

第3章 タンパク質の分析

第1節 生体材料におけるタンパク質定量

1.1 タンパク質定量法

【目的】 生体材料に含まれるタンパク質の総量を決定することは意外に難しく、昔から種々の方法が考案されたが、それぞれ一長一短の特徴があった。ここでは、最も簡便で鋭敏な色素結合法による定量操作を行う。

【試薬】 ウシ血清アルブミン (BSA; 100 μ g/ml), 色素液 (Bio-Rad Protein Assay), 70%エタノール, 蒸留水。

【器具】 分光光度計 (島津 UV-1200V), キュベット, ピペットマン (P-1000, P-200, P-20), チップ, エッペンドルフチューブ, キムワイブ。

【種々のタンパク質定量法】 生体試料におけるタンパク質を一括して定量するために、種々の方法が考案されている。以下に代表的なものを示す。

名称	原理	特徴
分離秤量法	タンパク質成分を単離・乾燥して秤量。	基本的だが労力と時間がかかる。
Kjeldahl 法	硫酸と加熱し、NをNH ₃ として定量。	タンパク質の単離に労力がかかる。
ビウレット法	Cu ²⁺ ・ポリペプチド錯塩の呈色を定量。	原理的に優れているが、感度鈍い。
Lowry 法	芳香族アミノ酸の発色 + ビウレット法。	簡単で感度よいが、妨害物質多い。
BCA法	ビウレット反応で生じたCu ⁺ と錯体形成。	感度よいが還元物質で妨害される。
UV法	チロシン・トリプトファン吸光測定。	試料回収可。感度鈍く妨害物質多い。
色素結合法 (Bradford 法)	色素・タンパク質複合体の色調変化測定。	簡単で感度よく、妨害物質少ない。 タンパク質の種類による偏りがある。

Bradford 法においては Coomassie Brilliant Blue G-250 (図) がタンパク質のアルギニン, チロシン, トリプトファン, ヒスチジンなどと結合 (静電結合およびファンデルワールス結合) するときの色調変化を利用する。従って, アミノ酸組成が著しく片寄ったタンパク質を定量するときには

誤差が生じる。

【安全上の注意】 色素液は酸性であるので、目に入れたり衣服に着けないように注意。手に着いたときは直ちに水道水で洗うこと。

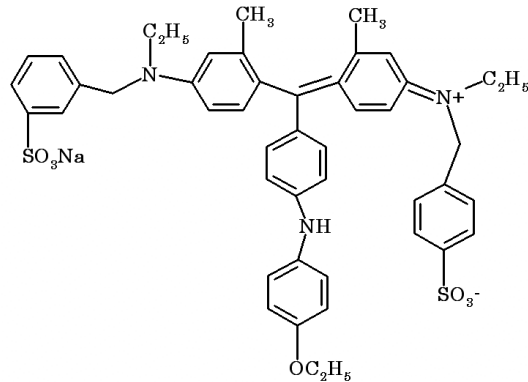


図 CBB G-250 の化学構造

【実験】 (色素結合法の原理； Bradford, 1976)

- 1) エッペンドルフチューブ 5本を用意し、1本には蒸留水 800 μ l を入れ、その他には水を 770, 740, 710, 680 μ l 入れたあと、200 μ l ずつ色素液を分注する。各々のチューブにウシ血清アルブミン (BSA; 100 μ g/ml) を 0, 30, 60, 90, 120 μ l 加えて全容 1ml とし、倒立・攪拌する。キュベットに各試料 (試料 1~5) を移し、測定まで少なくとも 5 分間放置。
- 2) 分光光度計を用い、700nm~400nm の範囲において色素液のみ (試料 1) の吸収曲線 (background; blank) を描かせる。その後 12 μ g BSA・色素混合物 (試料 5) の吸収曲線をも描かせ、最大吸収が 465nm 付近から 595nm 付近に移ったことを確認する。
- 3) 595nm における吸収の増加はタンパク質の量にほぼ比例する。

1.2 タンパク質の検量線

【実験】 (タンパク質検量線作成)

- 1) 分光光度計を用い、試料 1 から 5 までの 595nm における吸光度を順次測定する。
- 2) データに基づき、各人検量線を作成する。なお、横軸にはキュベットの中にあるタンパク質の総量 (μ g)、縦軸には A_{595} (バックグラウンドを差し引いた値) をとる。おおむね原点を通る直線が描けるはずである。
- 3) 試料を捨て、キュベットをすすいでおく。
- 4) 以降の実験においては、この検量線に基づいて試料のタンパク質濃度を求める。

※色素が沈着したキュベットのすすぎかた：

- (I) 中味を捨て、エタノールですすぐ。
- (II) 水道水ですすぐ。
- (III) 蒸留水ですすぐ。
- (IV) キムワイプの上に立てかけて、自然乾燥。