

今さら聞けない……

「タンパク質定量」が わかる!

10分で
スッキリ



必読判定→
チェックリスト

- どのタンパク質定量法が最適なのか分からない。
- 実は……、スタンダードタンパク質の調製法が正しいのか分からない。
- 夾雑物が多いサンプルのタンパク質定量が上手くできない。

【1】タンパク質定量方法の選択

最適なタンパク質定量方法の選択が、正確な定量結果への第一歩。

タンパク質関連の多岐にわたる研究テーマにおいて、正確にタンパク質を定量することは非常に重要で不可欠です。これまでに、タンパク質定量法として様々な方法が開発されています。それぞれに長所と短所があります。例えば、共存しても影響のない(あるいは少ない)成分はそれぞれの手法によって異なりますので、測定をしたいサンプルの溶液組成や目的を基に、最適なタンパク質定量方法を選択してください。分光光度計を使用したタンパク質の定量は大きく「紫外吸収法」と「比色法」の2つの方法に分けられます。この項目ではそれぞれについて簡単に解説します。

1. 紫外吸収法 定量範囲:10~1,000 ug/mL 測定波長:280 nm

280 nm付近に吸収のあるトリプトファン(吸収極大値:278 nm)、チロシン(275 nm)、フェニルアラニン(257 nm)の吸光度を測定し定量を行います。溶液の吸光度を測定するだけなので、簡便に定量できます。他の測定方法に比べ、微量で定量でき、定量後の試料が回収できる利点があります。

タンパク質によってトリプトファンやチロシンの含量が異なるため、同じ濃度のタンパク質溶液でもそのタンパク質組成によって吸光度は全く異なります。そのため、様々な種類のタンパク質が混在している溶液よりも、ある単一のタンパク質のみが含まれている溶液(精製後タンパク質溶液等)に向いている手法です。

● 利点

- 操作が簡便
- サンプルの回収が可能

● 欠点

- タンパク質により吸光係数の差が大きく、コラーゲンなどは測定不可
- 核酸など280nm付近に吸収を持つ物質があると不正確

今さら聞けない・・・

吸光係数って何? どうやって求めるの?

吸光係数とは、『光がある媒質に入射したとき、その媒質がどれくらいの光を吸収するのかを示す定数』のことで、それぞれの物質が固有に持っています。目的の物質が1.0 mol/l の濃度で含まれている溶液を光路長1cmのセルで測定したときに得られる吸光度がモル吸光係数 ϵ として表されます。また、吸光係数 $E\%_{1cm}$ が使用される事も多いかと思えます。これは、目的の物質が1%の濃度で含まれる溶液を光路長1cmのセルで測定したときに得られる吸光度の事です。それぞれのタンパク質固有の280nmでの吸光係数が分かれば、得られた吸光度よりタンパク質濃度を算出することができます。

『タンパク質固有の吸光係数』は、どのように求めるのでしょうか。文献に掲載されている場合には、その情報を活用するとよいですが、そのような情報がない場合(新規のタンパク質など)には配列から計算することができます。配列情報を入力すると自動で計算されるサイトがいくつかありますのでとても便利ですね。自力で計算してみようという場合には、下記の式などが参照できます。

$$\epsilon = \text{Trp} \times 5500 + \text{Tyr} \times 1490 + \text{Cystine} \times 125 \quad [\text{A}280/\text{mol}/\text{cm}]$$

(1995, Prot. Sci.4:2411-2423, C.N.Pace et al.)

2. 比色法

タンパク質に特異的に結合する色素を使用し、結合した色素を測定する事でタンパク質の濃度を測定する手法です。濃度が分かっているサンプル(スタンダードサンプル)の希釈系列と色素を反応させ吸光度を測定して検量線を作成します。目的の濃度未知サンプルも同様に吸光度を測定し、濃度を算出します。代表的な比色法はビュレット法、ローリー法、BCA法、ブラッドフォード法が挙げられます。

2-①. BCA法 定量範囲:1~2,000 ug/ml 測定波長:562 nm

BCA法は、他法と比べると界面活性剤の影響をあまり受けないので、界面活性剤が多く含まれるサンプルにお勧めの定量方法です。反応機序は、第一ステップ(タンパク質による銅イオンの還元)と第二ステップ(銅イオンとBCA試薬の結合による呈色)を組み合わせた方法です。

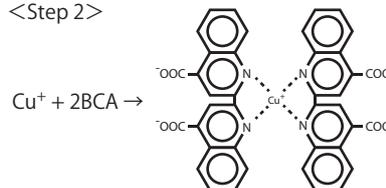
<Step 1> アルカリ性条件において、タンパク質は2価銅イオン(Cu²⁺)とキレート錯体を生成し、その錯体中の2価銅イオン(Cu²⁺)は、ペプチド結合により1価銅イオン(Cu⁺)へ還元されます。このとき、ペプチドにシステイン残基、シスチン残基、トリプトファン残基、チロシン残基があると反応が起こりやすくなります。また、アミノ酸の数が2つ以下の場合にはこの反応が起こらないため、BCA法で測定できる対象は3アミノ酸以上のペプチドとなります。

<Step 2> Cu⁺は2分子のBCAと配位結合し、562nm付近に最大吸収波長を持つ青紫色の錯体が形成されます。吸光度はペプチド結合数を反映したのですが、タンパク質単位質量あたりのペプチド結合数は、ほぼ一定であるため、吸光度はタンパク質濃度と比例します。

<Step 1>



<Step 2>



●利点

- ・界面活性剤の影響を受けにくい
- ・検量線の直線性が高く精度が高い
- ・定量範囲が広い
- ・タンパク質による発色率の差が小さい

●欠点

- ・チオール、グルコース、リン脂質、硫酸アンモニウムなどにより阻害される
- ・ジチオスレイトール(DTT)や2-メルカプトエタノール(2-ME)などの還元剤の存在下で定量が阻害される
- ・EDTA (>10 mM) やEGTA (あらゆる濃度) などの金属キレート剤により阻害される

2-②. ビュレット法 定量範囲:数100ug/ml ~ 測定波長:546 nm

ビュレット反応に基きタンパク質を検出する方法です。操作が簡単なのですが、感度は低いため、低濃度タンパク質サンプルには向いていません。血清などタンパク質濃度が高いサンプルの定量に利用されています。

2-③. Lowry法 定量範囲:10~1500 ug/ml 測定波長:750 nm

ビュレット法が改良されて検出感度が向上した定量方法です。酒石酸銅とFolin試薬とタンパク質との反応による呈色を検出します。反応時間が他の手法に比べると長めですが、BCA法と同様、タンパク質による発色率の差が小さい等の長所があります。

ビュレット/Lowry/BCA どう使い分ける??

ビュレット法、Lowry法、BCA法はどれも『ビュレット反応』を基にした定量方法です。似たような特徴(還元剤の共存が難しい、タンパク質間の発色率の差が小さい、等)を持っているのはそのためです。歴史的には、一番古典的なのがビュレット法。そして、1951年にOliver H. LowryらによってLowry法が、1985年にはPaul K. SmithらによってBCA法が発表されました。歴史のあるラボでは、引き継いだプロトコールがLowry法だったから、というような理由で今もLowry法やビュレット法を使い続けている方もおられるかと思います。もし、そういった経緯がないのであれば、たくさんの科学者の英知が詰まったBCA法をお試しいただくのがオススメです。

2-④. Bradford 法 定量範囲:50~1,000 ug/mL 測定波長:595 nm

CBB G-250色素を酸性条件下でタンパク質と結合させてその吸収を測定します。タンパク質と結合し複合体が生成されると、色素の色は赤茶色(最大吸収波長が465 nm)から青色(極大吸収波長:595 nm)に変化します。CBBは、タンパク質の塩基性アミノ酸残基、芳香族アミノ酸残基と結合することが知られています。還元剤の影響を受けないため、還元剤を含むサンプルに使用可能です。フリーのアミノ酸やペプチドとではCoomassie色素の結合による発色は起こらず、一般的にはペプチドやタンパク質の分子量は少なくとも3,000 Da以上が必要とされています。

●利点

- 操作が簡単で妨害物質が少ない
- 還元剤(DTTや2-メルカプトエタノールなど)やキレート剤の影響を受けない
- 反応時間が短く操作が簡便

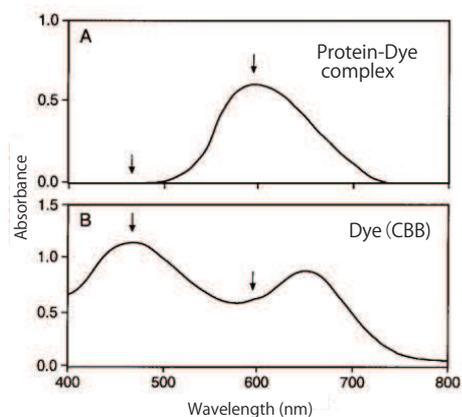
●欠点

- 検量線の直線性が低い
- 特定のアミノ酸側鎖に結合するため、他法に比べてタンパク質によって発色率に差がある
- 界面活性剤の混入により反応が阻害される
- 色素がガラスや石英のキュベットに吸着する

近似曲線について

タンパク質濃度と吸光度は比例関係となります¹。そのため、近似曲線を引く場合には直線(一次曲線)を引きます。しかし、Bradford法の場合、タンパク質濃度が高くなると検量線の傾きが小さくなる傾向があります。これは、Bradford 試薬に含まれる色素(CBB G-250)がタンパク質と結合していない遊離の状態では595nmに吸収を持ち、バックグラウンドとして一緒に検出されてしまうためです(右図)。

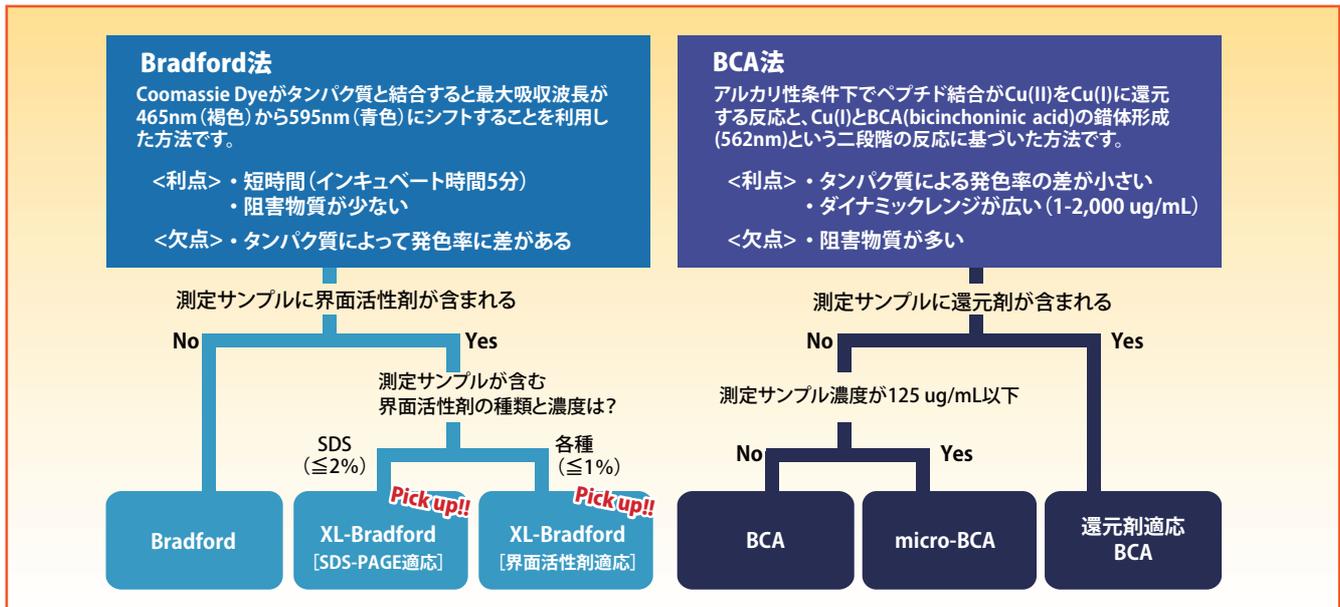
高濃度領域で直線性が得られなかった場合、直線性のある範囲で検量線を作成してください。どうしても直線性が得られない場合、595nm/450nmの吸光度の比をY軸にとることで改善します²。



1. Bradford, M.M., Anal. Biochem., 72, 248 (1976).
2. Ernst, O., Anal. Biochem., 236, 302 (1996).

アプロサイエンスのタンパク質定量キット・試薬のご紹介

アプロサイエンスでは、下記の通りタンパク質定量キットをラインナップしています。実験系や目的に合わせてお選びください



製品名	包装	製品コード	通常価格(税別)
総タンパク質定量試薬 [Bradford]	500mL (5×)	KY-1020	¥ 10,000
XL-Bradford [SDS-PAGE適応]	100mL (5×)	KY-1030	¥ 14,000
XL-Bradford [SDS-PAGE適応]	500mL (5×)	KY-1031	¥ 50,000
XL-Bradford [界面活性剤適応]	100mL (5×)	KY-1040	¥ 14,000
XL-Bradford [界面活性剤適応]	500mL (5×)	KY-1041	¥ 50,000
総タンパク質定量試薬 [BCA]	500~1,000回分	KY-2010	¥ 40,000
総タンパク質定量試薬 [micro-BCA]	400回分	KY-2020	¥ 40,000
総タンパク質定量試薬 [還元剤適応BCA]	250回分	KY-2030	¥ 40,000

最新のキャンペーン情報はAPRO ウェブサイト等でご確認ください!

Pick Up 商品のご紹介

前ページにも記載した通り、一般的なBradford試薬は界面活性剤の影響を強く受けてしまう手法です。アプロサイエンスでは、Bradford法の手軽さや感度はそのままに、かつ、界面活性剤の影響を受けないXL-Bradfordシリーズを開発・販売しています。

XL-Bradford [SDS-PAGE適応] / XL-Bradford [界面活性剤適応]

- SDS-PAGEサンプルバッファーや界面活性剤溶液に溶解したタンパク質をそのまま定量可能
- 簡便な操作で多検体処理などにも最適

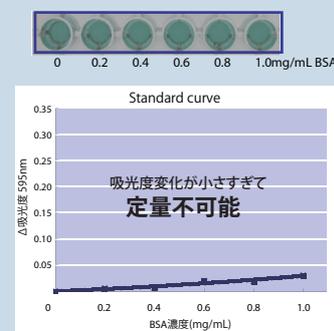


タンパク質の抽出に必ず界面活性剤を使っているため今までBradford法ではなくBCA法のキットを使ってタンパク質定量をしていました。この試薬は、界面活性剤が入っていても使えるので試してみました。BCAより作業が簡便なので、多検体処理に重宝すると思います。

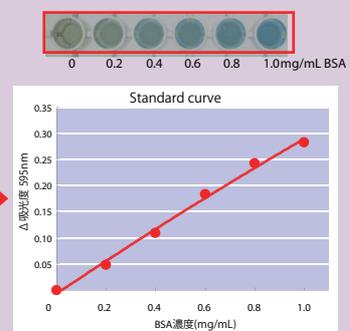


ユーザー様

通常のBradford法



XL-Bradford



SDS-PAGEサンプルバッファーを用いて0~1.0mg/mLの標準タンパク質(BSA)溶液を調製し、通常のBradford試薬とXL-Bradford[SDS-PAGE適応]を用いて検量線を作製しました。SDS-PAGEサンプルバッファーを含んだサンプルは、通常のBradford法では測定できませんが、本試薬では測定可能です。

【2】スタンダードタンパク質の調製方法

正確な測定の要です！意外に知らない(?)スタンダードタンパク質の調製

比色法においては、スタンダードタンパク質の調製は非常に重要で最新の注意を払うポイントです。ここでは、よく質問をいただく項目についてQ&A式でお届けいたします。

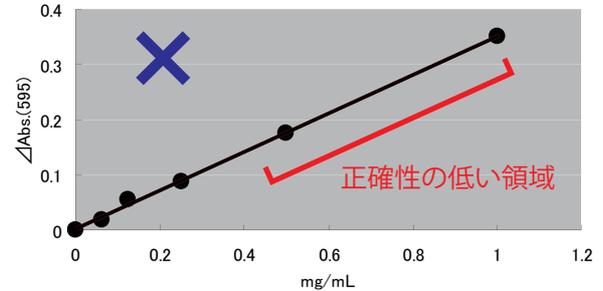
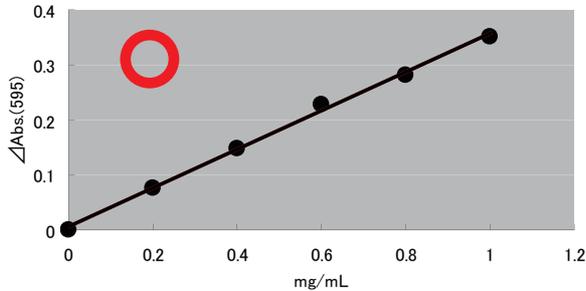
Q.1 どのタンパク質をスタンダードに使ったらいいの？

タンパク質量法のスタンダードとして使用される最適なタンパク質は、測定しようとするタンパク質の精製標品です。精製標品がない場合は、一般的にスタンダードタンパク質としてウシ血清アルブミン(BSA)が用いられます。

[注意] Bradford法では、BSAはウシγグロブリンなどの他のタンパク質に比べて発色量がかかなり大きくなります。測定するサンプルがBSAの発色量と大きく異なる場合は、他のタンパク質をスタンダードとして選択する必要があります。

Q.2 スタンダードタンパク質の濃度はどうやって決めたらいいの？

スタンダードタンパク質の濃度は測定範囲内でブランク(タンパク質濃度0mg/mL)を含め6点以上とります。また、測定範囲内で濃度に偏りがないように希釈します(下図左)。特にBradford法の場合、高濃度で検量線の傾きが小さくなる傾向があるため、直線領域を広くし、測定範囲内の正確性を一定にするために重要です。



Q.3 スタンダードタンパク質はどんな手順で調製したらいいの？

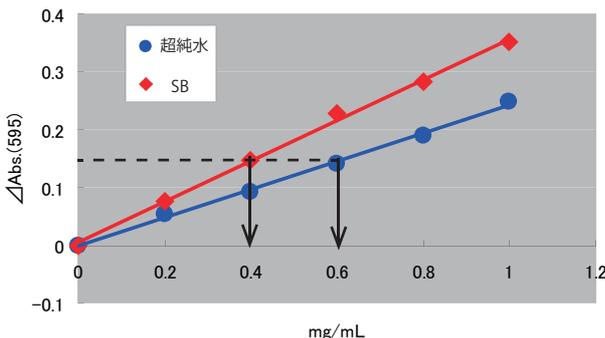
例)	Tube #	1	2	3	4	5	6
Standard Protein Final Conc.(mg/mL)		1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
2mg/mL Standard Protein (uL)		30	40	30	20	10	0
Buffer(uL)		30	10	10	10	10	20

N=2で測定する場合、もう一度、同様にスタンダードタンパク質希釈系列を調製します。

- ① サンプルと同じバッファーを使用してスタンダードタンパク質を2mg/mLとなるように調製します。
- ② 2mg/mLスタンダードタンパク質とバッファーを30uLずつ混合します(=1.0mg/mL)。
- ③ 1.0mg/mL溶液40uLを新しいチューブに移し、バッファー10uLと混合します(=0.8mg/mL)。
- ④ 同様に0.6、0.4、0.2mg/mLを調製します。ブランクはバッファーのみです。

Q.4 スタンダードタンパク質を調製する溶液っていつも超純水でいいの??

スタンダードは測定するサンプルと同じバッファーで希釈してください。バッファーに含まれる成分がタンパク質および色素と相互作用を起こし、測定値に影響を与える可能性があります。スタンダードのブランク(タンパク質濃度0mg/mL)も測定するサンプルと同じバッファーで調製します。



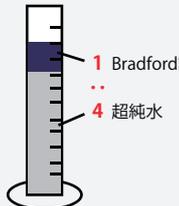
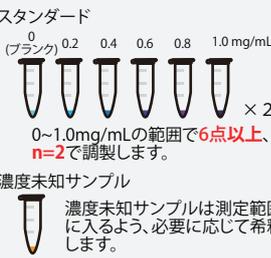
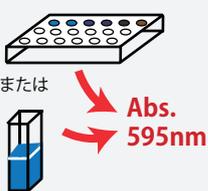
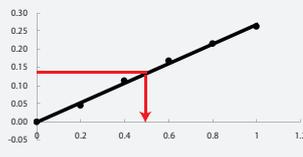
左図はXL-Bradford[SDS-PAGE適応](Cat. No. KY-1030)を用いて、各濃度のBSAを超純水またはSDS-PAGE用サンプルバッファー(SB)で調製し、スタンダードカーブを作製したものです。超純水とサンプルバッファーで直線の傾きが異なるため、例えばサンプルの吸光値が0.15だった場合には超純水のスタンダードでは0.6mg/mL、サンプルバッファーのスタンダードでは0.4mg/mLと差ができてしまいます。

【3】測定とデータ解析

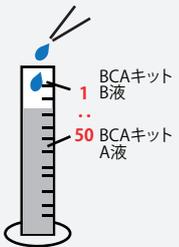
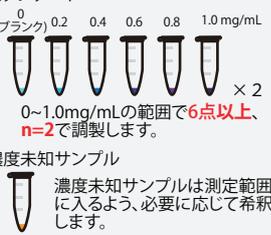
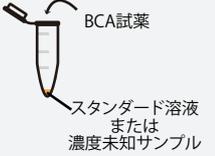
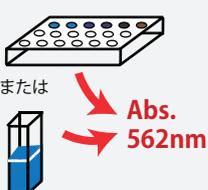
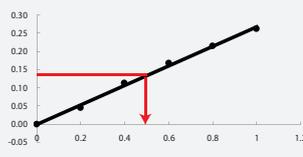
今さら聞けない・・・、これでバッチリ! 検量線の作成 & 解析方法

タンパク質定量は、タンパク質研究において日常的に行う測定です。キット化されたものを使用する方も、自作の試薬を使って測定・解析をする方も正確に再現性良く行えるように準備してください。この項目では、比色法でタンパク質定量を行う際の手順や解析方法について簡単に流れを説明します。

操作概要 Bradford試薬 (5倍濃縮タイプ)を使用する場合

試薬の調製	スタンダード溶液の調製	混合	測定	タンパク質濃度の決定
Bradford試薬を室温に戻し、超純水で5倍希釈します。	スタンダードタンパク質溶液を調製し、濃度未知サンプルを準備します。 ・スタンダード (ブランク) 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 mg/mL × 2 0~1.0mg/mLの範囲で6点以上、n=2で調製します。 ・濃度未知サンプル 濃度未知サンプルは測定範囲に入るよう、必要に応じて希釈します。	調製したスタンダード溶液と測定サンプルに5倍希釈したBradford試薬を加えます。	5分間インキュベートした後、マイクロプレートまたはキュベットに移し、595nmの吸光度を測定します。	検量線を作成し、濃度未知サンプルのタンパク質濃度を決定します。
				

操作概要 BCAキットを使用する場合

試薬の調製	スタンダード溶液の調製	混合・反応	測定	タンパク質濃度の決定
BCAキットの試薬を混合します。	スタンダードタンパク質溶液を調製し、濃度未知サンプルを準備します。 ・スタンダード (ブランク) 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 mg/mL × 2 0~1.0mg/mLの範囲で6点以上、n=2で調製します。 ・濃度未知サンプル 濃度未知サンプルは測定範囲に入るよう、必要に応じて希釈します。	調製したスタンダード溶液と測定サンプルに混合したBCA試薬を加えます。	60℃にて15分間インキュベートした後、マイクロプレートまたはキュベットに移し、562nmの吸光度を測定します。	検量線を作成し、濃度未知サンプルのタンパク質濃度を決定します。
				

※ アプロサイエンスBCAキットの場合

「タンパク質定量」は 新人研修にも最適・・・?!

「タンパク質定量」を正確に再現性良く行うためには、マイクロピペットのメンテナンスや操作方法、器具の準備、反応温度や時間が毎回一定であるか、などタンパク質定量だけでなく実験一般を行う上で重要なファクターが詰め込まれています。アプロサイエンスでは新人研修の期間にタンパク質定量をよく実施します。再現性良く、正確に、そして手早くできるようになるまで何回も練習です。タンパク質定量がきちんとできれば、他の実験も再現性よく自信をもって行えます!

1. 検量線の作成

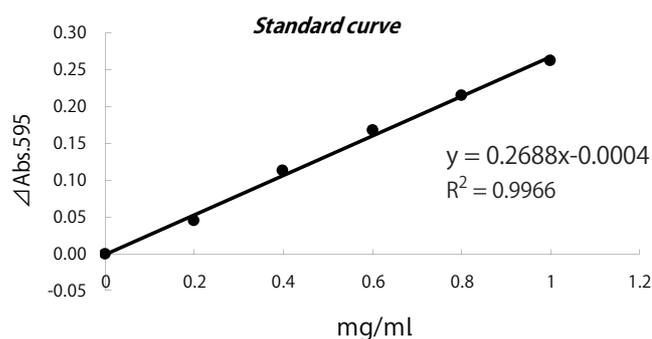
1-1. n=2で測定したスタンダードタンパク質の吸光度の平均値を算出します。

スタンダードタンパク質の濃度 (mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
595nmの吸光度①	0.2471	0.2886	0.3620	0.4158	0.4628	0.5094
595nmの吸光度②	0.2464	0.2952	0.3565	0.4130	0.4619	0.5100
吸光度①と②の平均値	0.2468	0.2919	0.3593	0.4144	0.4624	0.5097

1-2. 1-1で算出した吸光度の平均値からブランク(スタンダードタンパク質濃度(0mg/mL)の吸光度0.2468を差し引きます。

スタンダードタンパク質の濃度 (mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
吸光度①と②の平均値	0.2468	0.2919	0.3593	0.4144	0.4624	0.5097
平均値-ブランク	0.0000	0.0452	0.1125	0.1677	0.2156	0.2630

1-3. 1-2で算出した平均値-ブランクの値をY軸、スタンダードタンパク質の濃度をX軸にとってXYプロットを行い、最小二乗法により近似曲線を引きます。



2. 濃度未知サンプルのタンパク質濃度の算出

2-1. 測定した濃度未知サンプルの吸光度からブランクの吸光度0.2468を差し引きます。

2-2. 作成した検量線の式から濃度未知サンプルのタンパク質濃度を算出します。

例) 濃度未知サンプルの吸光度が0.4015の場合、
(吸光度)-(ブランク) $0.4015 - 0.2468 = 0.1547$
一次式の y に代入 $0.1547 = 0.2688x - 0.0004$
 $x = 0.5770 \text{ mg/mL}$

