

アミノ酸組成分析による たん白質の定量及び分子吸光係数の算出

分子量及びアミノ酸組成が既知のたん白質試料であれば、塩酸加水分解後に各アミノ酸をアミノ酸分析計で定量することにより、正確なたん白質濃度及び分子吸光係数を算出することが可能である。本ポスターでは、リゾチームについて分析した例を示す。

リゾチームのアミノ酸配列

KVFGRCLEAA AMKRHGLDNY RGYSLGNWVC AAKFESNFNT QATNRNTDGS
TDYGILQINS RWWCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA SVNCAKKIVS
DGNMNAWVA WRNRCKGTDV QAWIRGCR

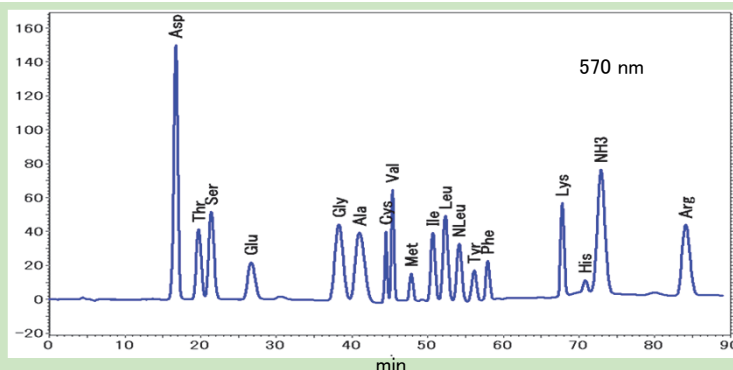
残基数 129

分子量 14307

たん白質の定量

6 mol/L塩酸で加水分解し、各アミノ酸濃度をアミノ酸分析計で測定した。塩酸加水分解での回収率のよいアミノ酸*とその残基数から、試料中のアミノ酸濃度を算出した。アミノ酸濃度を残基数で除することにより、たん白質濃度を求めた。

*: 第16改正日本薬局方、参考情報、G3. 生物薬品関連 アミノ酸分析法に記載のある下表のアミノ酸



装置: アミノ酸分析計(株)日立ハイテクノロジーズ
測定条件: 特殊アミノ酸分析条件

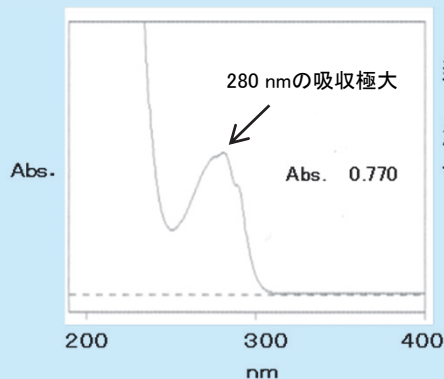
アミノ酸	アミノ酸濃度 ($\mu\text{mol/mL}$)				理論 残基数	分子量	たん白質濃度	
	n=1	n=2	n=3	平均値			($\mu\text{mol/mL}$)* ¹	
							平均値 57.2	(mg/mL)* ²
Aspartic acid	1.1497	1.1860	1.2021	1.1793	21	14307	56.2	0.818
Glutamic acid	0.2741	0.2832	0.2872	0.2815	5		56.3	
Alanine	0.6697	0.7002	0.7019	0.6906	12		57.6	
Leucine	0.4462	0.4642	0.4623	0.4576	8		57.2	
Phenylalanine	0.1661	0.1740	0.1730	0.1710	3		57.0	
Lysine	0.3329	0.3564	0.3476	0.3456	6		57.6	
Arginine	0.6217	0.6522	0.6513	0.6417	11		58.3	

*¹ たん白質 ($\mu\text{mol/mL}$) = アミノ酸の濃度 ($\mu\text{mol/mL}$) / アミノ酸の理論残基数 \times 1000

*² たん白質 (mg/mL) = たん白質濃度の平均値 ($\mu\text{mol/mL}$) \times 分子量 / 1000 / 1000

吸光度の測定

チロシン、トリプトファンに由来する280 nmの吸光度を測定した。



装置: 分光光度計
(株)日立製作所
測定条件
セル長: 1 cm
レファレンス: 水

分子吸光係数の算出

たん白質濃度と280 nmの吸光度から、分子吸光係数及び比吸光度を算出した。

$$\text{比吸光度} \quad E_{1\text{cm}}^{1\%} = A / (C_{\%} \times l)$$

$$\text{分子吸光係数} \quad \epsilon = A / (C_{\text{mol}} \times l)$$

たん白質濃度		吸光度(A)	セル長(l)	比吸光度	分子吸光係数
(mol/L)	(w/v%)	(Abs.)	(cm)	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	ϵ
57.2×10^5	8.18×10^2	0.770*	1	28.2	40385

*: 吸光度は3倍希釈して測定

「申請試料の信頼性の基準」(薬事法施行規則第43条)にて対応可能です