

総タンパク質濃度の測定

BioMate160紫外可視分光光度計および8セルチェンジャーアクセサリのBCAアッセイへの活用

著者

Daniel Frasco, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI

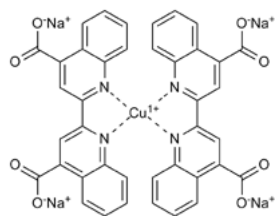
キーワード

タンパク質BCAアッセイ、BioMate紫外可視分光光度計、8セルチェンジャーアクセサリ、総タンパク質

はじめに

BCAタンパク質アッセイは、タンパク質濃度決定のためにもっとも使用されるアッセイの一つです。分析時間が短く直線性範囲が広く、界面活性剤との適合が良好で、他の方法と比較してタンパク質間のばらつきがより小さい特性があります。

アッセイの最初のステップは、アルカリ溶液中のタンパク質によるCu²⁺へのCu⁺への還元であり、ビウレット反応とも呼ばれています。次に、図1に示すように、一つのCu⁺イオンと2分子のピシニコニン酸 (BCA) とのキレート化によって、紫色の生成物が形成されます。BCA-銅錯体は、562 nmで強い吸光度を示し、広い範囲でタンパク質濃度に正比例します。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミン (BSA) のような一般的なタンパク質の標準を参照して決定されます。BCA-銅を添加した濃度の異なる一連のタンパク質溶液を調製することで、未知のサンプル中のタンパク質の濃度を決定するための検量線を構築できます。



▲ 図1. BCA-銅錯体

表1. タンパク質標準溶液の調製

バイアル	希釈液 (μL)	BSA 液の容量 (μL)	最終濃度 (mg/mL)
1	0	原液300	2.000
2	125	原液375	1.500
3	325	原液325	1.000
4	325	バイアル3溶液の325	0.500
5	325	バイアル4溶液の325	0.250
6	450	バイアル5溶液の50	0.025
7	400	0	0



◀ BioMate 160紫外可視分光光度計および8セルチェンジャー

実験と結果

すべての測定には、キセノンフラッシュランプおよびデュアルシリコンフォトダイオード検出器によるデュアルビーム光学系を搭載したThermo Scientific™ BioMate™ 160紫外可視分光光度計を使用しました。サンプルは、光路長10 mmのディスプレイザブル 4. 5mL メタクリレートキュベットセルを用いて分析しました。この実験には、BCA試薬AおよびB、アルブミン標準アンブルBCAを含むThermo Scientific™ Pierce™ BCAタンパク質アッセイキット (No. 23227) を使用しました。

まずBCA試薬A50当量とBCA試薬B1当量を混合し、BCA作業試薬を調製しました。この実験では、20 mLのBCA試薬Aを0.4 mLのBCA試薬Bと混合しました。この溶液は、室温で数日間安定です。ウシ血清アルブミン (BSA) タンパク質標準を、表1に示すようにバイアル中で調製しました。2 mg/mL濃度のBSA溶液1 mLを原液とし、脱イオン水を用いて希釈しました。ブランク溶液の調製に使用したバイアル7には水のみを加えました。

続いて、表1の各標準液0.1 mLと未知の溶液を、個別にラベル付けしたキュベットにピペットで入れました。作業試薬2.0 mLを各キュベットに添加して溶液を十分に混合し、室温で2時間反応させた後、分光分析を行いました。水浴を用いて試料を37°Cでインキュベートする場合、反応時間を30分に短縮することができます。

BCA法は真のエンドポイント法ではないため、サンプル間の一貫性を確保するためには、すべてのサンプルを短時間 (<10分) で分析することが重要です。8セルチェンジャーアクセサリは、サンプル分析間の時間ギャップを短縮できるため、シングルセルでの測定よりも、このアプリケーションに適しています。

標準試料および未知試料を、BioMate160分光光度計タッチスクリーンソフトウェアに含まれるProtein BCAメソッドを使用して分析しました。この方法の実験パラメーターを図2に示します。8セルチェンジャーアクセサリのセットアップ画面を図3に示します。

ブランク溶液をポジション1に、未知試料をポジション8に設置し、すべての試料の562 nmにおける吸光度を測定しました。標準試料 (ポジション2~7) の吸光度値に直線回帰を自動的に適用し、検量線を作成しました (図4)。検量線の相関係数 (r^2) は0.997であり、測定濃度範囲で高い直線性を示しました。標準および未知物質の吸光度データを表2に示します。確立された検量線を使用し、未知試料の濃度は1.252 mg/mLと決定されました。

表2. タンパク質標準試料および未知試料の吸光度データ

サンプル	濃度 (mg/mL)	吸光度
標準1	0.025	0.026
標準2	0.250	0.314
標準3	0.500	0.593
標準4	1.000	1.080
標準5	1.500	1.569
標準6	2.000	1.983
不明	1.252	1.295

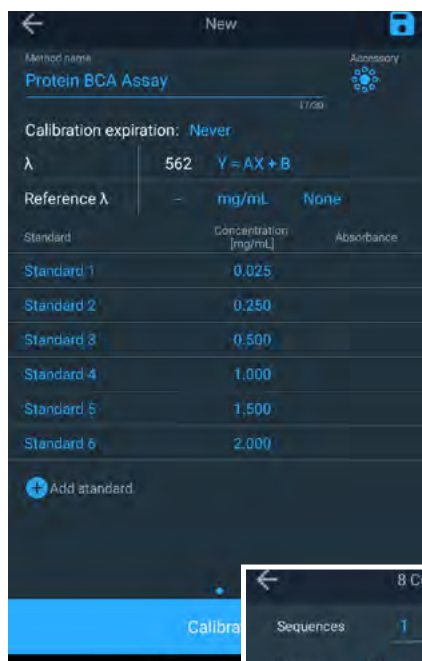


図2. タンパク質BCAメソッド設定

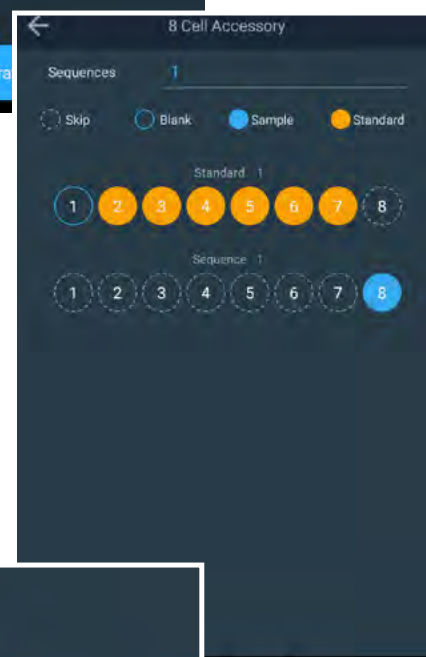


図3. 8セルチェンジャーアクセサリ設定

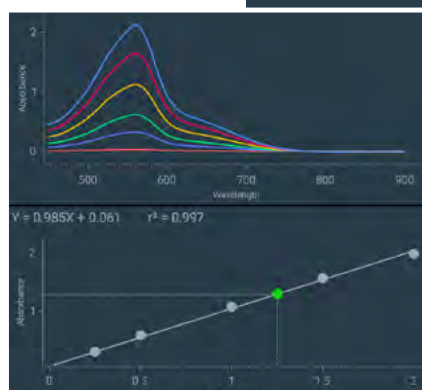


図4. タンパク質標準品のスペクトルおよびその結果の検量線。未知試料は緑色の点で表示。標準物質のスペクトルは、スキャン法を用いて別々に測定し、グラフ化しました。

結論

BioMate160紫外可視分光光度計および8セルチェンジャーを使用し、BCA タンパク質アッセイを用いて未知のタンパク質試料の濃度を測定しました。BCA法は、タンパク質濃度を測定するためにもっとも広く使用されているアッセイの一つです。これは、直線性の範囲が広く、他の方法よりもタンパク質間のばらつきが少ない高感度な方法です。BioMate160紫外可視分光光度計ソフトウェアにインストールされているProtein BCAメソッドと、8セルチェンジャーアクセサリを組み合わせることで、未知試料のタンパク質濃度を簡単に測定することができます。

検量線は自動的に作成され、未知のタンパク質濃度が直ちに計算されます。

参考文献

1. Smith, P.K., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
2. Wiechelman, K., et al. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* **175**: 231-7.

詳細はこちら thermofisher.com/biomate160

© 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転載を禁じます。 UV027-A2008OB
ここに記載の会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
また、記載されている製品は研究用機器であり、診断目的およびその手続き上での使用はできません。
記載の価格は 2020 年 8 月現在のメーカー希望小売価格です。消費税は含まれておりません。
価格、製品の仕様・外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
実際の販売価格は、当社販売代理店までお問い合わせください。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC