

Lowry 法によるタンパク質定量

横国-大矢勝研究室メモ (2020年1月7日版)

1. Lowry 法とは

フェノール試薬がアルカリ性で、タンパク質中のチロシン、トリプトファンおよびシステインと反応して青色を呈す現象、及び Cu^{2+} がアルカリ性でタンパク質と反応するとペプチド鎖中の窒素と結合して錯体を形成し赤紫色に発色する現象 (Biuret 反応) の両方の原理を用いたタンパク質の定量法である。

2. 手順

2-1. 試薬の調製

初めに下記の A~D の試薬を調製する。

A : 2% Na_2CO_3 (0.1 N NaOH 水溶液中)

B : 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1% 酒石酸カリウムナトリウム水溶液中)

C : アルカリ性銅溶液 (試薬 A : 50 mL と試薬 B : 1 mL とを混合)

D : 1/2 希釈フェノール試薬

2-2. 呈色手続き

次に各濃度に調整したタンパク質液 2 mL を試験管にとり、試薬 C 10 mL を加えて試験管ミキサーでよく混合し、10 min 放置した後 1 mL の試薬 D をすばやく添加し直ちに試験管ミキサーで混合する。30 min 放置した後、分光光度計を用いて吸光度をそのタンパク質の最大吸収波長 (約 750 nm 程度になるだろう) で測定する。実験は全て 20 ± 2 °C の条件下で行う。

3. 注意点

構成アミノ酸の種類で感度が変わる。また、還元物質によって発色が妨害されるほか、界面活性剤、グリセロール、EDTA などにより沈殿物を生じて定量を妨害するという欠点がある。界面活性剤が共存しても定量可能な改良法として BCA (ビスンコニン酸) 法がある。

参考文献

鈴木祥夫, 総タンパク質の定量法, ぶんせき, (2018_1) p2-9

<https://www.jsac.or.jp/bunseki/pdf/bunseki2018/201801nyuumon.pdf>