

タンパク質濃度の測定

はじめに

生体物質には多くのものがありますが、遺伝子の本体である核酸と共に、生体内の化学反応を進める触媒として、生物の体内でタンパク質は重要な役割を担っています。

今回は、そのタンパク質の濃度の測定方法の1つを実際に体験してみます。

A. 原理

今回は、色素結合法の一種のブラッドフォード法を用いてタンパク質の濃度を測定します。

この測定法は、ある種の色素はタンパク質と結合すると、その色調が変化するという現象を利用したものです。今回は、CBB（クマシーブリリアントブルー）G-250 という色素がタンパク質と結合すると、赤紫色から青に変色することを利用してタンパク質の濃度を測定します。この時に、溶液中に含まれるタンパク質が多いほど濃い青になるため、その色の濃さを分光光度計で測定することで、タンパク質の定量を行います。

またタンパク質の濃度の定量を行う時には、濃度があらかじめ分かっているタンパク質の溶液の吸光度を測定し、その吸光度の値から検量線を作り、それを用いて未知試料の吸光度の値から、試料中のタンパク質濃度を求めます。標準タンパク質としては、BSA (Bovine serum albumin、牛血清アルブミン)などが良く用いられます。

B. 実験手順

ブラッドフォード試薬は作製に時間がかかるため、あらかじめ作製した試薬を使って実験を行います。

(1)BSA 標準液の作製方法

(1-1)牛血清アルブミン粉末を取り出します。

(1-2)指示された量の蒸留水を、粉末の入った容器に加えます。

(1-3)良く攪拌し、溶け残りが無いようにします。BSA 濃度が 0.4 mg/ml の水溶液ができるはずですが。

(2)検量線の作成

(2-1) BSA の 0.4 mg/ml 溶液を用意します。

(2-2)下の表に従い、濃度既知試料を作ります。溶液の分注はピペットマンという微量溶液を扱える器具を使って行います。以下の溶液を小型試験管に加えます。

No		1	2	3	4	5	6
BSA 溶液 (μ l)		0	6	12	18	24	30
H ₂ O (μ l)	120	114	108	102	96	90	

(2-3)分光光度計のスイッチを入れておきます。次に上の試験管の各々に、ブラッドフォード試薬を 3 ml ずつ加え、vortex という攪拌器で攪拌します。

(2-4)すると直ちに色が変わるので、分光光度計の波長を 595 nm に合わせ、セルに溶液を全て入れ、1 時間以内に吸光度を測定します。

(2-5)吸光度を測定し終わったら、各試験管の中のタンパク質濃度を横軸、その吸光度を縦軸にしてグラフを書き、検量線を描きます。

(3)未知試料中のタンパク質濃度の測定

(3-1)卵白等を適当に蒸留水で希釈し、未知試料の水溶液を用意します。ただし、もとの溶液を薄めた倍率は記録しておきます。

(3-2)下の表に従い、溶液を試験管に分注します。分注はピペットマンを使って行います。

No		1	2	3	4	5
未知試料水溶液 (μ l)		0	1	12	40	120
H ₂ O (μ l)	120	119	108	80	0	

(3-3)分光光度計のスイッチを入れておきます。次に上の試験管の各々に、ブラッドフォード試薬を 3 ml ずつ加え、vortex で攪拌します。

(3-4)BSA の時と同様に色が変わるので、分光光度計の波長を 595 nm に合わせ、セルに溶液を全て入れ、1 時間以内に吸光度を測定します。

(3-5)吸光度を測定し終わったら、各試験管の吸光度を、先に作成した検量線と照らし合わせ、タンパク質濃度を推定します。

(3-6)もしも、未知試料中のタンパク質濃度が、濃すぎたり薄すぎたりした場合は、未知試料の吸光度が検量線の範囲を超えてしまいます。その場合は、最初の溶液の希釈率を変えて、再び測定を行います。

参考

○ブラッドフォード試薬作製方法

(1)クマシーブリリアントブルー G-250: 100 mg を 95 % エタノール: 50 ml に溶解します。溶けにくいので、マグネチックスターラーで攪拌します。その際、蒸発としぶきが飛び散るのを防止する為、ラップを被せておきます。

(2)色素が溶けたら、85 % (w/v)のリン酸: 100 ml を加え、攪拌します。

(3)更に水を加え 1 l にして、1 時間位攪拌します。

(4)No.2 のろ紙(普通のもの)で、試薬をろ過します。

(5)1 日静置してから使用します。もし、試薬の色が赤茶色ではなく青だったら、作製に失敗しているので、作り直します。

○ブラッドフォード法の特徴

ブラッドフォード法に使われる色素のクマシーブリリアントブルーは、酸性条件でアルブミン等の球状タンパク質と結合し、色調が赤紫から青に変化します。この変色は、タンパク質のアルギニンやリジン残基と色素のスルホン酸基の結合、及び非極性アミノ酸とトリフェニルメチル基の結合に基づいています。この為、タンパク質のアミノ酸組成により呈色強度が大きく変わります。

(1)ブラッドフォード法には以下の長所があります。

1)発色法の中で、最も高感度な方法です。

2)還元物質の存在下で使用できます。

3)操作は、タンパク質溶液を色素溶液と混合し、5 分室温で放置するだけで測定可能になる為、非常に簡便です。

4)発色が安定で、時間経過による吸光度変化が少なく、試料数が多い場合でも測定までの反応時間を厳密にそろえる必要はありません。

(2)一方、以下の短所もあります。

1)界面活性剤が強く発色する為、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事実上不可能になります。

2)DNA や RNA などの核酸も発色するので、あらかじめ除いておく必要があります。

3)タンパク質の種類による発色強度のばらつきが大きい性質があります。よく使われる標準物質である牛血清アルブミン(BSA)の発色強度を 1 とすると、ウマミオグロビンは 1.19、ウマシトクロム c は 1.07、ウシγグロブリンは 0.56、ウシキモトリプシノーゲンは 0.48、ウサギ IgG は 0.37、卵白アルブミンは 0.32 となります。

4)酸性条件で反応させる為、脂質などの不純物が沈澱することがあります。

5)あまり長時間おくと、色素・タンパク質複合体が沈澱してしまいます。

(3)この測定法の妨害物質としては、ほとんどの界面活性剤、DNA (0.1%以上)があります。