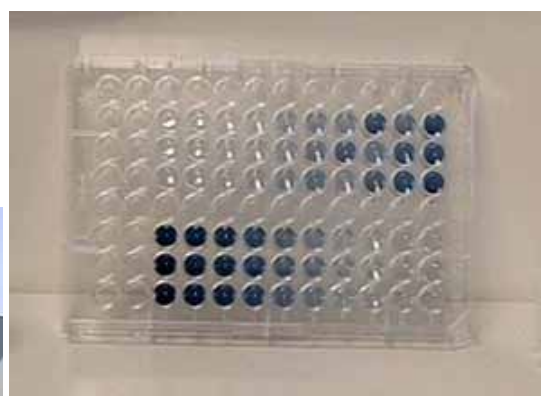


インジェクターを備えた Infinite™ 200 によるタンパク質定量

Modified Lowry Protein Assay



はじめに

タンパク質サンプルに対して、単離、クロマトグラフ分析、電気泳動分析、機能分析、免疫組織化学分析を実施する前に、タンパク質定量が必要であることが多い。

一般目的用タンパク質定量法にはふたつの方法がある。タンパク質色素結合法 (Coomassie®) とタンパク質銅キレート法である。

Modified Lowry Protein Assay は、銅キレート法を強化したものであり、Oliver Lowry 法 [1] のオリジナルプロトコルを基にしているが、安定性が増して利便性が高くなっている。この定量法の第 1 段階で、アルカリ溶液中で四座配位タンパク質銅錯体を形成する。第 2 段階では、この錯体が、添加したフォリン - チオカルト試薬を還元する。この反応生成物は青色の水溶性であり、650 ~ 750 nm で測定することができる (図 1 参照) 。

ほかのタンパク質定量法と同じく、Modified Lowry Protein Assay では、サンプルのタンパク質濃度を測定するにあたって、その都度標準曲線を作成する必要がある。BSA を用いた標準曲線のタンパク質濃度範囲は 1 ~ 1500 µg/ml である。

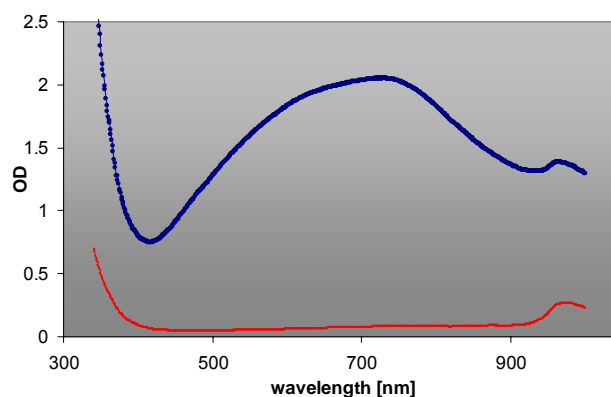


図 1: BSA あり (—) および BSA なし (—) での Infinite M200 を用いた Modified Lowry Protein Assay 反応液の 300 ~ 1000 nm の吸光スペクトル

Modified Lowry Protein Assay は、タンパク質サンプルが少量の場合や多数のサンプルを測定する場合に、マイクロタイタープレートを用いて実施することも可能である。

タンパク質濃度を正確に測定しようとするれば、Modified Lowry Protein Assay では、正確なピペット操作のほかに、フォリン - チオカルト試薬の添加、混合、放置、読み取りを正確なタイミングで実施する必要がある。この定量法を手作業で実施しようとする、上の理由によりサンプルの数が制限される。

本稿では、Infinite 200 シリーズと Tecan Infinite インジェクターシステムが、Modified Lowry Protein Assay をどのように自動的に実施するのかを明らかにする。

Tecan Infinite インジェクターを使用すると、2 種類の試薬（Modified Lowry 試薬およびフォリン - チオカルト試薬）の分注、試薬の混合、放置、吸光測定をすべて 1 回の機器設定で実施することができる。

材料と方法

機器

- インジェクターを備えた Infinite F200 フィルター方式検出システム（Tecan、オーストリア）
- インジェクターを備えた Infinite M200 Quad4 Monochromator™ 検出システム（Tecan、オーストリア）

マイクロプレート

- 平底透明 96 ウェルマイクロプレート（Corning、ドイツ）

試薬と測定法

試薬

- Modified Lowry Protein Assay キット（Pierce、ドイツ）。キット内容は、Modified Lowry Protein Assay 試薬、2 N フォリン - チオカルト試薬、ウシ血清アルブミン（BSA）標準液（2 mg/ml）である。
- 超純水

試薬調製

Modified Lowry Protein Assay

購入した 2 N フォリン - チオカルト試薬を超純水で 1 : 1 に希釈し、24 時間以内に使用する。

標準曲線用 BSA 希釈系列

BSA（2 mg/ml）を用いて、標準曲線用希釈系列を作成した（表 3）。

パイアル	H ₂ O 量 (μl)	BSA 量 (μl)	BSA 濃度 (μg/ml)
A	250	原液 750	1500
B	625	原液 625	1000
C	310	A310	750
D	625	B625	500
E	625	D625	250
F	625	E625	125
G	800	F200	25
H	800	G200	5
I	800	H 200	1
J	1000	0	0

表 1： Modified Lowry Protein Assay のために調製した BSA 標準液系列

Plate definition file

96 ウェルマイクロプレートのひとつのウェルの有効容積は一般に 200 μl である。Modified Lowry Protein Assay を適用するにあたって、プレート定義ファイルの有効容積を 260 μl とする必要がある。

プレート定義は、i-control™ソフトウェアで簡単に設定することができる。メニューバーの *Setting* を、続いて *Plate definition* を選択する。平底透明 96 ウェルプレートを選び、このプレートに新規名称をつける。次に、*Well geometry* をクリックして有効容積を 260 μl に変更し、ok をクリックする。

Modified Lowry Protein Assay のスクリプト

下記のステップに従い、内蔵されている i-control ソフトウェアを用いてスクリプトを作成する。

ステップ	インジェクターを備えた F200 および M200 のスクリプト	
1	Plate Definition	[COS96ft]-Corning 96 flat transparent - PLATE DEFINITION - Volume!
2	Part of Plate	Select rows
3	Dispense	Injector A, Refill for every dispense 200 μl Speed 200 μl/sec, refill speed 100 μl/sec
4	Shaking	30 sec, amplitude 2 min, orbital
5	Wait	10 min
6	Dispense	Injector B 20 μl Speed 200 μl/sec, refill mode standard
7	Shaking	30 sec, amplitude 1 mm
8	Wait	30 min
9	Absorbance	750 nm, number of reads 25
10	Move Plate	out

測定設定

Infinite F200	
パラメータ	設定
モード	吸光度
波長	750 nm
半値幅	10 nm
Number of flashes	25

Infinite M200	
パラメータ	設定
モード	吸光度
波長	750 nm
半値幅	9 nm
Number of flashes	25

表 2: Infinite F200 および M200 での吸光度測定の設定

アッセイの詳細

測定開始前にインジェクターを洗浄し、2種類の試薬を満たす。測定をすべて終わるまでに必要な合計容積に応じて、インジェクターのフラスコのひとつに Modified Lowry 試薬を入れ、インジェクターAに置く。もうひとつのフラスコに、1×フォリン - チオカルト試薬を入れ、インジェクターBに置く。使用説明書の記載の通りに、ふたつのインジェクターを装填する。

BSA 標準曲線用希釈液それぞれ 40 µl と、分析したい各種サンプル 40 µl を、マイクロプレートのしかるべきウェルに、手作業によるピペット操作で注入する。

プレートを Infinite リーダーに置き、定量を実施するスクリプトを実行して、吸光を測定する。次の分析のため、i-control ソフトウェアが自動的にデータを Excel[®]に転送する。

インジェクターの性能を保つため、使用説明書の記載に従って、使用後にインジェクターを洗浄することが推奨されている。

結果

ともにインジェクターを備えた Infinite F200 および Infinite M200 を用いて、Modified Lowry Protein Assay を実施した。BSA 標準液をピペットで 3 回繰り返して分注し、上に記載したスクリプトを用いて分析を実施した。750 nm で測定した吸光度は、タンパク質の量に正比例するはずである。モノクロメーター方式の Infinite M200 もフィルター方式の Infinite F200 も、同じ色応答曲線を示した。これまでに文献に報告されており、このグラフからわかるように、色応答曲線は直線ではない。

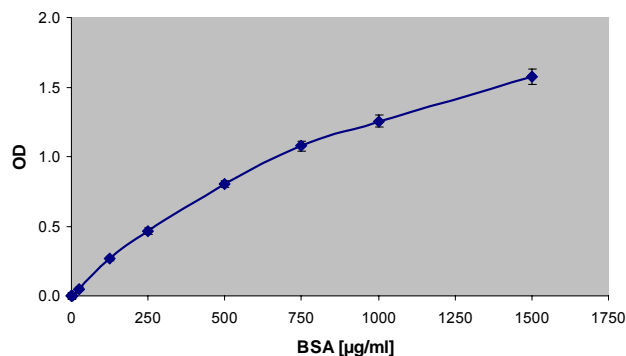


図 2: Modified Lowry Protein Assay による Infinite F200 を用いた BSA 0 ~ 1500 µg/ml の吸光度測定値

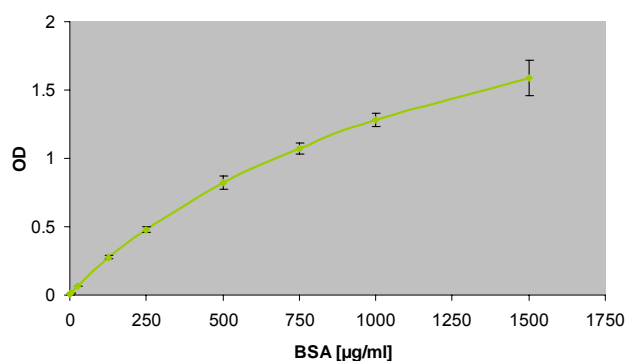


図 3: Modified Lowry Protein Assay による Infinite M200 を用いた BSA 0 ~ 1500 µg/ml の吸光度測定値

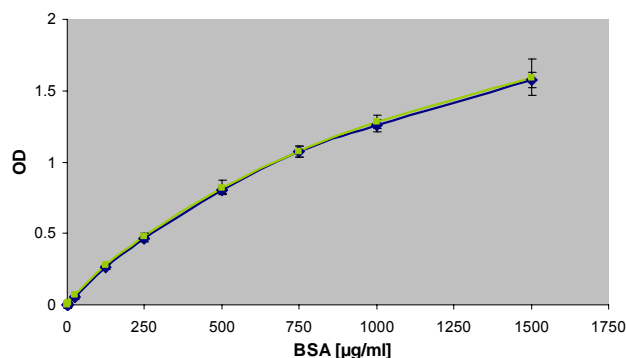


図 4: Infinite F200 および Infinite M200 を用いたタンパク質色反応曲線の比較。緑色の曲線は Infinite M200 による OD 測定値を、青色の曲線は Infinite F200 による OD 測定値を示す。

考 察

現在利用しているタンパク質定量法は多数あり、それぞれ注目するところは異なっている。迅速、低コストなものもあれば、妨害物質に反応しないとするもの、感度が高いものもある。Modified Lowry Protein Assay は、タンパク質定量法のなかで最も多く引用されている Lowry の方法を基にしたものである。

再現性の高いデータを得るには、時間条件を正確に保つ必要があるが、このことは、手作業で扱えるサンプル数が 20 ほどであるという制約から、ますます難しいものになっている。インジェクターを備えた Infinite 200 シリーズのような自動化システムを用いれば、この問題を容易に回避することができる。分注、混合、放置、測定を、マイクロプレートを用いて 96 サンプルまでを 1 回の機器設定で簡単に処理することができる。どのステップも、i-control ソフトウェアを用いて簡単にプログラムすることができ、掘り下げたデータ分析や計算、表示には Tecan Magellan™ ソフトウェアが最適である。

1 ないし 2 種類の試薬をサンプルに添加する分析法であれば、事実上、どのようなものでも、このインジェクターシステムを用いて実施可能である。さらに、振盪時間および放置時間がプログラム可能であり、シェーカーからインキュベーター、最終的にはリーダーまで、手作業でプレートを移動することなく、自動で実施することができる。これにより、貴重な作業時間を節約することができ、仕事量も減ることになる。

Tecan Group Ltd. は、本稿に正確かつ最新の情報を記載するよう努力していますが、遺漏や誤りがないとは限りません。このため、本稿にある情報の正確性、完全性について、Tecan Group Ltd. は明示的であれ黙示的であれ、一切の言明も保証も致しません。本稿を、随時、予告なく変更することがあります。このなかで言及した商標はいずれも、法律により保護されています。本稿に記載されている仕様の技術的詳細および操作の詳細については、最寄の Tecan 販売店に御連絡ください。本稿は、市場によっては入手できない製品について記載することがあります。最寄の販売店に御確認ください。

© 2007, Tecan Trading AG, スイス、著作権所有。Tecan は、主要諸国で、スイス、Männedorf の Tecan Group Ltd. の登録商標です。Infinite、Quad4 Monochromators、i-control、Magellan は、スイス、Männedorf の Tecan Group Ltd. の商標です。

Excel は、Microsoft Corporation の登録商標です。Coomassie は、Imperial Chemical Industries の登録商標です。

Austria T +43 62 46 89 33 Belgium T +32 15 42 13 19 China T +86 10 5869 5936 Denmark +45 70 23 44 50
 France +33 4 72 76 04 80 Germany +49 79 51 94 170 Italy +39 02 215 21 28 Japan +81 44 556 73 11
 Netherlands +31 18 34 48 174 Portugal +351 21 000 82 16 Singapore +65 644 41 886 Spain +34 93 490 01 74
 Sweden +46 31 75 44 000 Switzerland +41 44 922 89 22 UK +44 118 9300 300 USA +1 919 361 5200
 ROW +43 62 46 89 33

www.tecan.com

結 論

一般にタンパク質定量では、Modified Lowry Protein Assay であればなおさら、リーダー - インジェクターシステムが理想的な解決法となる。これにより、ピペット誤操作や作業の間違いを回避することができ、一貫性や追跡性の高いデータが得られる。

インジェクターを備えた Tecan Infinite 200 シリーズを用いれば、試薬の分注から混合、インキュベーション、測定までを、1 回の設定で全段階を実施する多機能システムを構築することができる。

略語の一覧

BSA ウシ血清アルブミン

OD 吸光度

参考文献

[1] Lowry *et al.*: Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*, 193, 265 – 275, 1951

