

鈴木里沙 後東あかり

ユーザーベネフィット

- ◆ セルを使用せずに試料量1~2 μLからの微量測定が可能です*1。
- ◆ アミノ酸配列からトリプトファン、チロシン、システイン残基数を入力することにより、ソフトウェア上で280 nmにおけるモル吸光係数 (ε 280) を計算することが可能です。
- ◆ 試料を滴下してスタートを押すだけで、測定開始。自動ワイピング機能により簡単に連続測定が可能です。

*1 表面張力の弱い試料では、1~2 μLの試料量で液滴が形成されない場合があります。

■はじめに

タンパク質溶液中には界面活性剤、還元剤、変性剤などの様々な共存物質が含まれており、これらの物質が定量分析に影響を与えることから、試料に適した分析方法の選択が必要となります。

分光光度法を用いた総タンパク質の最も簡便な定量法に、紫外線吸収法 (OD280 nm法、OD: Optical Density/光学濃度) があります。この手法は、タンパク質中に存在する芳香族アミノ酸の280 nmにおける紫外吸収を利用しており、前処理が不要で分析操作も簡便です。ただし、タンパク質の種類に応じて同濃度でも吸光度が異なること、また、核酸など同じ波長域に光吸収をもつ共存物質が存在する場合には、定量が阻害されます。一方、タンパク質間で発色率の差が小さい定量法の一つにBCA法 (BCA: Bicinchoninic Acid) があります。これはタンパク質存在下で生じるCu(II)イオンがピシニコニン酸と配位結合して紫色にする原理を利用しており、広い濃度範囲で高感度であることが知られています。

このようにタンパク質の定量方法は様々ですが、バイオ医薬品製造などにおいては、上記をさらに微量かつ簡便に測定できることが求められています。本稿では、最小1~2 μLの試料量で測定可能なライフサイエンス分光光度計BioSpec-nanoを用い、OD280 nm法とBCA法の2種類の方法で免疫グロブリン (IgG) を定量した例をご紹介します。

■BioSpec-nanoの特長

図1に示すBioSpec-nanoは、セル (キュベット) を使用せず、最小1~2 μLの微量試料が測定できるため、核酸やタンパク質など貴重な生体試料の測定に最適です。

測定は図2に示した滴下位置 (ターゲット) に試料を滴下し、スタートボタンを押すだけで開始されます。また、自動ワイピング機能により測定後の試料拭き取りも不要です。スタンダードタイプ分光光度計 (セル測定、ダブルビーム) との高い相関性も保持しつつ、高い再現性と測定精度も実現しています。光路長は、図3に示すように試料濃度に合わせて0.2 mmと0.7 mmを選択できます*2。また、BioSpec-nanoは、核酸定量、タンパク質定量、指定波長のOD値表示と様々な定量モードを搭載し、1台で多様な用途に対応可能です。

*2 オプションで光路長5 mm (試料量は2 mL必要) も可能です。

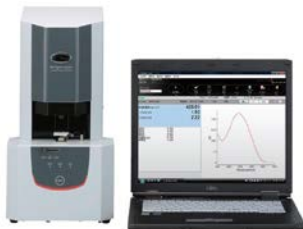


図1 BioSpec-nano

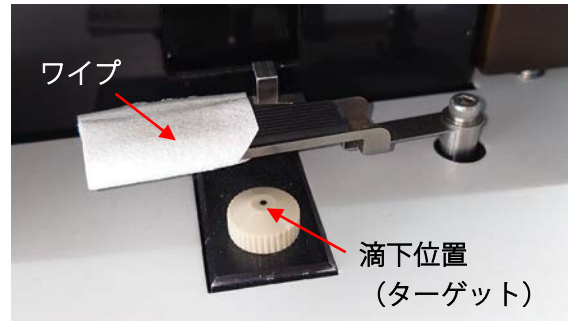


図2 試料滴下部と自動ワイピング機能

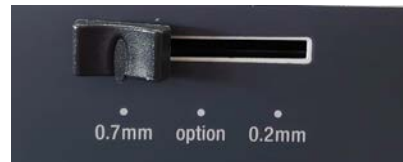


図3 光路長の設定

■紫外線吸収法 (OD280 nm法)

ソフトウェアの分析選択画面 (図4) でタンパク質定量 (OD280法) を選択し、280 nmにおけるモル吸光係数 (ε 280) と分子量を入力すると、タンパク質濃度が自動で計算されます。ε 280はアミノ酸配列からトリプトファン、チロシン、システイン残基数を入力することで、ソフトウェア上でも計算が可能です。測定結果画面では、試料の濃度値とスペクトルが確認できます。また、結果はCSV またはPDF形式で出力できます。



図4 タンパク質定量 (OD280法) モードの分析選択画面

■ OD280法によるウシIgG定量結果

ウシ由来の免疫グロブリン (IgG) をリン酸緩衝生理食塩水で 1,000 µg/mL に調製し測定試料としました。

光路長 0.7 mm、モル吸光係数 (ϵ_{280}) = 2.1×10^5 L/mol·cm、分子量 (MW) = 150,000 に設定し、試料 4 µL をターゲットに滴下して 280 nm における OD (光路長 10 mm 換算の吸光度) を測定しました。

測定結果を図5に示します。調製通り約 1,000 µg/mL の濃度であることが示されました。

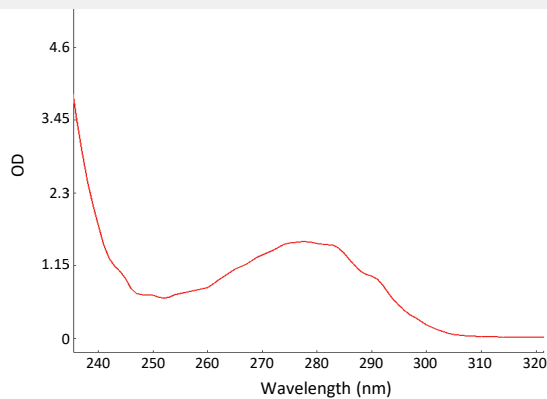
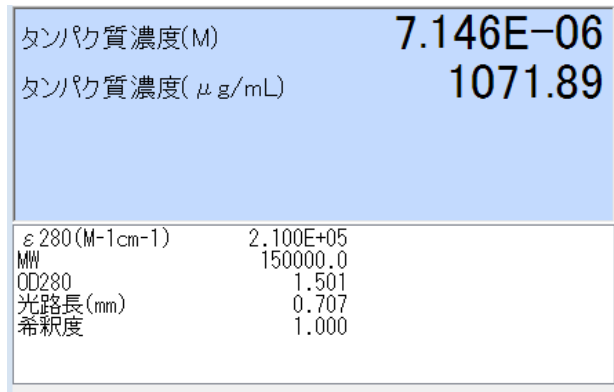


図5 光路長0.7 mmにおけるウシIgG測定結果

■ BCA法

フォトメトリック測定では、最大8波長までのOD値を表示することができます(図6)。BCA法では、このフォトメトリック測定で測定を行いました。



図6 フォトメトリック測定の分析選択画面

BioSpecは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

■ BCA法による精製ヒトIgG定量結果

市販のヒト血漿 1 mL を、抗IgG抗体カラムでアフィニティー精製^{*3}した後のヒトIgG濃度を、BCA法により定量しました。精製したヒトIgG溶液 10 µL を 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 の割合で希釈系列を作製しました。各希釈溶液 5 µL に BCA assay kit の反応液 100 µL を添加後、37 °C で 30 分間インキュベートしました。光路長は 0.7 mm に設定し、反応後の試料 4 µL をフォトメトリック測定で 562 nm における吸光度を測定しました。定量に使用する検量線は試料と同様に反応させたウシ血清アルブミン (BSA) を測定して作成しました。相関係数の2乗値は $R^2 = 0.9976$ と良好な直線性が得られました(図7)。検量線の式から精製したヒトIgGの各希釈液の吸光度の値を濃度に変換し、その濃度と希釈率をプロットしました(図8)。直線性のある 1/4 ~ 1/32 の希釈点での近似式より、精製したヒトIgGは 2.32 mg/mL であることが分かりました。

*3 島津アプリケーションニュース 01-00118-JP 「シームレスなタンパク質精製と評価」参照。

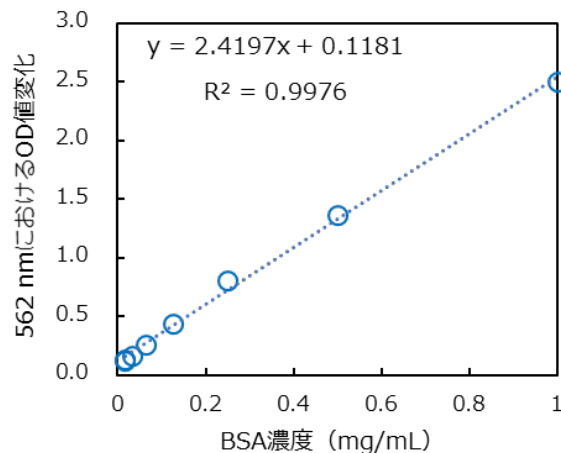


図7 BSAとの反応における検量線

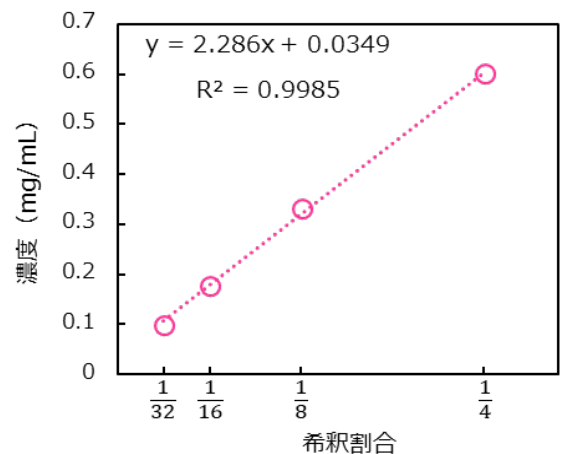


図8 ヒトIgGの測定結果

■ まとめ

BioSpec-nano を用いて、OD280 nm 法および BCA 法で IgG の定量を行いました。いずれも 4 µL と少量の試料量で良好な定量結果が得られました。このことから、タンパク質を溶解している緩衝液の種類や、還元剤、界面活性剤などの添加剤や試料の特性に合わせ、様々な分析方法で精度よく測定することが可能であることがわかりました。

バイオ医薬品の開発や製造において、タンパク質を微量で簡便に定量できる BioSpec-nano を是非ご活用ください。