

タンパク質 (抗体) 固定化量の直接定量

標的タンパク質のアフィニティ精製において、ビーズへ固定化されたタンパク質や抗体の固定化量を把握する事が必要となる場合があります。BCA法を応用することでビーズに固定化したタンパク質や抗体の量を定量することができます。

1. 準備するもの

1.1 ビーズ

- ・タンパク質 (抗体) 固定化ビーズ (5 mg/mL)

1.2 試薬

- ・BCA Protein Assay Reagent A (Pierce 23221、など)
- ・BCA Protein Assay Reagent B (Pierce 23224、など)
- ・Bovine Serum Albumin (BSA) Standard (Pierce 23209、など)
- ・Bovine Gamma Globulin (BGG) Standard (Pierce 23212、など)

1.3 機器等

- ・マイクロチューブミキサー (TOMY社 MT-360、など) ・恒温槽
- ・マイクロチューブフィルターUltrafree-MC (ポアサイズ0.2 μ m) (MILLIPORE UFC30LG00、など)
- ・微量高速冷却遠心分離機 ・分光光度計
- ・超音波分散装置
超音波ホモジナイザー (カップホーン付) (多摩川精機TAB4905N10など)
超音波洗浄器 (多摩川精機TAB4905など)

2. 方法

2.1 溶液調製

- 1) BCA Protein Assay Reagent AとBCA Protein Assay Reagent Bを50:1で混合する。(Working Reagent)
この際の調製量はスタンダードとサンプル全てに200 μ Lずつ添加できる量とする。
- 2) タンパク質を定量する場合はBSA Standardを、抗体を定量する場合はBGG Standardを500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 0 μ g/mLに希釈して検量線の溶液とする。

2.2 測定

- 1) Working Reagent200 μ Lと各サンプル (検量線、ビーズ、ブランク) 40 μ L (ビーズ0.2 mg分) を混合する。(ビーズは分散させた状態で混合する。)
- 2) 37°Cの恒温槽の中で30分間マイクロチューブミキサーを使って攪拌する。
- 3) 恒温槽から取り出して室温まで冷却する。
- 4) 遠心分離 (15,000rpm, r.t., 5 min) し、上澄みを回収する。
- 5) 回収した上澄みをマイクロチューブフィルターにて、遠心分離 (5000 \times g, 1 min) によるフィルターろ過を行い、ビーズを十分に除去する。
- 6) 分光光度計にて562 nmにおける吸光度を測定する。

2.3 データ解析

- 1) 検量線サンプルとビーズサンプルの測定値からブランクサンプルの測定値を差し引いて補正する。
(ブランクサンプルはタンパク質または抗体未固定化ビーズやビーズの保存バッファなど)
- 2) 補正した検量線サンプルの値から検量線を作成し、補正したビーズサンプルの測定値からビーズサンプル中のタンパク質 (抗体) 濃度を算出する。
- 3) 下の式を使ってタンパク質 (抗体) 固定化量を算出する。

$$\text{固定化量}(\mu\text{g}/\text{mg}) = \text{タンパク質濃度}(\mu\text{g}/\text{mL}) \div \text{ビーズ濃度}(\text{mg}/\text{mL})$$

実験プロトコール 107

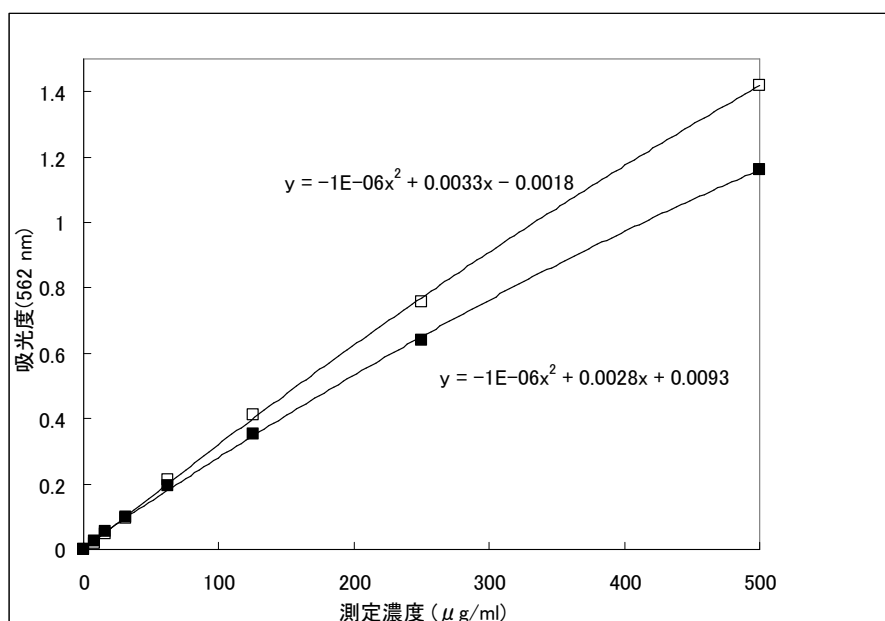
3. 補足

- ・ビーズの分散は超音波分散装置で容易に分散できるが、それらが無い場合は、超音波洗浄器や試験管立てを使用したガリガリ法でも分散可能。(ガリガリ法では、チューブの蓋が開かないようにキャップブロックを用いることが望ましい。)

(FGビーズのホームページ：<http://fgb.tamagawa-seiki.com/technique/affinity.html> に動画あり)



- ・検量線の例



4. 注意事項

- ・測定時にビーズが残っていると誤差の要因になるので、ビーズを十分に除去してください。

以上