が簡便 タンパク質間の変動が少ない 反応時に 95 °C の加熱が必要

トップのみで、タンパク質の固定化、ゲルの洗浄、脱色の操作が不要であるため、簡便にタンパク質を染色することができる。さらに、タンパク質の定量範囲は3桁にわたるため、幅広いダイナミックレンジでタンパク質を定量することができる。

検出方法については、CBB 染色法の場合、目視観察が可能であるが、SYPRO® Ruby 法を含め蛍光色素を用いて染色したタンパク質を検出する場合、標準 UV トランスイルミネーター、青色光トランスイルミネーターまたはレーザースキャナーが必要となる (Oriole™ 蛍光ゲルステインの場合、UV 励起が可能なイメージ解析装置、トランスイルミネーターでのみ検出が可能)。

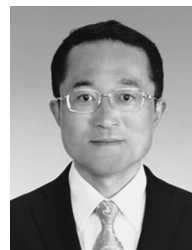
6 おわりに

溶液中における総タンパク質定量法の特徴を表 1 および表 2 にまとめた。冒頭で述べたように、すべてのタンパク質をあらゆる組成の溶液中で定量できる手法は、現在のところ皆無であるため、例えば、サンプル中に還元剤、キレート剤が含まれている場合には Bradford 法を選択し、界面活性剤が含まれている場合には BCA 法を採用することが通例であった。しかし最近では、本章でも一部触れたように、それぞれの方法の弱点が改良された製品が開発されてきていることから、まず、定量測定における分析時間、分析の精度、測定濃度範囲、操作性を考慮し、さらに共存物質の測定に与える

影響を踏まえた上で、数ある総タンパク質定量法の中から最適な方法を選択することが望ましい。本稿がその一助になれば幸いである。

文 献

- 1) 長谷俊治, 高尾敏文, 高木淳一編: “やさしい原理からはいるタンパク質科学実験法 1 タンパク質をつくる—抽出・精製と合成”, (2008), (化学同人).
- 2) “DOJINDO プロトコル”, (2016), (株式会社同人化学研究所).
- 3) R. P. Haugland: “*Handbook of Fluorescent Probes and Research Products Ninth Edition*”, (2002), (Molecular Probes).
- 4) サーマフィッシャーサイエンティフィック社 SYPRO® Ruby Protein Gel Stain 使用プロトコル (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S12000>) (2017年8月10日著者最終確認).
- 5) バイオ・ラッド社 ゲル染色剤 (http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/japan/japanese/misc/236-243_ElectrophoresisBlotting-5.pdf) (2017年8月10日著者最終確認).



鈴木祥夫 (Yoshio Suzuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所健康工学研究部門 (〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第六)。九州大学大学院工学研究科博士課程修了。博士 (工学)。
 <現在の研究テーマ>機能性分子材料の開発と生体分子検出への応用。<趣味>鉄道模型, 水泳。
 E-mail: suzuki-yoshio@aist.go.jp