

# タンパク定量 (BCA法)

2011/06/24

ここでは、SDS-PAGEを行うときに用いる定量法のBCA法について説明します。

タンパク質の定量法はBradford法など他にもありますが、細胞を界面活性剤でlysateとしてサンプルのタンパク定量をできる方法はそれほどありません。BCA法は、SDSやTriton Xなどの界面活性剤存在下で使える方法ですので、SDS-PAGE前のタンパク定量法として適しています。ただし、SH基を持つdithiothreitolやβ-mercaptoethanolなどの還元剤や、GST融合タンパク質の精製に用いるglutathioneが含まれる場合は用いる事はできません。

BCA法の原理ですが、アルカリ性条件下でペプチド結合がCu(II)をCu(I)に還元する反応(Biuret rxn.)と、Cu(I)とBCA (bicinchoninic acid)の錯体形成(に伴う紫色の着色)という二段階の反応に基づいています。第一段階のBiuret反応でできるCu(I)とペプチドの錯体自体にも吸光はありますが、測定に使うには弱すぎます。なので、二段階目のBCAとの錯体形成反応で562nmに吸収極大を持つより吸光度の高い錯体へと変換しています。上で述べたように、SH基を持つDTTやβMEはBCAと相性が悪い訳ですが、その理由はこれらのSH基がCuへ強く配位する事が原因だと思われます。

なお、Lowry法は、二段階目がBCAではなくリンモリブデン酸/リンタングステン酸であり、これらがCu(I)により還元されて吸光を示す事を利用してしています。

## プロトコル

作業時間は、準備も含めて20-60分くらいで終わります。なお、Reagent AとReagent Bは、254号室ブラツ上上の棚で室温保存しています。

- (1) Reagent A 50 volumeに対し、Reagent Bを1 volume混ぜます(淡い緑色になります)。
- (2) 96wellプレート(クリアー)にtriplicateで、検量線用のBSA(bovine serum albumin)溶液3μLとサンプル3μLを入れておきます。別に2μLとか5μLでも構いませんが、あまり多いと界面活性剤等の許容濃度を超える可能性がありますので自分で許容濃度をチェックしてください。参考に、3μLで行った場合のデータを補足に載せておきます(次ページ)。基本的に吸光で定量を行う場合、吸光度は0.3-0.8の範囲が良いとされています。だいたいその範囲になるようにサンプル量や反応時間を調節してください。
- (3) Reagent ABミックスを100μL/wellで加え、37°Cで10-60分程インキュベートし(プレートインキュベーター)、プレートリーダーで570nmの吸光度(0.1s/well)で測定します。インキュベート時間は、発色具合を見て調節すればOKです。

## SDS-PAGEのサンプル調製の場合

慣れれば分かる事ですが、SDS-PAGEを行うためにマルチウェルプレートに播いた細胞からlysateを作製した場合のおよそのタンパク質濃度が分かっていると便利です。

例えば、12wellプレート(1mL/wellの培地)のほぼconfluentなHEK293を、1% Triton X-100などを含むlysis buffer (100-150μL)でlysateとした場合、タンパク質濃度は1-2μg/μLほどになります。6wellプレートの場合は、200μLでlysateを作ってこの程度の濃度になります。なので、BSA(bovine serum albumin)などで検量線を引く場合には、例えば1, 2, 4μg/μLくらいの範囲で測定を行えば良いということになります。

## Reagent Aのレシピ

sodium bicinchoninate (from Dojindo) [K5]	1.0g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> [K5]	1875mg
sodium tartrate dihydrate [204のA0]	175mg
NaOH [K4]	400mg (5粒くらい)
NaHCO <sub>3</sub> [204東ドラフト下]	950mg

milli Q 100mLに溶かす。

10N NaOHでpHを11.25に調整 (入れる前の段階で10-11くらいなので、125 $\mu$ L程度)。

(濃度はそれほど正確でなくても問題ないので、メスアップはしないプロトコルです)

(コメント)

sodium bicinchoninateは、Dojindo (同仁化学)のものを使います(5gで¥23100)。無色の結晶です。TCIからカリウム塩が同程度の値段で売っていますが、この部屋で使ってみた限りあまり良くないです。理由は、おそらく純度が低いために既に着色している事が大きいと思いますが、バックグラウンドがかなり高いです(Dojindoの試薬を使った場合で吸光度0.1程度に対し、TCIの方は1近い)。なので、新たに購入するときもDojindoのものを注文してください。

Dojindoのsodium bicinchoninateを用いた場合、reagent Aは無色の溶液になります。室温でも1年くらい保存可能です。

## Reagent Bのレシピ

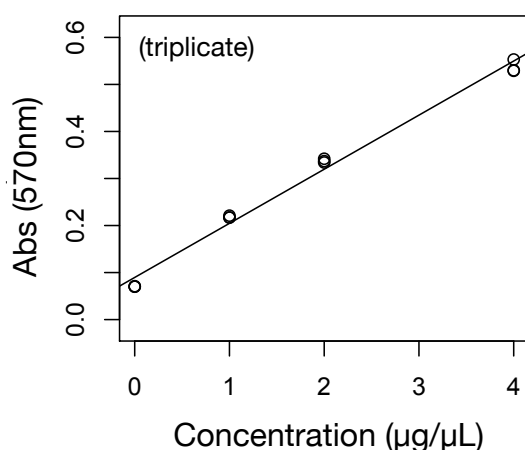
硫酸銅五水和物	400mg
milli Q	10mL

(コメント)

ただの4%硫酸銅水溶液です。わざわざメスアップするほどでもないなので、9.6とか9.8mLに溶かしてください。

薄いブルーの溶液です。Reagent Aと同じく、室温でも1年くらいは安定です。

BSAを用いた検量線



発色具合の例

