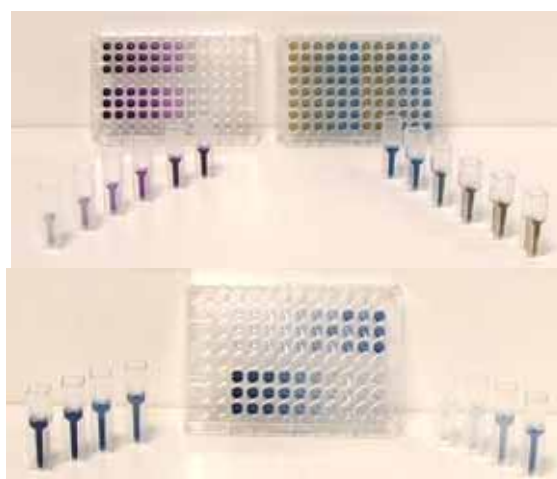


BCA™、Modified Lowry Assay および Bradford Assay によるタンパク質定量

Infinite™ F200 および Infinite™ M200 による吸光度測定



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、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。一般に、比色検出によるタンパク質定量法にはよく2種類の方法が用いられる。タンパク質色素結合法とタンパク質銅キレート法である。本稿では、Tecan 製 Infinite F200 および Infinite M200 を用いた場合に、数種の吸光度法(表1参照)によるタンパク質定量を簡単かつ高感度を実施できることを報告する。

BCA™ Protein Assay

BCA™ Protein Assay は、ピシンコニン酸 (BCA) を用いて、サンプル中の総タンパク質量を比色定量するものである [1]。この方法は、アルカリ溶液中で、タンパク質が Cu^{2+} を Cu^{1+} に還元することに基づいている。 Cu^{1+} は BCA と錯体を形成し、有色の水溶性キレートを生じる。このキレートを最大吸収 562 nm で測定することができる (図1参照)。2 ml の試験管を用いた場合、タンパク質濃度 20 ~ 2,000 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性が得られる。さらに少量でタンパク質を定量する場合は、検出範囲は 125 ~ 2,000 $\mu\text{g/ml}$ となる。

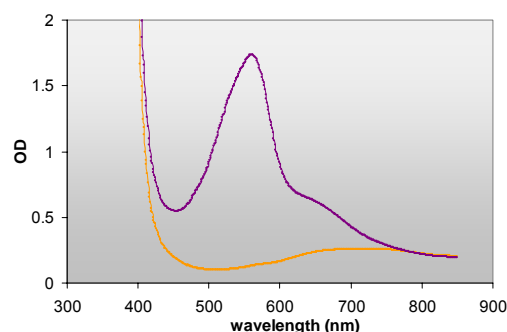


図1: BSA あり (—) および BSA なし (—) での Infinite M200 を用いた BCA の吸光スペクトル (300 ~ 900 nm)

界面活性剤を含むタンパク質サンプルの場合、BCA Protein Assay が最適の方法であると思われる。

Modified Lowry Protein Assay

Modified Lowry Protein Assay は、Oliver Lowry 法 [2] のオリジナルプロトコールを基にしているが、改良され、安定性に優れている。タンパク質は、アルカリ溶液中で硫酸銅および酒石酸塩と反応して、四座配位銅タンパク質錯体を形成し、フォルリン - チオカルト試薬を還元する。この青色の水溶性生成物は、750 nm で測定することができる (図2参照)。タンパク質検出で直線性が認められるのは 1 ~ 1,500 $\mu\text{g/ml}$ の範囲である。

Modified Lowry Protein Assay は少量でも実施可能であり、マイクロプレートでタンパク質プローブを測定することができる。

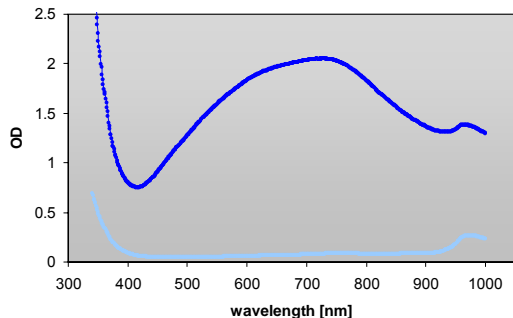


図 2： BSA あり (—) および BSA なし (—) での Infinite M200 を用いた Modified Lowry Protein Assay 試薬の吸光スペクトル (300 ~ 1,000 nm)

BioRad Protein (Bradford) Assay

本稿で用いた BioRad Protein Assay は、Bradford [3] が開発した方法に基づく色素結合法である。色素である Coomassie® プリリアントブルー-G-250 は、アルギニンを始めとする塩基性アミノ酸残基や芳香族アミノ酸残基に結合する。これにより、色素の最大吸収波長が 465 nm から 595 nm に移動する (図 3 参照)。タンパク質濃度の算出には典型的な標準曲線が必要であり、BSA を用いた場合には 20 ~ 140 µg/ml の範囲であることが多い。

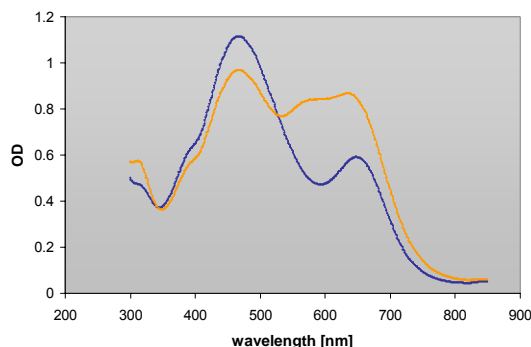


図 3： BSA あり (—) および BSA なし (—) での Infinite M200 を用いた BioRad Protein Assay 試薬の吸光スペクトル (300 ~ 900 nm)

Bradford アッセイは、直線性が得られる 1.2 ~ 10 µg/ml の範囲で、マイクロアッセイを実施することができる。このマイクロアッセイ法は、マイクロタイタープレートでの少量の測定に最適である。

定量法	最大吸収波長 (nm)	色	直線性 (µg/ml BSA)
BCA	562	紫	25 ~ 2000
Lowry	750	青	1 ~ 1500
Bradford	595	青	1.2 ~ 10
Bradford	595	青	8 ~ 80

表 1： 3 種類のタンパク質定量法のまとめ。最大吸収波長、反応した試薬の色、直線範囲がそれぞれ異なることを示す。未知のタンパク質濃度を計算するには、試験の都度、標準曲線を作成する必要がある。

材料と方法

機器

- Infinite F200 フィルター方式検出システム (Tecan Austria, オーストリア)
- Infinite M200 Quad4 Monochromator™ 検出システム (Tecan Austria, オーストリア)

マイクロプレート

- 平底型透明 96 ウェルマイクロプレート (Greiner BioOne, ドイツ)
- UV マイクロキュベット (Brand, ドイツ)

試薬と測定法

試薬

- BCA Protein Assay (Pierce、イリノイ州)。キット内容は、BCA 試薬 A、BCA 試薬 B、BSA タンパク質標準液 (2 mg/ml) である。
- Modified Lowry Protein Assay (Pierce、イリノイ州)。キット内容は、Modified Lowry Protein Reagent、2 N フォリン - チオカルト試薬、BSA タンパク質標準液 (2 mg/ml) である。
- BioRad Protein Assay (Bio-Rad、カリフォルニア州)。キット内容は、タンパク質定量色素試薬濃縮液、凍結乾燥 BSA タンパク質標準である。

アッセイプロトコール

使用液、タンパク質標準液などはすべて、製造業者の使用説明書に記載されている通りに調製した。

BCA Protein Assay

BCA Protein Assay には 2 種類の方法が記載されている。一方はキュベット用でもう一方がマイクロプレート用である。稼働範囲はいずれも 20 ~ 2,000 µg/ml である。

マイクロプレート用プロトコールでは、サンプル 25 µl を BCA 使用液 200 µl と混合する。キュベット用プロトコールでは、サンプル 100 µl を BCA 使用液 2 ml と混合する。キュベットを使用する場合、BCA 使用液 1 ml と混合するのに、サンプル 50 µl で十分である。

キュベットを用いた方法でもマイクロプレートを用いた方法でも、37 で 30 分間、サンプルをインキュベートし、吸光度測定の前に室温まで冷却する（表 2 参照）。

Infinite F200 (マイクロプレート)	
パラメータ	設定
モード	吸光度
波長	562 nm
半値幅	10 nm
Number of flashes	25
Infinite M200 (マイクロプレート、キュベット)	
モード	吸光度
波長	562 nm
半値幅	9 nm
Number of flashes	25

表 2 : Infinite F200 および Infinite M200 を用いた BCA Protein Assay の測定パラメータと設定

Modified Lowry Protein Assay

Modified Lowry Protein Assay は、2 種類の方法で実施することができる。一方はタンパク質サンプルの量が大容量時に適しているキュベット用プロトコルである。もう一方は、少量の未知のタンパク質を対象とする場合に適しているマイクロプレート用のプロトコルである。両方法とも、定量範囲はほぼ 1 ~ 1,500 µg protein/ml である。この定量法には、正確なピペット操作を正確なタイミングで実施する必要がある。このため、マルチチャンネルピペッターが適している。

マイクロプレートを用いた方法では、サンプル 40 µl を Modified Lowry Reagent 200 µl と混合する。プレートを直ちに正確に 30 秒間振盪し、室温で 10 分間放置する。フォリン - チオカルト試薬 (20 µl) を加えて、プレートをさらに 30 秒間振盪した後、室温で 30 分間放置する。このあと、750 nm で吸光度を測定する。

キュベットを用いた方法では、サンプル 200 µl をピペットにとってキュベットに入れ、15 秒後に Modified Lowry Reagent 1 ml を加える。各キュベットのウェルを混和し、10 分間放置する。このあと、フォリン - チオカルト試薬 100 µl を、上の記載と同じタイミングで加える。キュベットを混和した後、室温で 30 分間放置する。このあと、750 nm で吸光度を測定する（表 3 参照）。

Infinite F200 (マイクロプレート)	
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 (マイクロプレート、キュベット)	
モード	吸光度
波長	750 nm
半値幅	9 nm
Number of flashes	25

表 3 : Infinite F200 および Infinite M200 を用いた Modified Lowry Protein Assay の測定パラメータと設定

BioRad Protein (Bradford) Assay

色素試薬やサンプルの量は、プロトコルによりさまざまであり、製造業者の使用説明書に基づいて決定する。一般に、標準サンプルおよび未知のタンパク質サンプルをウェルないしキュベットに分注し、しかるべき量の色素試薬を加えたあと、室温で 5 分間放置する。およそ 595 nm で、サンプルの吸光度を測定する（表 4 参照）。

Infinite F200 (マイクロプレート)	
パラメータ	設定
モード	吸光度
波長	590 nm
半値幅	10 nm
Number of flashes	25
Infinite M200 (マイクロプレート、キュベット)	
モード	吸光度
波長	595 nm
半値幅	9 nm
Number of flashes	25

表 4 : Infinite F200 および Infinite M200 を用いた BioRad Protein (Bradford) Assay の測定パラメータと設定

結果

BCA Protein Assay

Infinite F200 および Infinite M200 を測定に用いて、BCA Protein Assay を、96 ウェルマイクロプレートで、標準法にて実施することができた（図 4）。

タンパク質検出の感度を求めたところ、Infinite 200 シリーズでは約 10 µg/ml であった。この方法のオリジナルプロトコルを、さらにキュベットを使用して実施し、Infinite M200 で測定した。

図 4 でマイクロプレートとキュベットとの測定結果を示す。キュベットを用いてもマイクロプレートを用いても、信頼性の高いほぼ同じ結果が得られた。

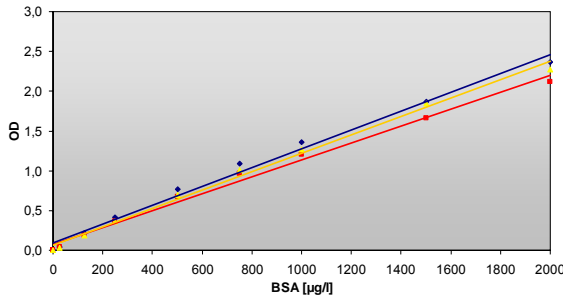


図 4： キュベットで Infinite M200 を用いた BCA Protein Assay 測定値 (—△)、96 ウェルマイクロプレートで Infinite F200 (—■) および Infinite M200 (—●) を用いた BCA Protein Assay 測定値。25 ~ 2,000 µg/ml の範囲で直線性を得た。

Modified Lowry Protein Assay

Modified Lowry Protein Assay を、96 ウェルマイクロプレートとキュベットを用いて実施した。マイクロプレートを Infinite M200 と Infinite F200 に用いたところ、ほぼ同じ値を得た。

マイクロプレートを用いた測定とは異なり、キュベットでの測定では、高い吸光度がほとんど認められなかった。これは、キュベットの取り扱いには 96 ウェルプレートより時間がかかり、この間に発色が進んだことが理由として考えられる (図 5 参照)。

Infinite F200 および Infinite M200 を用いた場合の Modified Lowry Protein Assay の感度は、約 2 µg/ml であった (表 5 参照)。

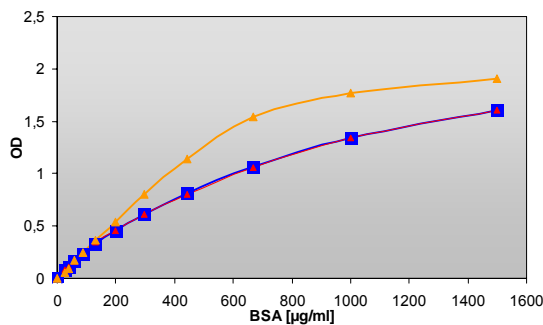


図 5： キュベットで Infinite M200 を用いた Modified Lowry Protein Assay 測定値 (—△)、96 ウェルマイクロプレートで Infinite F200 (—■) および Infinite M200 (—●) を用いた Modified Lowry Protein Assay 測定値。

BioRad Protein (Bradford) Assay

タンパク質濃度が低い場合に、色素/サンプルの比が異なる 2 種類のマイクロアッセイプロトコルを利用できる。

- タンパク質濃度がおよそ 1 ~ 12 µg/ml の場合はキュベット用プロトコル
- タンパク質濃度が 8 ~ 80 µg/ml の場合はマイクロプレート用プロトコル

マイクロプレートおよびキュベットで Bradford マイクロアッセイ法を実施したところ、感度は約 1 µg/ml であった。

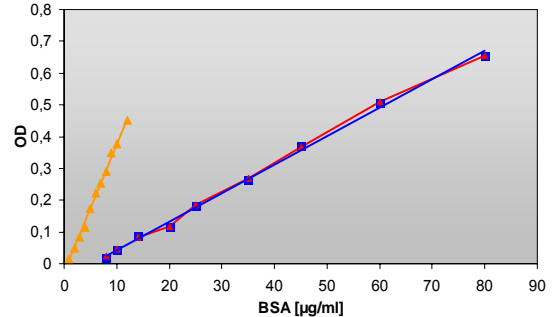


図 6： 96 ウェルマイクロプレートで Infinite F200 (—■) および Infinite M200 (—●) を用いた BioRad Protein (Bradford) マイクロアッセイ測定値、キュベットで Infinite M200 を用いた BioRad Protein (Bradford) マイクロアッセイ測定値 (—△)。

感 度

アッセイ	BCA	Lowry	Bradford
プロトコル [µg/ml]	25 ~ 2,000	26 ~ 1,500	8 ~ 80
感度 [µg/ml]	10	2	1

表 5： Tecan Infinite 200 シリーズを用いて測定した BCA、Modified Lowry Protein Assay、BioRad (Bradford) Protein Assay の感度 [µg protein/ml]。それぞれのプロトコルの直線範囲を、µg/ml の単位で示す。

考 察

Tecan フィルター方式 Infinite F200 および Quad4 モノクロメーター方式 Infinite M200 を用いて、3 種類のタンパク質定量法を比較した。

BCA 法では、キュベットとマイクロプレートに標準法を用いた。ただし、このプロトコルはマイクロプレートには適していないと思われる。いずれの機種も、約 10 µg/ml の濃度でタンパク質を検出することができた。

Modified Lowry Protein Assay は、タンパク質濃度が低い場合に有用であり、各希釈液に一方のプロトコルを用いて、感度 2 µg/ml を得ている。この方法は最も手間がかかり、サンプル数が多いとサンプルの扱いやピペット操作が複雑になる。このため、96 ウェルプレートで Modified Lowry Protein Assay を実施するのに、Infinite 200 インジェクターシステムを使用した。この詳細と機器の設定は、アプリケーションノート「インジェクターを備えた Infinite™200 によるタンパク質量」(#395179)に記載している。

高感度でタンパク質を検出したい場合は、BioRad Protein (Bradford) マイクロアッセイプロトコルを用いることができる。96 ウェルプレートでもキュベットでも測定することができ、標準プロトコルでは、タンパク質濃度 500 µg/ml まで測定可能である。

結 論

タンパク質定量に用いる方法の選択は、タンパク質の量や、サンプルの組成（バッファー、塩類、還元剤、界面活性剤など）、さらにはタンパク質そのものの性質に左右される。機器についてみると、リーダーがキュベットしか読み取ることができないとき、多数のサンプルを測定しようとすると制約が生じる。このような場合、往々にして多量のタンパク質がサンプルとして必要になる。

フレキシビリティが高く、高感度の Tecan Infinite 200 シリーズマイクロプレートリーダーを用いると、このような欠点を克服することができる。これまでに示したように、少量のサンプルにタンパク質がわずかしかない場合も、マイクロプレートを用いて容易に測定することができる（表 5 参照）。さらに、Infinite M200 モノクロメーターリーダーは、キュベットのほか、マイクロプレートのなかのタンパク質サンプルも測定することができる。Infinite M200 はこのほか、吸光スキャンが可能で、未知の物質の最大吸収波長を検出することができる。ここに記載したタンパク質定量法のそれぞれに対して、BSA がある場合とない場合の着色錯体に対する吸光スキャンを実施して、このことを実証した。

略語の一覧

BCA ビシニコニン酸
BSA ウシ血清アルブミン
Cu 銅

参考文献

- [1] Smith, P.K., et al.: Measurement of protein using bicinchoic acid. *Anal Biochem.*, 150, 76-85, 1985
- [2] Lowry, O.H. et al.: Protein measurement with Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951
- [3] Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976

注：ここに掲載されている製品は研究目的にのみ使用することができます。

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 は、スイス、Männedorf の Tecan Group Ltd.の商標です。

BCA は、Pierce Biotechnology, Inc.の商標です。BCA Technology は、U.S.Patent # 4,839,295 により保護されています。Coomassie は、ICI Ltd.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

