

Bicinchoninic Acid による花粉抗原中のタンパク質微量定量法

吉川恒男*・衛藤幸男*・松永 喬*・芦田恒雄**・井手 武***・田端司郎***

* 奈良県立医科大学耳鼻咽喉科学教室 〒634 橿原市四条町 840
 ** 芦田耳鼻咽喉科医院 〒577 東大阪市小阪 3-4-51
 *** 奈良県立医科大学化学教室 〒634 橿原市四条町 840

Micromasurement of Protein in Allergic Extract from Pollen Using Bicinchoninic Acid

Tsuneo YOSHIKAWA*, Yukio ETOH*, Takashi MATSUNAGA*,
 Tsuneo ASHIDA**, Takeshi IDE*** and Shiro TABATA***

* *Department of Oto-Rhino-Laryngology, Nara Medical University, 840, Shijyo, Kashihara, Nara 634, Japan*
 ** *Ashida ENT Clinic, 3-4-51 Kosaka, Higashiosaka 577, Japan*
 *** *Department of Chemistry, Nara Medical University, 840, Shijyo, Kashihara, Nara 634, Japan*

(1989年4月8日 受理)

はじめに

抗原や酵素を精製したり、その反応を研究するとき、その系に含まれているタンパク質の量を知る必要がある。共存する物質の如何を問わず、すべてのタンパク質に共通した結果を与える定量法はないので、それぞれの目的に応じた方法を選ばねばならない。そのときの条件として、(1)微量で測定し得ること、(2)他の物質の影響をうけないこと、(3)簡便であること、(4)再現性があること、が挙げられる。

われわれが扱っている花粉抗原を分析するにあたって同様の条件が望まれるが、花粉から抽出した粗抗原中には多糖、とくに酸性多糖が多いことが特徴である。

1985年、Smithら^①は Bicinchoninic acid (BCA) を用いた新しいタンパク質定量法を報告しているので、この方法を花粉抗原中のタンパク質の定量、とくに多糖が多く共存している場合に利用し得るかどうかを検

討した。

原 理

この方法は、biuret 反応においてタンパク質をアルカリ条件下で Cu^{2+} と作用させたときに生じる Cu^+ - ペプチド複合体の Cu^+ と BCA が安定なキレートを形成し、強い紫に発色する。この発色度合がタンパク質量と比例することを利用したものである (図1)。

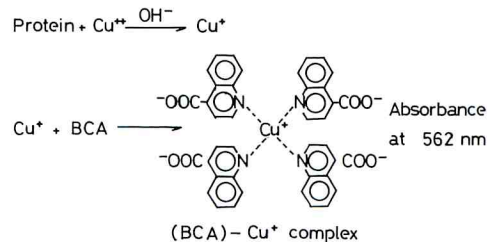


図1 Bicinchoninic Acid による発色の原理

測定方法

試薬

A 液: 8 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 1.6 g NaOH
 1.6 g $\text{Na}_2\text{tartrate}$
 1~2 g NaHCO_3

NaHCO_3 で pH 11.25 に調整し, 全量を 100 ml とする. pH は 11.0~11.5 の範囲であればよい (室温で長期間保存可能).

B 液: 4 g の BCA sodium salt dihydrate (PIERCE 社製) を水 100 ml に溶解する. 6 ヶ月位は blank 値が少し高くなる程度で, 測定にはほとんど影響しない. 沈澱物が生じることもあるが, 濾過して使えば問題はない.

C 液: 4 g の $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を 100 ml の水に溶解する (長期間室温で安定).

反応試薬: 測定に際して, A 液: B 液: C 液を 26:25:1 に混合する.

方法

試料液 0.5 ml と反応試薬 0.5 ml をよく混合して, 60°C , 60 分反応させた後, 室温になるまで放置して A_{562} で測定する.

結 果

Bovine serum albumin (BSA) の calibration

curve を図 2 に示す. $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ($0.5\ \mu\text{g protein}$) から $30\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度まで直線性を示している. 60°C に保つ時間は 30 分では発色が不十分で, 50 分は必要である. 室温に放置する時間が 2 時間位までは測定値に影響はなく, 発色が完全であるのでさらに長時間放置しても変わらないであろう.

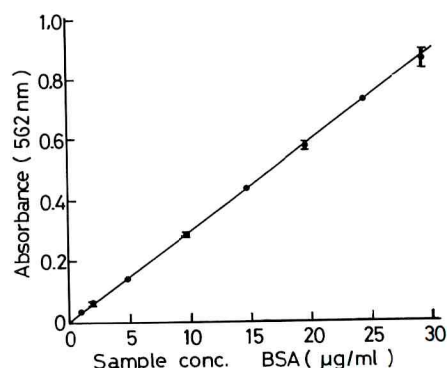


図 2 BCA 法を用いたタンパク質 (Bovine Serum Albumin) の Calibration Curve

次に, この反応系に共存して影響する物質について検討した結果を表 1 にまとめた.

NaCl のような中性塩は 1 M でもまったく影響しないし, リン酸緩衝液も反応系の pH を変化させない濃度であれば影響はない.

発色度は, 反応系の pH が 10.8~11.5 であればほとんど変わらないが, それより高くても低くても低下する. EDTA のようなキレート試薬は当然発色を妨げ

表 1 BCA 法で影響を及ぼす物質

全く影響しない物質	NaCl (1 M), Na_2HPO_4 (0.2M), Sucrose (10%)
Blank 値として差し引けば測定し得る物質.	Triton X-100 (1%), SDS (0.5%), Glucose (10mM), Glycerol (20%), Gum arabic (0.2%), Acetate buffer, pH 5.0 (0.2M)* ¹ , Phosphate buffer, pH 7.0 (0.2M)* ¹ , Tris (0.2M)* ¹
妨害する物質	EDTA (15mM)* ² Phenol (0.001%)

各物質を () 内の濃度にして $2\ \mu\text{g}$, $5\ \mu\text{g}$ の BSA を加えて常法通り測定した.

*1: 水に対する Blank 値よりも低くなる物質

*2: 1 mM では Blank 値を引けば測定可能

表2 花粉抽出物質中のタンパク質含量

	Protein contents	Recovery of added BSA *1
Sugi	5.6% (4.7%)*2	103%
Hinoki	57.9% (56.8%)	98%
Ohobayashabusi	84.1% (84.0%)	99%

それぞれの花粉より抽出し透析した凍結乾燥標品を 1 mg/ml の濃度にして測定した。()内は Lowry 法によって求めた値である。いずれも BSA を標準とした。

*1: それぞれの花粉末抽出液に 2 μ g, 5 μ g の BSA を加えて測定した値 (A) が, 花粉抽出液 (B) と BSA (C) 単独の測定値の和になっているかを調べた。数値は $\frac{A-B}{C} \times 100$ (%) で表した。

*2: 測定値が 0.1 以下であるので信頼性は乏しい。

る。SDS や Triton のように, Lowry 法⁽²⁾では沈澱を生じ測定できない物質もあまり影響しない。ただし 1% 以上の濃度になると blank 値は上がる。グルコースのような還元性の糖は 10 mM でも値は高くでる。蔗糖のような非還元性糖は高濃度でもあまり影響しない。

高分子の酸性多糖としてアラビアゴム (Nacalai tesque) を用いたが, 市販品には還元性物質が混在している標品が多い。ここで用いたものも若干それが含まれている。その影響かどうかかわからないが, 1 mg/ml の濃度でも blank 値はやや高い ($A_{562} = 0.3$)。しかし, 100 μ g/ml になればほとんど影響はなく, それに 2 μ g/ml のタンパク質が共存している溶液では多糖の blank 値を無視して測定できる。この溶液の多糖量はタンパク質量の 50 倍である。したがって, この比が 50 以下であれば, 多糖の影響はなく測定できるが, Lowry 法ではそれが 20 以下でなければ問題がある。

市販の皮内反応用アレルギーエキスはフェノールを含む標品が多いので Lowry 法では測定できない。BCA 法でもフェノールが低濃度 (0.001%) であっても測定できない程濃く発色するので, 市販のアレルギーエキスのタンパク質量は測定できなかった。

アレルギー中のタンパク質量測定の例として, スギ, ヒノキ, オオバヤシャブシの花粉末から抽出した粗抗原 (凍結乾燥物) を 1 mg/ml の濃度にしてそのタン

パク質量を測定した。さらにその溶液に BSA を加えて積算した量が検出されるかどうかを調べた (表 2)。

ヒノキ, オオバヤシャブシの標品のタンパク質量は Lowry 法による測定値とよく一致している。スギの場合はタンパク質濃度が希薄なことから, 酸性多糖が多いため, Lowry 法では測定し難いが, BCA 法での値はさらに希釈して測定した結果であるから, 多糖の影響がほとんどなく信頼できると考えている。

おわりに

BCA 法はタンパク質の定量法として特に優れているとは言い難いが, Lowry 法よりも数倍感度がいいことと, SDS や Triton の他にリン酸緩衝液が共存していても測定できることが利点である。また, 再現性もよく, 簡便である。欠点は blank 値として差し引かねばならない物質の多いことである。

タンパク質を定量することが主たる研究の目的ではないので, 反応させてから光度計で測定するまでの時間を正確に対応することがわずらわしい。その場合には, この BCA 法は完全に発色させてから測定するので, 時間のずれが少々あっても問題がない所が利点であろう。

引用文献

- (1) Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk : *Anal. Biochem.* **150**, 76-85 (1985).
- (2) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
-