

Coomassie brilliant blue G250 色素結合法による 高感度タンパク質定量法

井熊武志・竹内宏治・匂坂慶子・高澤俊英
(受理：2002年5月31日)

Coomassie brilliant blue G250 dye-binding microassay for protein

Takeshi IKUMA, Kouji TAKEUCHI, Keiko SAGISAKA, and Toshihide TAKASAWA

摘 要

Coomassie brilliant blue G-250 (CBB)を用いてタンパク質定量用高感度試薬の調製を試みた。まず、Bradford reagent (0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-8.5%(w/v)リン酸)を使用し、Bradford (1976)の高感度発色系(0.1mLタンパク質溶液、1mL Bradford reagent)によってBSA (0-9 μ g)を標準物質として用いてBradford法を検証した。Bradford reagent (Bradford 1976)は、調製直後から経日保存中にCBB沈殿を生じ、使用する度毎にろ過操作を必要とし、従ってその度に標準曲線作成実験を行わなければならない、実験操作上煩雑で、この欠点はBradford reagent に改良を加えても解決できなかった。そこで、保存中にCBB沈殿を生じず、安定なCBB reagentの調製を試み、充分使用に耐えるCBB reagentを開発した。CBB reagentの濃度は、0.025%(w/v) CBB-12.5%(v/v)メタノール-70.83%(w/v)リン酸である。CBBによるタンパク質の発色系は、0.8mLタンパク質溶液(0-9 μ g protein)、0.2mL CBB reagentで行った。

キーワード：CBB 色素結合法、色素結合法、蛋白質定量法、CBB G250.

緒 論

タンパク質を定量するために現在までに種々の方法が考案されてきた。タンパク質の比色定量法としては、アルカリ性条件下でタンパク質中のペプチド結合と銅(Cu^{2+})試薬との錯体形成による安定な呈色反応を用いたBiuret法(Gornall et al. 1949)が主に使われてきたが、この方法はタンパク質の種類の違いによる発色率が大きく変動しない点は非常に優れているが、多量の糖質の共存及びプロリンを含むペプチドに対しては呈色が特に悪く、一般的

には感度(1-10mgタンパク質)が低いという欠点があった。この欠点を克服するために、Biuret法にタンパク質中の芳香族アミノ酸(トリプトファン及びチロシン)と発色するFolin試薬を組み合わせることによって改良したLowry法(Lowry et al. 1951; Folin and Ciocalteu 1927)は感度(5-100 μ gタンパク質)が飛躍的に向上し広く用いられてきたが、妨害物質が多く、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)等のキレート剤、ジチオスレイトールや2-メルカプトエタノール等の還元剤、Triton X-100及びドデシル硫酸ナト

リウム(SDS)等の界面活性剤及びグリセロールなどによって発色が妨害される(Peterson 1979)欠点を有していた。Lowry法を更に改良したピシニコニン酸(BCA)法(Smith et al. 1985)は、Folin試薬の代わりにBCAがアルカリ性条件でタンパク質による還元反応によって生じたCu⁺とコンプレックスを形成して紫に発色する反応を利用したもので、感度も高く(10-120 μ g)、妨害物質特に界面活性剤の影響を受けにくく、信頼性の高い方法である。しかしながら高感度法(0.5-10 μ g)の場合には、60°C・60minの煩雑で時間を要する処理を必要とし、又使用するBCAが高価であるために現在広く用いられるに至っていない。

一方、酸性色素とタンパク質との結合反応は古くから知られており、酸性色素分子内のスルホン酸基はタンパク質分子中のリジン、ヒスチジン、アルギニン残基などの塩基性アミノ酸残基や芳香族アミノ酸残基の側鎖及びN末端アミノ基に強い親和性を示す。色素結合法によるタンパク質定量法としては、Amidoblack 10B法、Methyl orange法及びCoomassie brilliant blue G250(CBB)法が考案されてきた。Amidoblack法の場合にはタンパク質色素結合物沈殿をろ別後、ろ液中の色素濃度の減少を測定する subtraction法(橋本ら 1964)及び色素結合タンパク質沈殿物をフィルター上に集め、その後NaOH-エタノール水溶液によってフィルター上の沈殿から色素を溶出して630nmでの吸光度(A₆₃₀)を測定する間接法(Nakao et al. 1973)があるが、何れも実験操作が煩雑で間接法であるために定量性には問題があると考えられる。これに対してBradford(1976)が考案したCBBを用いた色素結合法は遊離状態で赤色(吸収極大465nm)を示すCBBがタンパク質と結合すると青色(吸収極大595nm)を呈する性質を利用して、A₅₉₅を測定して試料中のタンパク質量を定量するもので感度も高く(0.2-10 μ g)、妨害物質も多量の界面活性剤等に限られている点で優れている。又、他の方法に較べて煩雑な操作を必要としないために簡便な方法である。しかしながらBradford試薬は発色の再現性が悪く、更にCBB試薬が調製直後から保存中に経日による沈殿を生じやすく、使用直前にろ過操作によってこの沈殿を除去しなければならず、従ってその場合には必ず標準曲線作成実験を行わなければならず煩雑な操作を必要とした。CBB法がBradford(1976)によって考案されてから多くの改良(Read and Northcote 1981; Spector 1978; Bearden 1978; Mcknight 1977; Sedmak and Grossberg 1977)が加えられてきたが、十分な解決は得られずに現在に至っている。

我々は、Bradford reagentについて発色の再現性を詳細に調べ、更に経日によってCBB沈殿を生成しないCBB reagentの調製を試みて、非常に安定なCBB reagentを得る

ことが出来たので報告する。

試薬及び実験方法

試薬

CBB(半井化学薬品 Specially prepared reagent Lot No. M7R3031、 $\epsilon_{550nm}^{1\%(w/v)}=105$)、リン酸(和光純薬工業 特級 85%(w/w))、エタノール(和光純薬工業 特級 99.5%(v/v)(w/w))、メタノール(和光純薬工業 特級 99.6%(v/v)(w/w))、Bovine serum albumin(BSA)(Sigma, crystallized and lyophilized, Nitrogen 14.8%(w/w))、アジ化ナトリウム(和光純薬工業 化学用 90.0%(w/w))。

BSA標準溶液の調製

BSA約5mgをはかりメスフラスコ(10mL)に入れ、保存剤として4%(w/v)アジ化ナトリウム水溶液100 μ Lを加え、イオン交換蒸留水(純水)を加えて溶解させた後、10mLにメスアップした(0.5mg/mL BSA-0.04%(w/v)アジ化ナトリウム)。この保存溶液を1.2mLずつマイクロチューブ(1.5mL)に分注して5°Cで保存し、使用時にA₂₈₀を測定し、1%(w/v)BSA溶液の吸光度係数 $\epsilon_{280}^{1\%(w/v)}=6.60$ (Kirshenbaum 1977)を使用して正確な濃度を決定した。その後、1mL(フィンピペット)を取り5倍希釈し、約0.1mg/mL BSA使用標準溶液を調製した。

Bradford reagent、Modified reagent A及びBの調製

CBB 100mg(オートバランス)を秤取りメートルグラスに入れ、99.5%(v/v)エタノール47.5mL(メスシリンダー)を加え、約2時間攪拌しCBBを溶解させた。その後85%(w/w)リン酸60mL(100g)(Bradford reagent)、100mL(Modified reagent A)又は130mL(Modified reagent B)をCBB-エタノール溶液に加え更に2時間攪拌し、純水で1Lにメスアップした。次にこれら試薬を減圧吸引ろ過(定量用ろ紙 No. 5B Advantec)し、5°Cで保存した。

終濃度については、Bradford reagent: 0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-8.5%(w/v)リン酸、Modified reagent A: 0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-14.17%(w/v)リン酸、Modified reagent B: 0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-18.42%(w/v)リン酸である。

これらの試薬は保存中にCBB色素の沈殿を生じるので使用直前に吸引ろ過(定量用ろ紙No. 5B Advantec)してから用いた。

CBB reagent 1、2及び3の調製

CBB100mgを秤取りメートルグラス(200mL)に入れ、エタ

ノール47.5mLを加え約2時間攪拌しCBBを溶解させた。その後、リン酸60mL(CBB reagent 1)、100mL(CBB reagent 2)又は130mL(CBB reagent 3)をCBB-エタノール溶液に加え再び2時間攪拌し純水で200mLにメスアップした。

次にこれらCBB reagent 1、2及び3を吸引ろ過後、5°Cで保存した。

終濃度は、CBB reagent 1: 0.05%(w/v) CBB-23.75%(v/v)エタノール-42.5%(w/v)リン酸、CBB reagent 2: 0.05%(w/v) CBB-23.75%(v/v)エタノール-70.83%(w/v)リン酸、CBB reagent 3: 0.05%(w/v) CBB-23.75%(v/v)エタノール-92.08%(w/v)リン酸である。

CBB reagent 4の調製

CBB 100mgを秤取りメートルグラスに入れ、メタノール47.5mLを加え約2時間攪拌しCBBを溶解させ、リン酸100mLを加え更に攪拌後、純水で200mLにメスアップした。最後に吸引ろ過後5°Cで保存した。

終濃度は0.05%(w/v) CBB-23.75%(w/v)メタノール-70.83%(w/v)リン酸である。

CBB reagent 5及び6の調製

CBB 100mgをエタノール(CBB reagent 5)又はメタノール(CBB reagent 6)約50mLに加え2時間攪拌溶解後、リン酸100mLを加え更に攪拌し、最後にエタノール(CBB reagent 5)又はメタノール(CBB reagent 6)でメスアップ(200mL)した。吸引ろ過後5°Cで保存した。

終濃度は、CBB reagent 5: 0.05%(w/v) CBB-53%(v/v)エタノール-70.83%(w/v)リン酸、CBB reagent 6: 0.05%(w/v) CBB-54.4%(v/v)メタノール-70.83%(w/v)リン酸である。

CBB reagent 7及び8の調製

CBB 50mgをエタノール(CBB reagent 7)又はメタノール(CBB reagent 8)47.5mLに加え攪拌溶解後、各々にリン酸100mLを加え更に攪拌し、最後に純水でメスアップ(200mL)した。これらの試薬を吸引ろ過し5°Cで保存した。

終濃度は、CBB reagent 7: 0.025%(w/v) CBB-23.75%(v/v)エタノール-70.83%(w/v)リン酸、CBB reagent 8: 0.025%(w/v) CBB-23.75%(v/v)メタノール-70.83%(w/v)リン酸である。

CBB reagent 9及び10の調製

CBB 50mgをエタノール(CBB reagent 9)又はメタノール(CBB reagent 10) 25mLに加え攪拌溶解後、各々にリン酸100mLを加え更に攪拌し、純水でメスアップ(200mL)した。吸引ろ過後5°Cで保存した。

終濃度は、CBB reagent 9: 0.025%(w/v) CBB-12.5%(v/v)エ

タノール-70.83%(w/v)リン酸、CBB reagent 10: 0.025%(w/v) CBB-12.5%(v/v)メタノール-70.83%(w/v)リン酸である。

発色操作 1 (Bradford reagent及びModified reagent A, B)

試験管(13x100mm)中にBSA標準溶液と純水とを用いて100 μ L中にBSA 0-9 μ g (0, 1, 3, 5, 7, 9 μ g)を含むBSAタンパク質溶液を調製した。Bradford reagent、Modified reagent A又はB 1mL (フィンピペット)を加え試験管ミキサー(MT-31 ヤマト)でボルテックス後、30°C (アルミドライバス)で20分間インキュベートした。発色については、ブランクは4重でその他は3重で行い、ブランクの最初の1本は分光光度計のセルのリンスに使用しデーターとして採用しなかった。A₅₉₅測定はマイクロセル(光路長1cm、ブラックフェイスセル)を使用して行い、標準曲線を作成した。

発色操作 2 (CBB reagent 1-10)

試験管(13x100mm)中にBSA標準溶液と純水とを用いて800 μ L中にBSA 0-9 μ gを含むBSAタンパク質溶液を調製した。CBB reagent 1-10の何れかを200 μ L加えボルテックスし30°Cで20分間インキュベート後、発色操作1と同様にA₅₉₅を測定後標準曲線を作成した。

結果及び考察

Bradford reagent及びModified reagents A, B

我々はタンパク質溶液のタンパク質濃度をマイクロレベルで決定するためにBradford (1976)に従ってCBB色素試薬(Bradford reagent: 0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-8.5%(w/v)リン酸)を調製し、1-9 μ g BSAを用いて発色操作1に従って標準曲線作成実験を行った。Bradford reagent調製後1日経過したものを吸引ろ過(定量用紙No. 5B Advantec)して使用した結果を図1に示す。Bradford reagentを用いての各BSA量に対する3重のA₅₉₅データーのCV値はca.0.4-2.7%とそれほど大きなものではなかったが直線性は極端に悪く標準曲線の一次回帰式 ($y=0.0082x + 1.700$)の相関係数は $r=0.6565$ となり、又blank A₅₉₅値も1.700と非常に高く、試薬調製後1日目ではタンパク質定量用試薬としては使用不能であった(図1a)。

BSA量に対するA₅₉₅の直線性はBradford reagentを調製した後の日数が経過するに従い徐々に良好になり(図1a-c)、CBB色素の沈殿生成によってCBB濃度が経過日数と共に減少し、その結果としてreagent blank A₅₉₅が低下し、そのためにそれとは逆にBSA 1 μ g当たりのA₅₉₅は経過日数と共に向上する結果が得られた。Read and Northcote (1981)

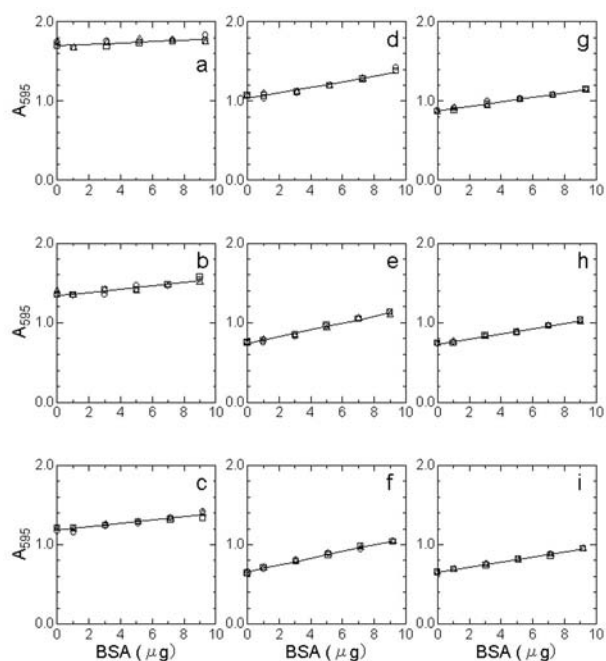


図1. Bradford reagent, Modified reagent A及びBを使用したBSAを標準物質とした標準曲線. a, Bradford reagent調製後1日目; b, Bradford reagent調製後7日目; c, Bradford reagent調製後10日目; d, Modified reagent A調製後1日目; e, Modified reagent A調製後7日目; f, Modified reagent A調製後10日目; g, Modified reagent B調製後1日目; h, Modified reagent B調製後7日目; i, Modified reagent B調製後10日目. ○: Data 1; □: Data 2; △: Data 3.

はBradford reagentが試薬調製後数週間はCBB沈殿を生じず安定であったと結論しているが、我々の場合は、reagent調製後1日目からCBB沈殿が生じ、必ず使用前にろ過しなければならなかった。我々の使用したCBB結晶中の有効CBB濃度は $\epsilon_{550nm}^{1\%(w/v)}=105$ で、Read and Northcote (1981)の用いたCBBと殆ど違いがなかったため、我々の場合はCBB結晶中の不純物が特に沈殿したとは考えにくいと思われる。この傾向は我々が調製したBradford reagentについて、調製してから27日後においても変わらずに沈殿が生じ、使用する前に必ずろ過操作を必要とし、未知試料のタンパク質濃度決定の場合には、必ずその前に標準曲線作成実験を行わなければならなかった。表1に示すように、Bradford reagentは経過日数と共にreagent blank A_{595} が低下し、それとは逆に発色率の上昇が観察された。従ってBradford reagentのCBB濃度を1/2に減少させたRead and Northcote (1981)が調製したDye-reagent No.2 (0.005%(w/v) Serva blue G, $\epsilon_{550nm}^{1\%(w/v)}=118$)は感受性の点ではよい結果を与えるものと期待されるが、Read and Northcote (1981)によると経日によるCBBの沈殿生成は避けることが出来ず、従って使用する度に試薬の吸引ろ過及び標準曲線作成実験を行う煩雑さは解消できない。

そこで我々はBradford reagentの経日によるCBB沈殿生成を防止し、更には感受性に大きく影響すると考えられ

表1. Bradford reagent, Modified reagent A及びBを用いた標準曲線作成実験に於ける一回帰式及び相関係数(r)の経日変化. Bradford reagent: 0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-8.5%(w/v)リン酸、Modified reagent A: 0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-14.17%(w/v)リン酸、Modified reagent B: 0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-18.42%(w/v)リン酸。

days after preparation	Bradford reagent	Modified reagent A	Modified reagent B
1	$y=0.0082x+1.700$ $r=0.6565$	$y=0.0349x+1.033$ $r=0.9642$	$y=0.0291x+0.870$ $r=0.9912$
7	$y=0.0206x+1.339$ $r=0.9116$	$y=0.0433x+0.731$ $r=0.9899$	$y=0.0324x+0.727$ $r=0.9944$
10	$y=0.0214x+1.181$ $r=0.9468$	$y=0.0427x+0.656$ $r=0.9961$	$y=0.0321x+0.651$ $r=0.9976$
14	$y=0.0203x+1.009$ $r=0.9502$	$y=0.0441x+0.572$ $r=0.9947$	
20	$y=0.0272x+0.812$ $r=0.9515$	$y=0.0442x+0.472$ $r=0.9921$	$y=0.0289x+0.527$ $r=0.9968$
22	$y=0.0283x+0.639$ $r=0.9715$	$y=0.0422x+0.408$ $r=0.9910$	$y=0.0261x+0.443$ $r=0.9956$
27	$y=0.0344x+0.468$ $r=0.9917$	$y=0.0393x+0.364$ $r=0.9926$	$y=0.0264x+0.415$ $r=0.9977$

るreagent blank A_{595} を低下させるためにリン酸濃度を高めたModified reagent A (100mL 85%(w/w)リン酸/L of reagent solution)及びModified reagent B (130mL 85%(w/w)リン酸/L of reagent solution)を調製して標準曲線作成実験を行い(図1)、BSA $1\mu\text{g}$ 当たりの A_{595} 及びreagent blank A_{595} がどのように変化するかを調べた(表1)。その結果リン酸濃度の上昇によってreagent blank A_{595} はBradford reagentと較べてほぼ半分まで減少し、直線性も向上した。更にBradford reagentの場合経日によってCBBが沈殿しその結果としてBSA $1\mu\text{g}$ 当たりの A_{595} は上昇する結果となったが、リン酸濃度を上昇させたModified reagent Aを使用した場合(図1)、reagent blank A_{595} は大きく減少しそしてFactor即ちBSA $1\mu\text{g}$ 当たりの発色率は大きく向上した(図1d-f)。更にFactorは経日によっても大きく変化せず安定していたが(図2)、経日保存によるCBB reagent自身のCBB沈殿生成は防止できなかった。

それ故、リン酸濃度を更に上昇させたModified reagent Bを使用してFactor及びFactorの経日変化、更には経日保存によるCBB沈殿生成の有無を調べた。その結果、リン酸濃度を増加させても標準曲線作成におけるデータの再現性等はModified reagent Aとは大きく変わらなかったが(図1g-i)、FactorはModified reagent Aよりも低下してしまい、更にFactorの経日変化(図2)については、Factorが経日と共に低下し、一見するところCBB reagentの劣化が起こっている可能性も考えられた。又、Modified reagent Bも経日によるCBB沈殿生成が起こり、リン酸濃度を増加させてもCBB沈殿生成を防止できなかった。

CBB reagent 1、2及び3を使用した標準曲線作成

Bradford reagent及びModified reagents A&Bは試薬調製直後から経日保存によってCBB沈殿を生じ、使用の度毎にろ

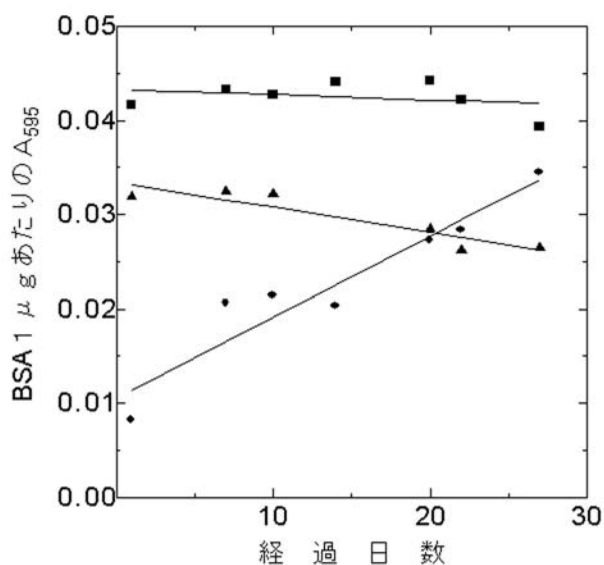


図2. Bradford reagent, Modified reagent A及びBの BSA 1 μg あたりの A_{595} (factor)の経日変化. ●: Bradford reagent (1次回帰式, $y=8.60 \times 10^{-5}x+0.0105$; mean $0.0229 \pm \text{S. E. } 3.13 \times 10^{-3}$; CV, 36.1%); ■: Modified reagent A (1次回帰式, $y=-5.67 \times 10^{-5}x+0.0433$; mean $0.0425 \pm \text{S. E. } 6.41 \times 10^{-4}$; CV, 3.99%); ▲: Modified reagent B (1次回帰式, $y=-2.68 \times 10^{-4}x+0.0334$; mean $0.0295 \pm \text{S. E. } 1.19 \times 10^{-3}$; CV, 9.98%). 各色素試薬は毎回使用する直前にろ過した.

過操作が必要で非常に扱いにくいためにBradford reagent (Bradford 1976)のCBB、エタノール及びリン酸濃度を参考に経日保存によってCBB沈殿を生じないタンパク質量定量試薬を新しく調製しようと試みた。タンパク質発色試薬であるCBB reagentを保存中にCBBが沈殿を生成するのはエタノール及びリン酸濃度が低いために起こるものと考えて、まず最初にBradford reagentよりも5倍濃度の高いCBB reagent 1を作成した。そして発色反応系におけるCBB、エタノール及びリン酸濃度はBradford reagentにおける場合とほぼ同様になるように設計し、発色操作2に示した通りタンパク質サンプル溶液0.8mLに対してCBB reagent 0.2mL添加する反応系に改めた。タンパク質溶液を0.1mLから0.8mLに改良したことによって、等しい μg タンパク質で発色を行う場合を考えるとタンパク質濃度が8倍低い場合でも発色が可能になり、標準曲線作成におけるタンパク質量は同じであるにもかかわらず、実質的には感受性を向上させたことになり汎用性が広がった。従ってCBB reagent 1は発色時にはBradford reagentの発色反応時のCBB、エタノール及びリン酸の濃度とほぼ同じである。しかしながら、CBB reagent 1を用いての発色操作2によっての標準曲線作成実験は図3aに示すように、reagent blank A_{595} がBradford reagentの場合の1.700に対して3.293と非常に高い A_{595} を与えた。これはCBB reagent 1のリン酸濃度が不十分でpHが高いためにCBBの平衡がblue form($\lambda \text{ max: } 645\text{nm}$)に偏っているのが原因と考えられる。更にBSA 1 μg に対する A_{595} はマイナス値を

えBSA量(μg)に対して比例性が全く観察されず、reagent 1はタンパク質量定量用試薬としては全く使用できないと結論した。

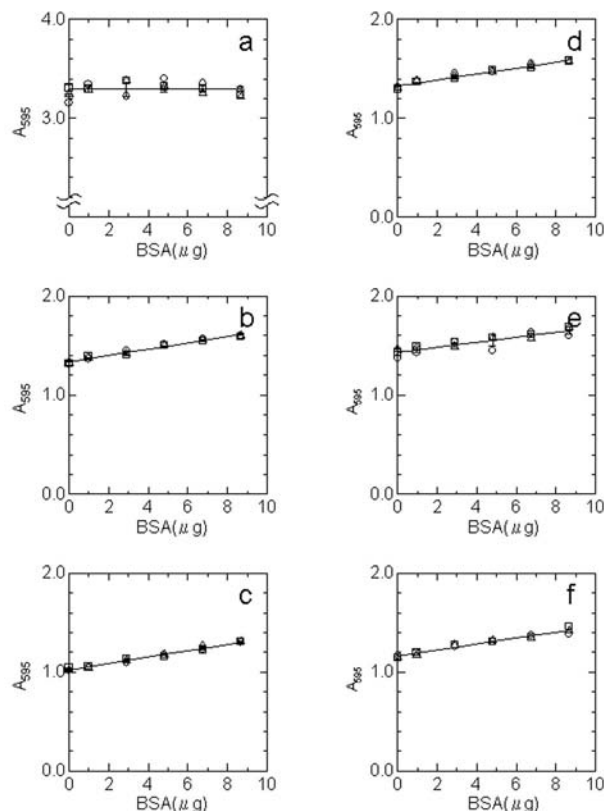


図3. CBB reagent 1-6 (0.05%(w/v)CBB)を用いて作成した標準曲線調製後1日目の各CBB reagent を使用した. BSA標準溶液の濃度は19.2 $\mu\text{g/mL}$ であった. a, CBB reagent 1 (標準曲線の1次回帰式, $y=-3.96 \times 10^{-5}x+3.293$; 相関係数(r)= -0.0244). b, CBB reagent 2 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0325x+1.333$; $r=0.9863$). c, CBB reagent 3 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0329x+1.021$; $r=0.9915$). d, CBB reagent 4 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0293x+1.331$; $r=0.9797$). e, CBB reagent 5 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0258x+1.430$; $r=0.8920$). f, CBB reagent 6 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0299x+1.164$; $r=0.9810$). ○: Data 1; □: Data 2; △: Data 3.

次にCBBをblue formからred form ($\lambda \text{ max: } 465\text{nm}$)に平衡を偏らせ、結果としてreagent blank A_{595} を低下させるためにリン酸濃度を高めたCBB reagent 2を調製し、発色操作2によって標準曲線作成実験を行った。結果は図3bに示すように、reagent blank A_{595} はreagent 1の約40%(1.333)迄低下したが、reagent blank A_{595} : 1.333は未だ改良される余地を残していると考えられる。各BSA量に対する3重の A_{595} のCV値は0.31-1.56%で再現性が高く、標準曲線の一次回帰式の相関係数は $r = 0.9863$ となり、かなり良好な直線性が得られ、BSA 1 μg 当たりの A_{595} 発色率は0.0325となった。reagent 2は保存中にCBB沈殿を生じることもなく、感受性についても経日による低下はごく僅か(reagent 2調製後51日目までの発色率の一次回帰式: $y=-6.18 \times 10^{-5}x+0.0321$)で、試薬の劣化は小さかった(図5a)。

次にreagent 2ではreagent blank A_{595} が1.333と高いblank値

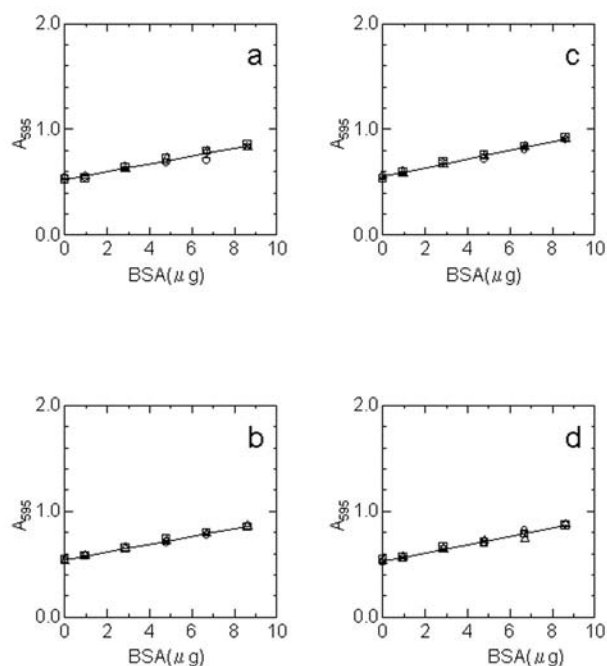


図4. CBB reagent 7-10 (0.025%(w/v)CBB)を用いて作成した標準曲線。調製後1日目の各CBB reagentを使用した。BSA標準溶液の濃度は19.2 μ g/mLであった。a, CBB reagent 7 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0361x+0.531$; 相関係数(r)=0.9910)。b, CBB reagent 8 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0365x+0.543$; $r=0.9977$)。c, CBB reagent 9 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0407x+0.556$; $r=0.9941$)。d, CBB reagent 10 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0386x+0.530$; $r=0.9917$)。○: Data 1; □: Data 2; △: Data 3。

を与えたので、これを更に低下させる目的でリン酸濃度を上昇させ結果としてCBBの平衡をred formに偏らせ reagent blankの低いCBB reagentを調製しようと考え、CBB reagent 3を作成した。reagent 3を用いた発色操作2に従った標準曲線作成実験の結果を図3cに示す。reagent blank A_{595} は期待通り低下したが、低下の割合は約25%で、1.021となった。各BSA量に対する3重の A_{595} のCV値は0.53-1.81%でreagent 2と比べて大きく変わらなかったが標準曲線の一次回帰式の相関係数は $r=0.9915$ となりreagent 2に比べて若干良くなり、感受性もreagent 2 (0.0325)に比べて僅かに良くなり0.0329となった。しかしながら発色系において微細沈殿を生じた。これは発色系でのリン酸濃度の急激な低下によるものとも考えられる。感受性の経日による低下の割合は、reagent 2に比べて約2倍大きくなり (reagent 3調製後47日目までの発色率の一次回帰式: $y=-8.66 \times 10^{-5}x+0.0324$) (図5b)、リン酸濃度の92.08%(w/v)への上昇によってreagent 3の経日安定性は減少したので、リン酸濃度は70.83%(w/v)が最適と考えられた。以後のCBB reagentのリン酸濃度は70.83%(w/v)で調製した。

CBB reagent 4

reagent 1, 2及び3の比較検討によってリン酸濃度は70.83%(w/v)が適当と考えられたので、CBB reagent 2にお

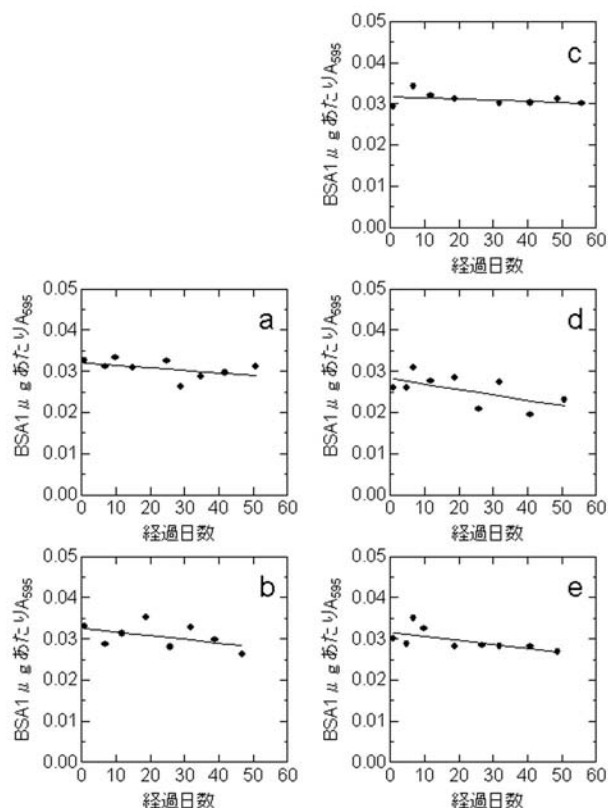


図5. CBB reagent 2-6 (0.05%(w/v)CBB)の発色率の経日変化。各CBB reagentを用いて標準曲線を作成し各日数に於ける傾き(BSA 1 μ gあたりの A_{595})をプロットした。a, CBB reagent 2 (1次回帰式, $y=-6.18 \times 10^{-5}x+0.0321$; mean 0.0305 \pm S. E. 7.54×10^{-4} ; CV, 7.42%)。b, CBB reagent 3 (1次回帰式, $y=-8.66 \times 10^{-5}x+0.0324$; mean 0.0302 \pm S. E. 1.15×10^{-3} ; CV, 10.8%)。c, CBB reagent 4 (1次回帰式, $y=-2.60 \times 10^{-5}x+0.0316$; mean 0.0306 \pm S. E. 8.80×10^{-4} ; CV, 8.14%)。d, CBB reagent 5 (1次回帰式, $y=-1.31 \times 10^{-4}x+0.0281$; mean 0.0254 \pm S. E. 1.24×10^{-3} ; CV, 14.6%)。e, CBB reagent 6 (1次回帰式, $y=-9.71 \times 10^{-5}x+0.0315$; mean 0.0295 \pm S. E. 8.56×10^{-4} ; CV, 8.70%)。

いてreagent blankを低下させる目的でreagent blankへのメタノールの影響を調べた。CBBの溶媒としてエタノールではなく、粘度が低くピペッティングの容易なメタノールを使用したCBB reagent 4を調製し、reagent 2と比較検討した。

試薬調製後1日目のものを用いた結果を図3dに示す。reagent blank A_{595} はメタノールにした場合でも全く変わらずreagent 2: 1.333に対して1.331となった。各BSA量に対する3重のデータのCV値も0.19-1.88%でこれも殆ど変わらなかった。しかしBSA 1 μ gあたりの A_{595} はreagent 2: 0.0325に対してreagent 4は0.0293となり感受性はca.10%低下し、相関係数($r=0.9797$)も低下した。又発色系においてreagent 3の場合と同様に微細な沈殿粒子の浮遊が見られた。しかしながらBSA 1 μ gあたりの A_{595} の経日変化の割合 (reagent 4調製後56日目までの一次回帰式: $y=-2.60 \times 10^{-5}x+0.0316$) はreagent 2の約2倍小さくなり (図5c)、試薬保存中もCBB沈殿を生じず、発色系において沈殿を生じる欠点を除くと、安定なCBB reagentであった。

CBB reagent 5及び6

CBB reagent 4は発色系において微細な沈殿さえ生じなければ、BSA $1\mu\text{g}$ 当たりの A_{595} の経日による変化も小さく非常に安定性の高い試薬である。

そこでCBBがエタノールやメタノールに良く溶解することから、純水を使用せずすべてエタノール(CBB reagent 5)又はメタノール(CBB reagent 6)を使用しCBBを完全に溶解させ、CBB沈殿を防ごうと考えた。

CBB reagent 5を調製後1日目の結果を図3eに示す。reagent blankはreagent 2: 1.333に対してエタノール濃度の上昇によって1.430に増加してしまった。各BSA量に対する3重データのCV値も1.94-4.92%と高く、再現性は低下し、標準曲線の一次回帰式($y=0.0258x+1.430$)の相関係数($r=0.8920$)も低下し、直線性は悪かった。この原因は、発色系におけるCBBの微細な沈殿生成の防止を目的にしてreagent 5を調製したが、発色系において多量の沈殿を生じたためと考えられる。ここで発生した沈殿は高濃度のエタノールによってタンパク質がアルコール沈殿したものと考えられた。reagent 5の保存中にCBB沈殿は生じなかったが、BSA $1\mu\text{g}$ 当たりの発色率の低下(reagent 5調製後50日目までの発色率の一次回帰式: $y=-1.31\times 10^{-4}x+0.0281$)は改善されなかった(図5d)。

次にreagent 5でのエタノールの代わりにメタノールを使用し純水を加えずに調製したreagent 6について調製後1日目の結果を図3fに示す。reagent blankはエタノールを使用したreagent 5 (1.430)に較べて1.164迄ca.20%低下しred formへの平衡の偏りが大きくメタノールの使用は効果的であった(図3f)。同じメタノール使用のreagent 4 (1.331)と比較してもca.13%低下した。各BSA量に対する A_{595} の3重データのCV値も0.63-2.54%程度でreagent 5の場合のように再現性は大きく低下しなかった。従って標準曲線の一次回帰式($y=0.0299x+1.164$)の相関係数($r=0.9810$)もreagent 5に較べてほぼ良好なものであった。しかしながら、発色系におけるアルコールによる沈殿生成はreagent 5と同様に観察された。

一方BSA $1\mu\text{g}$ 当たりの発色率の経日による低下(reagent 6調製後49日目までの発色率の一次回帰式: $y=-9.71\times 10^{-5}x+0.0315$)はreagent 4 (メタノール使用)とオーダーがほぼ同じで(-2.60×10^{-5})、試薬の保存におけるCBB溶解性にメタノールが効果的であることが裏付けられた(図5e)。又、reagent 5 (-1.31×10^{-4})と比較すると安定性がca.34%向上した。

更に、reagent 5及び6についてのBSA $1\mu\text{g}$ 当たりの発色率の比較については、エタノール使用のreagent 5 (0.0258)の場合よりもメタノール使用のreagent 6 (0.0299)の方が感受性がca.16%高かった。ここまでの結果では、CBBの溶

媒としてはエタノールよりメタノールの方が適当であることが確認できた。

CBB reagent 7及び8

ここまで発色系におけるreagent blank A_{595} を低下させる目的でリン酸濃度及びエタノール濃度を変化させた試薬を調製して調べた結果、リン酸濃度の上昇によって、Read and Northcote (1981)も言及しているようにreagent blankの低下に一定の効果が観察され(CBB reagent 1、2及び3)、一方、エタノール濃度の上昇によってblueformが増加し、reagent blankもそれと共に増加した(CBB reagent 2及び6)。しかしながらリン酸濃度の上昇法によるreagent blank A_{595} の低下には限界があったので、CBB濃度を半減させることにした。reagent 2のCBB濃度を減少させたreagent 7を調製して標準曲線作成実験を行った。

CBB reagent 7を使用しての結果を図4aに示す。reagent blank A_{595} はreagent 2の1.333 A_{595} に対して0.531 A_{595} となり、CBB濃度の半減によってca.40%相当にまで低下した。各BSA量に対する A_{595} 3重データのCV値は1.54-6.69%程度でreagent 2に較べて再現性は低下した。BSA量 $5\mu\text{g}$ 以上の範囲(5, 7, & $9\mu\text{g}$)の発色系においては浮遊物等が発生したので、このことが再現性低下の原因と考えられる。しかしながら、標準曲線の一次回帰式($y=0.0361x+0.531$)の相関係数は $r=0.9910$ となり比較的高い相関を示し、BSA $1\mu\text{g}$ 当たりの発色率はreagent 2の0.0325 A_{595} からreagent 7の0.0361 A_{595} へとCBB濃度を低下させたことによってca.10%上昇した。一方、発色率の経日変化(reagent 7調製後50日目までの発色率の一次回帰式: $y=-1.15\times 10^{-4}x+0.356$)は一次回帰式の傾きが約1.8倍大きくなり、劣化しやすい傾向が見られた(図6a)。

CBBの溶媒としてメタノールを使用した場合CBB reagentの経日保存に対する安定性が良くなったので(reagent 4&6)、reagent 7のエタノールの代わりにメタノールを使用したCBB reagent 8を調製した。その結果を図4bに示す。reagent blank A_{595} は、エタノールでのreagent 7でもメタノールでのreagent 8でもあまり違いが無く、reagent 7での0.531 A_{595} に対してごく僅かに(ca.2%)上昇し0.543 A_{595} となった。各BSA量に対する A_{595} 3重データのCV値は0.26-2.29%程度で再現性はreagent 7と比較してかなり良好であった。標準曲線の一次回帰式は $y=0.0365x+0.543$ となり、BSA $1\mu\text{g}$ 当たりの発色率はエタノール使用のreagent 7の0.0361に対してreagent 8の0.0365となり、ごく僅か(ca.1%)であるが上昇傾向にあった。

一方reagent 8の経日安定性については、試薬調製後64日目までの発色率の経日変化の一次回帰式は $y=-1.06\times 10^{-4}x+$

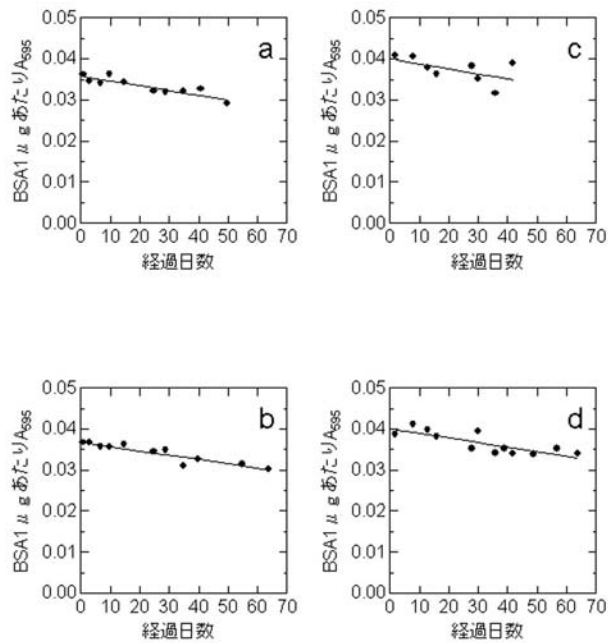


図6. CBB reagent 7-10 (0.025% (w/v) CBB) の発色率の経日変化. 各CBB reagentを用いて標準曲線を作成し各日数に於ける傾き(BSA 1 μ gあたりの A_{595})をプロットした. a, CBB reagent 7 (1次回帰式, $y = -1.15 \times 10^{-4}x + 0.0356$; mean $0.0333 \pm S.E. 6.91 \times 10^{-4}$; CV, 6.56%). b, CBB reagent 8 (1次回帰式, $y = -1.06 \times 10^{-4}x + 0.0366$; mean $0.0340 \pm S.E. 7.62 \times 10^{-4}$; CV, 7.08%). c, CBB reagent 9 (1次回帰式, $y = -1.23 \times 10^{-4}x + 0.0398$; mean $0.0374 \pm S.E. 1.08 \times 10^{-3}$; CV, 8.15%). d, CBB reagent 10 (1次回帰式, $y = -1.13 \times 10^{-4}x + 0.0398$; mean $0.0365 \pm S.E. 7.80 \times 10^{-4}$; CV, 7.41%).

0.0366となり、reagent 7 ($y = -1.15 \times 10^{-4}x + 0.0356$)と全く同じ傾向を与え、reagent 7 (エタノール使用)及び8 (メタノール使用)の間に安定性の違いはなかった(図6b)。

CBB reagent 9及び10

試薬中のエタノール濃度が高い場合にはCBBのblue formが増加し結果としてreagent blank A_{595} が高くなった(reagent 2 & 5)。しかしメタノールの場合には濃度を増加させた場合には逆にreagent blank A_{595} は低下した(reagent 4 & 6)。reagent 7&8ではCBB濃度を半減したので、上記の事実を検証するためにreagent 7&8のエタノールとメタノールの濃度を半減させたreagent 9及びreagent 10を調製した。

reagent 9を使用している結果を図4cに示す。reagent blankについてはreagent 2&5の傾向が同じように観察されるかを検討したが、reagent 7と比較すると、reagent 9はエタノール濃度が低下し本来blue formの減少によって A_{595} が低下すると考えられたが、結果はreagent 7 (0.531)より増加し0.556 A_{595} となった。従って、CBBへのエタノール濃度の影響はCBB濃度によって異なり一定の傾向は示さないものと思われる。

reagent 9での標準曲線の一次回帰式は $y = 0.0407x + 0.556$ となり、相関係数($r = 0.9941$)からも妥当な再現性が得られたと思われる。発色率についてはreagent 7 (0.0361)と較べて、

reagent 9は0.0407となりca.13%上昇したが、BSA量5 μ g以上の範囲(5, 7, 9 μ g)において発色系で浮遊物を生じ A_{595} がばらつき、再現性が低下する場合は時としてみられた。reagent 9の発色率の経日変化については図6cに示すように調製後42日目までの発色率の一次回帰式は $y = -1.23 \times 10^{-4}x + 0.0398$ となり、reagent 10と殆ど同じ傾向を示した。

reagent 10を使用している結果を図4dに示す。メタノールを使用した場合にもreagent 4&6において観察されたメタノール濃度が増加した場合reagent blank A_{595} が1.331から1.164に低下した現象がreagent 8と10の間でも観察されるかどうか即ちreagent 10においてreagent blank A_{595} が上昇するかどうかを検討した。reagent 10のreagent blank A_{595} は0.530となり、reagent 8の0.543からca.2.4%低下し、この事実はreagent 4&6の傾向とは逆のものであり、メタノールの場合もreagent blankに対する影響の仕方はCBB濃度によって異なり、一定の傾向は得られなかった。又、reagent 10のreagent blank A_{595} (0.530)は、reagent 9のもの(0.556)と較べて低くなった。

一方、reagent 10による標準曲線の一次回帰式は $y = 0.0386x + 0.530$ (相関係数 $r = 0.9917$)となり(図4d)、BSA 1 μ g当たりの発色率はreagent 9 (0.0407)より低かった。しかしながらreagent 10での発色系においては、何れのBSA量においても沈殿を生じず、又経日保存においてもCBB reagent中に沈殿を生じず、更に調製後64日目までの発色率の経日変化の一次回帰式は $y = -1.13 \times 10^{-4}x + 0.0398$ となり、安定性はreagent 9と殆ど変わりがなかった(図6d)。

以上の検討結果から、発色率はCBB reagent 9 (Factor 0.0407)が最も高かったが、reagent 10は、発色系において沈殿等の浮遊物を生じず安定な発色系で、更にreagent blank A_{595} (0.530)も低く、そして経日保存に対してreagent自身にもCBB沈殿を生じず安定で、タンパク質定量用高感度試薬として使用できると結論した。

現在、調製後約2年間経過したreagent 10は、保存中もCBB沈殿を生じることなく、未だに安定で、充分使用に耐えるタンパク質定量用高感度試薬であると考えられる。

参考文献

- Bearden, Jr. J. C. 1978. Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochim. Biophys. Acta*, **533**: 525-529.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

- Folin, O. and Ciocalteu, V. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* **73**: 627-650.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. S., and David, M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**: 751-766.
- 橋本吉雄、有馬俊六郎、齊藤善一、遊佐孝五、土屋禎造、森本明、吉田稔、大浦義教、入江俊三、渡辺芳男、祐川金次郎、行徳晴美、神木寿一、末永保子 1964. アミドブラック10Bによる乳蛋白比色定量法. 第1報 ケルダール法との相関及び色素液の影響. 畜産の研究 **18**: 1173-1174.
- Kirschenbaum, D. M. 1970. Selected data for molecular biology. *In Handbook of Biochemistry. Edited by H. sober.* 2nd ed., pp. C71-C98. Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- McKnight, G. S. 1977. A colorimetric method for the determination of submicrogram quantities of protein. *Anal. Biochem.* **78**: 86-92.
- Nakao, T., Nakao, M., and Nagai, F. 1973. Microdetermination of protein not affected by the presence of various buffers, sucrose, ATP, and eluates from polysaccharide derivatives. *Anal. Biochem.* **55**: 358-367.
- Peterson, G. L. 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* **100**: 201-220.
- Read, S. M. and Northcote, D. H. 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**: 53-64.
- Sedmak, J. J. and Grossberg, S. E. 1977. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* **79**: 544-552.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- (CBB) for protein microassay has been prepared. At first, the high sensitive coloration system (0.1mL protein solution and 1mL Bradford reagent) was examined with Bradford reagent (0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v) ethanol-8.5%(w/v) phosphoric acid) according to Bradford (1976) using BSA(0-9 μ g) as a standard. The Bradford reagent produced CBB precipitate just after preparation and during storage, so filtration of it was needed before every use. Therefore, calibration of the Bradford CBB reagent due to change in CBB concentration should be carried out, which required time. These demerits had not been overcome by our modifications of the Bradford reagent. Thus we developed a stable, sufficiently available CBB reagent without CBB precipitate during storage. The CBB reagent is the 0.025%(w/v) CBB-12.5%(v/v) methanol-70.83%(w/v) phosphoric acid. The protein coloration with CBB was done at 0.8mL protein solution(0-9 μ g protein) and 0.2mL CBB reagent.

Key words: CBB dye-binding assay; dye-binding assay; protein assay; CBB G250; CBB binding assay.

Summary

The high sensitive reagent using Coomassie brilliant blue G250