

### 序 文

蛋白質は細胞のほとんど全ての代謝経路に関与しています（例えば酵素反応、免疫防御、細胞応答など）。蛋白質濃度の測定はライスサイエンス研究で、しばしば行われます。注意点として、多くのアッセイが利用されている中でサンプルのタイプに最適なアッセイを選択して行わなければなりません。使用するアッセイの決定は、利便性、蛋白質の量、そして純度に基づきます。また色素の吸収極大を利用してラベル化した蛋白質を測定することも可能です。色素濃度と取りこみ頻度は自動的に計算され、表示されます。

このテクニカルノートでは、280nm（蛋白質 UV280）の微量の蛋白質定量を使用し、直線性と精度の観点から NanoPhotometer NP80 の性能を説明します。蛋白質は主に芳香族アミノ酸のフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンによって 280nm での特異的な吸収スペクトルを示します。Lambert-Beer の法則によってサンプル中の蛋白質の濃度を決定できます。この UV に基づく濃度測定は蛋白質の純度と一次配列に強く依存します。蛋白質サンプルに存在する一部成分は強い UV 吸収を示すため、補正が必要です。

NanoPhotometer のユニークな特長である Blank Control は、バッファーやコンタミネーションによりバックグラウンド高くなった場合、ユーザーに警告します。「テクニカルノート 3. ブランクコントロール」および本書パフォーマンスデータ（P.3~P.4）をご参照ください。

### 材料と方法

Sigma-Aldrich 社 Bovine serum albumin solution A7284 (Lot.SLBP4169V) をストック溶液として使用し、1xPBS バッファーで希釈しました。希釈率は微量天秤（Satorius BP221S）で重量を測定し算出しました。

吸光度の予測値は 10 mm 石英ガラスキューベット（Hellma Analytics 100-QS）および UV/VIS 分光光度計 UVIKON（S/N:110178）で測定しました。

全ての測定は NanoPhotometer NP80（S/N:M80706）で行いました。それぞれの蛋白質サンプルは 1 µL で、使用前の希釈なしで 5 回ずつ測定しました。測定前に毎回ボルテックスし、サンプルの均一性を確実にしました。測定後、測定部とフタは少し湿らせたリントフリーの布で綺麗にふいた後、新たなサンプルをアプライしました。

### 結果（精度）

表 1 では蛋白質濃度の予測値と 5 回の測定の平均値を示しています。また各サンプルの測定値の標準偏差、および光路長（0.67mm もしくは 0.07mm）を示しています。

Table1: 平均吸光値・標準偏差・光路長

| Expected mg/ml | Mean mg/ml | SD     | Path length |
|----------------|------------|--------|-------------|
| 0.04           | 0.02       | 0.0003 | 0.67 mm     |
| 0.08           | 0.04       | 0.0003 | 0.67 mm     |
| 0.24           | 0.16       | 0.0004 | 0.67 mm     |
| 0.71           | 0.63       | 0.0004 | 0.67 mm     |
| 1.40           | 1.33       | 0.0004 | 0.67 mm     |
| 5.67           | 5.39       | 0.0009 | 0.67 mm     |
| 10.65          | 10.18      | 0.0010 | 0.67 mm     |
| 19.86          | 19.07      | 0.0029 | 0.67 mm     |
| 39.10          | 38.68      | 0.0035 | 0.67 mm     |
| 68.33          | 64.42      | 0.0058 | 0.07 mm     |
| 127.22         | 125.48     | 0.0021 | 0.07 mm     |
| 175.93         | 176.49     | 0.0168 | 0.07 mm     |
| 218.40         | 222.62     | 0.0082 | 0.07 mm     |
| 276.98         | 278.26     | 0.0151 | 0.07 mm     |

## #5 蛋白質 UV パフォーマンスデータ

### 結果（直線性）

0.0380~276.98mg/mL の測定結果から得られた直線性のカーブは、予測値と 0.9997 の決定係数 ( $R^2$ ) の間で密接な相関関係を示しています（図 1）。

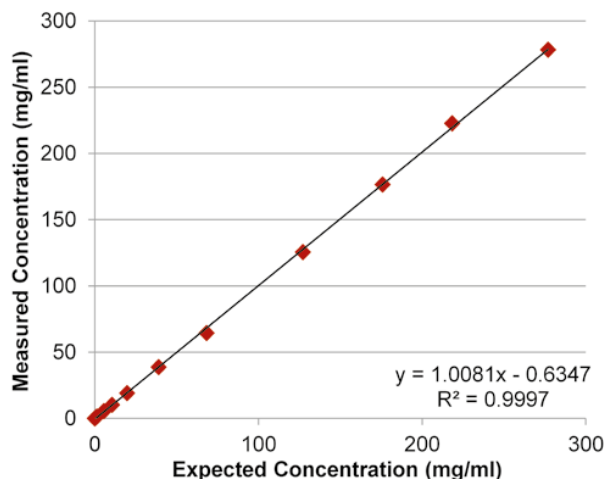


図 1 : 0.038~276.98 mg/mL の測定結果

図 2 は、光路長 0.67mm（希釈率：15 倍）における、低濃度のサンプル測定の場合の直線性を示します。

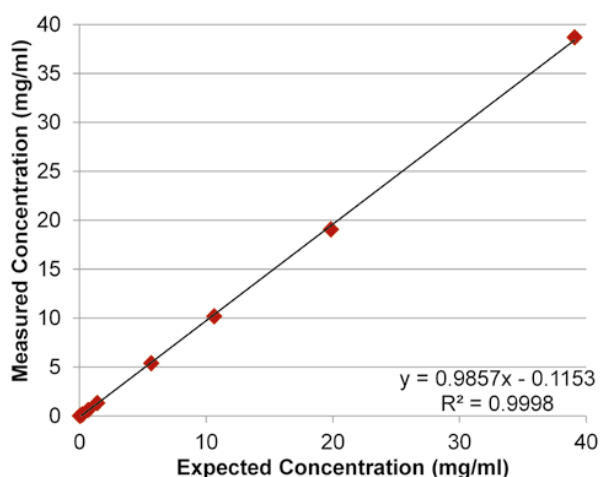


図 2 : 0.038~39.097 mg/mL の測定結果（光路長 0.67mm）

### 吸光度比

NanoPhotometer NP80 は、260/280 の値を計算し、サンプルへのコンタミネーションを確認します。260/280 の値は、主に核酸の混入を示します。

精製した蛋白質は、260/280 は 0.57 付近を示します。このテクニカルノートで使用された蛋白質サンプルの 260/280 値は、0.705~276.8 mg/mL の範囲で、0.585~0.636 でした。

図 3 は 68.326~276.98 mg/mL の高濃度のサンプル測定の場合の直線性を示しています。

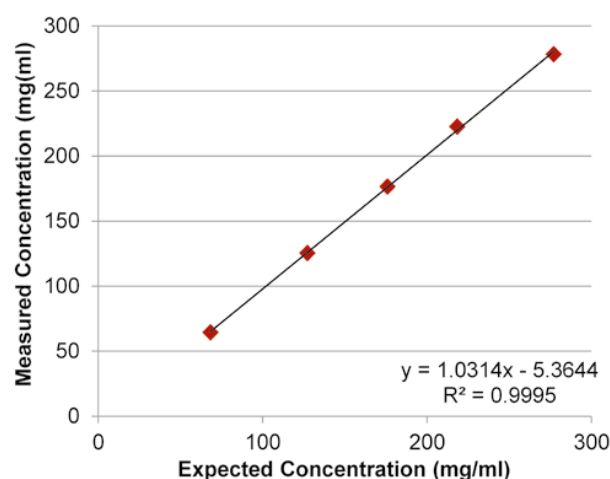


図 3 : 68.326~276.98 mg/mL の測定結果（光路長 0.07mm）

### キャリーオーバー（残存サンプルの可能性）

高濃度の蛋白質サンプルは粘性が高いことで知られています。少し湿ったリントフリーでふき取ることが適切であることを示すためにブランク溶液（1 x PBS）を蛋白質サンプル測定後に 5 回測定しました。蛋白質は検出されず、280nm での吸収はありませんでした。280nm（光路長 0.67 mm）での吸収は、ランプの特性変動（±0.002A）によるもののみでした。

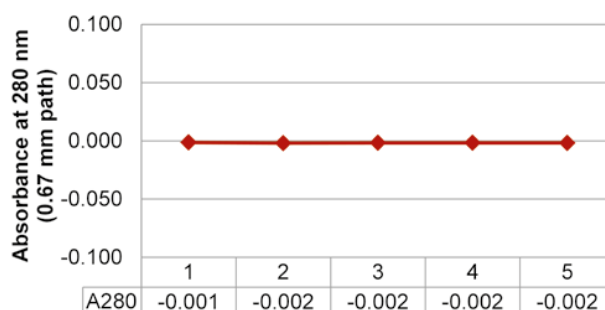


図 4 : 1xPBS の測定結果（光路長 0.67mm）

## #5 蛋白質 UV パフォーマンスデータ

### ディスカッション

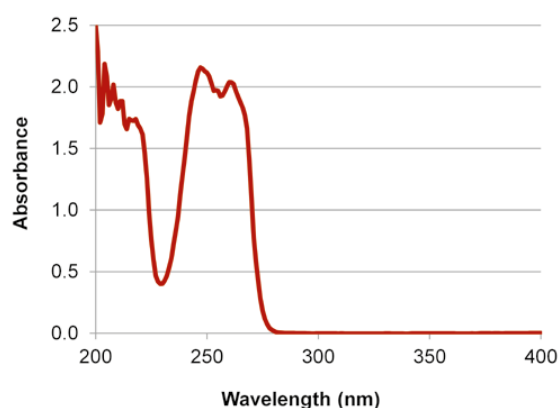
このテクニカルノートは、蛋白質サンプルの測定において NanoPhotometer が 0.9997 の決定係数 ( $R^2$ ) の綺麗な直線性を持つことを示します。さらに 2つの光路長がこの優れた精度と直線性に十分であることを証明します。2つの固定されたアンカーポイントと密封された装置の設定はサンプルが測定されるたびに正確な性能を保証します。図1では広い濃度範囲で、図2・図3は低/高濃度に焦点を当てています。結果は明確に NanoPhotometer の検出限界範囲内での精度と直線性に高い信頼があることを示しています。

### サマリー (概要)

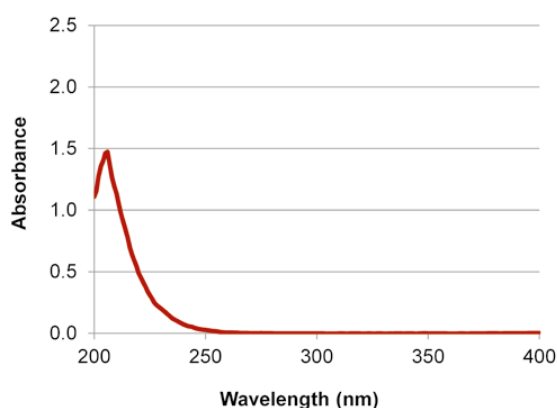
このテクニカルデータは、装置の検出範囲内で NanoPhotometer の高い精度と直線性を示しています。2つの正確な固定光路長と、密閉された光学環境と器械的な動的部分が排除された独自の True Path Technology を利用しています。NanoPhotometer は、True Path Technology を持つ唯一の装置で、寿命まで再校正を必要としないことを示しています。

### Appendix 1

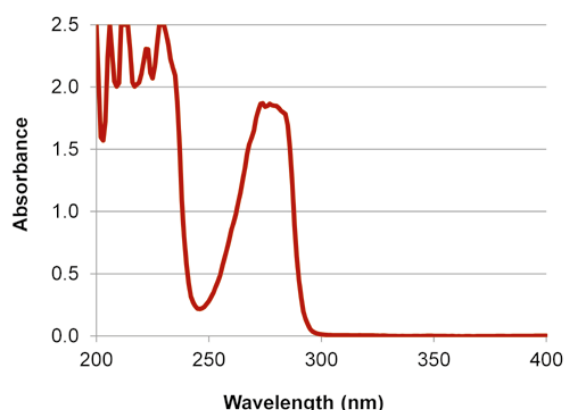
#### NDSB



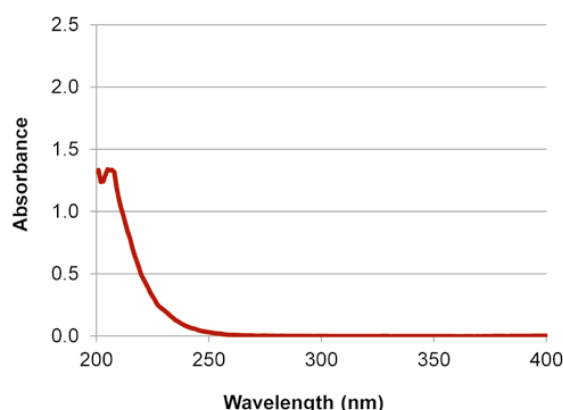
#### T-PER



#### RIPA

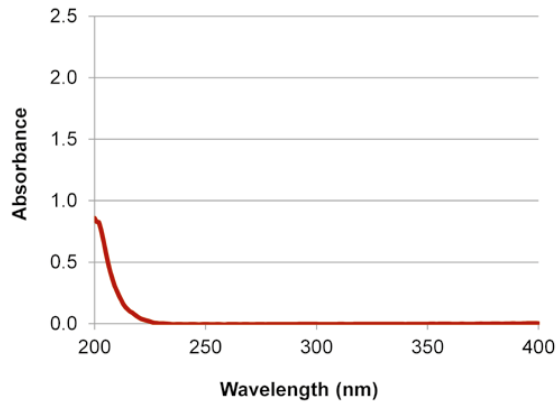


#### M-PER

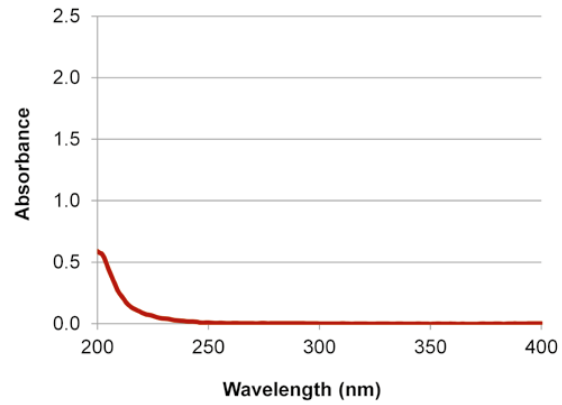


## #5 蛋白質 UV パフォーマンスデータ

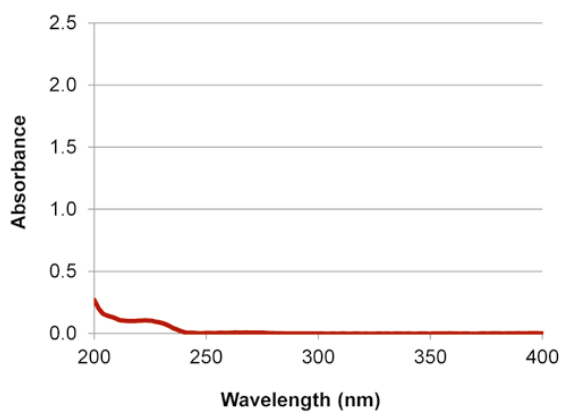
CHAPS



DTT



PROTEASE INHIBITORS



HEPES

