

海洋生命・分子工学基礎実験  
タンパク質の取り扱い  
(2)

細胞分子工学研究室担当

この実験でやること

アフィニティクロマトグラフィーで精製した  
タンパク質試料 D の濃度を調べる。

単位は X mg/ml

今日の実験でやること

溶液中の成分の濃度を測る



定量する, という

**Lowry 法**によりタンパク質を定量する

Lowry法は, 比色定量法の 1 つである

比色定量

- タンパク質の濃度を溶液の色の濃さに置き換えて考える。

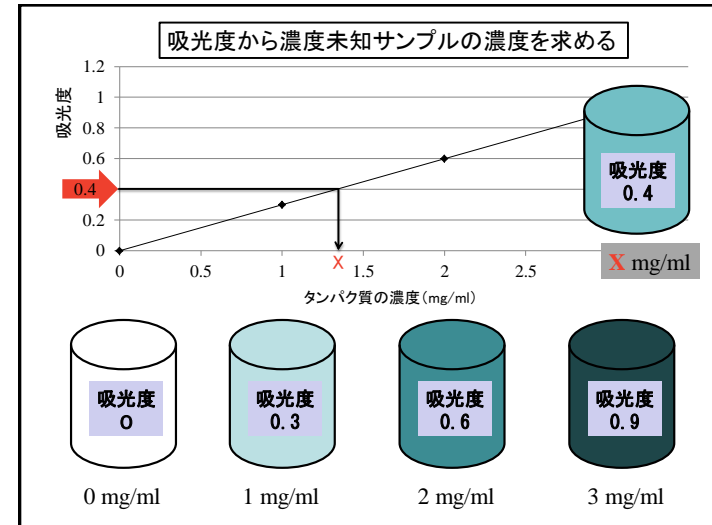
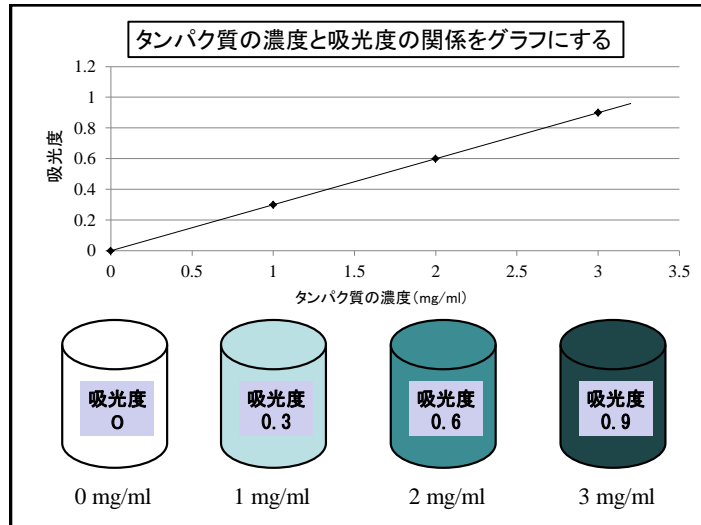


タンパク質がもつ共通の性質を利用して, 濃度を色に変換

- 色の濃さは「吸光度」という数値で表す。



タンパク質の濃度と溶液の色の濃さの関係をもとにして濃度をはかる定規 (検量線) をつくる。



## 実験方法

- **試薬 A** (1%  $\text{CuSO}_4$ ) と **試薬 B** (2% 酒石酸カリウム) をそれぞれ 50  $\mu\text{l}$ , 正確に量り取り, 空の 50 ml チューブに入れ, よく混ぜる。
- これに **試薬 C** (2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0.1 N NaOH) を 5 ml 加える。試薬 C は, あらかじめ 5 ml ずつはかって準備したチューブを渡すので, それを全量使う。

## 実験方法

- 24 穴マルチウェルプレートの 5 ウェルを使って, 標準タンパク質の希釈操作を行う。
  - 5 個のウェル (A1~A5) に, 100, 95, 90, 75, 50  $\mu\text{l}$  の蒸留水を入れる。
  - それぞれに対して, 1 mg/ml のウシ血清アルブミンを 0, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{l}$  加えて, よく混ぜる。
  - この操作で, A1~A5 のウェルが 100  $\mu\text{l}$  のタンパク質水溶液を含むことになる。
- …これらは **標準タンパク質**。

## 実験方法

- 24 穴マルチウェルプレートの 1 ウェルを使って、濃度未知タンパク質の定量操作を行う。
  - 1 個のウェル(C1)に、90  $\mu$ l の蒸留水を入れる。
  - 同じウェル(C1)に、10  $\mu$ l の濃度未知サンプル (精製した試料 D) を入れる。
- この操作で、C1 に 100  $\mu$ l の濃度未知タンパク質水溶液が入っていることになる

## 実験方法

- A1~A5 と C1 の各ウェルに対し、最初につくった A+B+C 混合液を 500  $\mu$ l ずつ加え、よく混ぜる。
  - ここまでやったら ストップ!! ----
- 試薬 P (1 N フェノール試薬) を 50  $\mu$ l 加えてよく混ぜる。
  - 丁寧に。
  - でも、できるだけ短時間で作業する!

## 実験方法

- 24 穴プレートにフタをして、30°C で 30 分間置く。
- 分光光度計で青紫色の吸光度を測定する。
- グラフを作成し、未知試料のタンパク質濃度を推定する。

## レポートに書くこと(タンパク質の定量 編)

課題 1: 実験の目的, 方法, 結果をまとめる。

注: 「方法」は、自分が実際にどうやったかを書く。  
したがって、基本的に過去形で書く。

課題 2: 標準タンパクの濃度と吸光度の関係をグラフにする。

課題 3: グラフ中に、未知タンパクの吸光度を書き込み、未知タンパクの濃度を推定する。

課題 4: Lowry法について調べてまとめる。

→ 「どんな仕組みでタンパク質溶液に色がつくのか？」