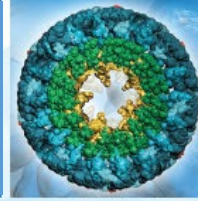


Absorbance

タンパク質濃度自動計算機能 「Protein A280」



はじめに

HORIBAの蛍光吸光分光装置Duettaおよびタンパク質濃度算出機能Protein A280について紹介する。タンパク質濃度は、タンパク質生化学や分子生物学において重要であり、波長280 nmにおける吸光度から算出することができる。

吸光度を用いたタンパク質濃度の算出

タンパク質濃度は以下3つの計算を経て算出される。

1) 吸光度A (ランベルトベールの法則)

$$\text{吸光度}A = \epsilon * b * c$$

ϵ :モル吸光係数 ($M^{-1}cm^{-1}$), b :セル長(cm), c :濃度(mol/L)

よって、波長280nmにおける吸光度A280は式1の通り算出される。

$$\text{吸光度}A_{280} = \epsilon_{280nm} * b * c \quad (\text{式1})$$

2) モル吸光係数 ϵ

波長280nmにおけるモル吸光係数 ϵ_{280nm} は、タンパク質中のトリプトファン・チロシン・システインのアミノ酸残基数を用いてEdelhoch法に基づき(式2)によって算出される^{1, 2, 3}。

$$\epsilon_{280\text{ nm}} = (\#Trp * 5500) + (\#Tyr * 1490) + (\#Cys * 125) \quad (\text{式2})$$

#Trp: トリプトファン残基数、#Tyr: チロシン残基数

#Cys: システイン残基数

3) タンパク質濃度の算出

タンパク質濃度は前述の(式1)および(式3)の値を用いて、以下のように算出される。

$$\text{タンパク質濃度}[\text{protein}] = A_{280} / (b * \epsilon_{280nm}) \quad (\text{式3})$$

タンパク質濃度測定機能Protein A280

タンパク質濃度算出のためには前述の通り3つの計算を行う必要があるが、Duettaにはタンパク質濃度を算出するための機能 (Protein A280) が標準搭載されており、吸光度測定からモル吸光係数およびタンパク質濃度の算出までを迅速かつ簡便に行うことが可能である。



Figure 1 蛍光吸光分光装置 Duetta

測定事例

ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 溶液を測定した事例を示す。測定条件は以下の通りである。

【測定条件】

- ・ 試料: 濃度の異なる6つのBSA溶液
- ・ スリット幅 (バンドパス): 3 nm
- ・ 露光時間: 0.1 sec
- ・ 吸光度スペクトル範囲: 250-450 nm
- ・ 励起波長送り幅: 1 nm
- ・ 残基数4
トリプトファン: 3, チロシン: 21, システイン: 35

濃度の異なるBSA溶液の吸収スペクトルをFigure2に示す。得られた吸収スペクトルとあらかじめ入力した各アミノ酸残基数から、Protein A280機能ではモル吸光係数および各BSA質濃度が自動的に算出される (Figure 3)。

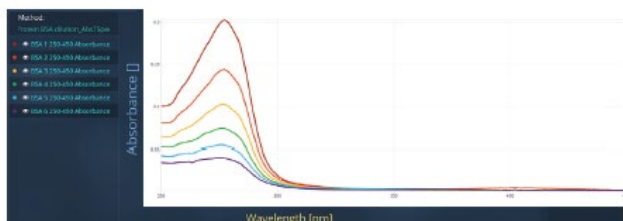


Figure 2 Protein A280によるBSA蛍光スペクトル

Sample Name	A ₂₈₀ (nm)	# Trp	# Tyr	# Cys	Molar absorptivity (1/M*cm)	Cell path length (cm)	Concentration(mol/L)
BSA1	0.194475	3	21	35	228165	1	8.52342e-07
BSA2	0.137518	3	21	35	228165	1	6.02713e-07
BSA3	0.0971861	3	21	35	228165	1	4.25947e-07
BSA4	0.0701678	3	21	35	228165	1	3.07531e-07
BSA5	0.0515468	3	21	35	228165	1	2.25919e-07
BSA6	0.0382164	3	21	35	228165	1	1.67404e-07

Figure 3 BSAタンパク質の6つの溶液のモル吸収率および濃度結果

おわりに

本測定では0.7-3.7 μ MのBSA溶液の濃度算出を扱った。他のタンパク質の測定可能な濃度範囲は、そのモル吸光係数に依存するが、同じBSAでは本装置では約10nMから約20 μ Mの濃度範囲を測定することができる。このように、タンパク質濃度やモル吸光係数の算出にはDuettaの吸光度測定機能およびProtein A280機能が有用である。

References

1. Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 1948-1954.
2. Gill, S. a. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 319-326.
3. C. Nick Pace, F. V. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, 2411-2423.
4. Bujacz, A. (2012). Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallographica Section D*, 1278-1289. Retrieved from <https://www.rcsb.org/structure/4f5s>

蛍光吸光分光装置 Duetta

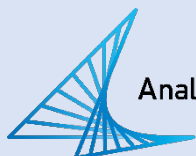
研究開発向けのハイエンドな蛍光分光測定装置を手掛けてきたHORIBAの蛍光分光技術をふんだんに取り入れたコンパクト蛍光分光装置です。0.1秒で1100nmまでの発光スペクトルを取得できる斬新なパフォーマンスだけでなく、蛍光と吸光の同時測定機能も持ち合わせた新しいコンセプトの蛍光分光装置です。



分析のお問い合わせ

- リンク先のフォームにご記入の上、お問い合わせください。

<https://www.horiba.com/jpn/service/solution/contract-analysis/service-support-request/>



Analytical Solution Plaza

HORIBAグループは、10の国と地域に分析センターを17拠点展開しています。日本では、東京と京都に分析を主要な業務とする“Analytical Solution Plaza”を設置しています。

株式会社 堀場製作所

〒601-8510 京都市南区吉祥院宮の東町2番地 075-313-8121
<http://www.horiba.co.jp>

株式会社堀場テクノサービス

本社/京都S.S. 〒601-8305 京都市南区吉祥院宮の東町2番地 075-313-8125

AP22_06_Duetta

3