APPLICATION NOTE

基于 BCA 法的蛋白质定量-SpectraMax iD5

Carole Crittenden | Applications Scientist | Molecular Devices
Cathy Olsen, PhD | Sr. Applications Scientist | Molecular Devices
Marissa Statner | Intern | Molecular Devices

简介

BCA 法是一种通过比色分析来对蛋白质进行定量的方法。该方法利用蛋白在碱性环境中将 Cu^{2+} 还原成 Cu^{+}，BCA 与 Cu^{+} 形成有颜色的络合物。该水溶液络合物在特定波长下有强烈的吸光值，且在一定范围内蛋白浓度与光吸收值成正比，这就使得我们可以利用微孔板读板机进行高通量、高灵敏度的蛋白定量检测。早期的 PierceTM BCA 蛋白检测试剂盒需要 37°C 孵育 30 分钟，在 562 nm 处检测光吸收变化。新版 Pierce Rapid Gold BCA 蛋白检测试剂盒仅需室温孵育 5 分钟就会产生强烈的橙-金络合物，在 480 nm 处检测。

SpectraMax iD5 多功能微孔板读板机具有光吸收检测功能，可以进行蛋白定量检测。下面，我们介绍一下如何用 SpectraMax iD5 配套 SoftMax®Pro 软件，用 Pierce BCA 蛋白检测试剂盒和 Pierce Rapid Gold BCA 蛋白检测试剂盒进行检测。以上试剂盒均包括标准品牛血清白蛋白，SoftMax Pro 预设的模板可以根据标准曲线将待测蛋白的浓度自动计算出来。Pierce Rapid Gold BCA 蛋白检测试剂盒仅需室温孵育 5 分钟相比 Pierce BCA 试剂盒 37°C 孵育 30 分钟，可节省大量时间且提高操作简便性。

材料

- SpectraMax iD5 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices cat.#ID5-STD)
- Pierce BCA 蛋白检测试剂盒 (ThermoFisher Scientific cat.#23225)
- Pierce Rapid Gold BCA 蛋白检测试剂盒 (ThermoFisher Scientific cat.#A53225)
- RIPA 缓冲液 (ThermoFisher Scientific cat.#89900)
- 蛋白抑制剂混合物 (ThermoFisher Scientific cat.#78430)
- 96 孔透明平底聚苯乙烯微孔板 (Greiner Bio-One cat.#655101)
- 293 [HEK-293] 细胞 (ATCC cat.#CRL -1573)

优势

- 蛋白定量速度快，仅需室温孵育 5 分钟
- 利用 SpectraMax iD5 多功能微孔板读板机可在更低的背景噪音下进行检测
- SoftMax Pro 软件里预设的程序会自动做出标准曲线并给出待测蛋白的浓度

方法

HEK-293 细胞在 T 75 细胞培养瓶中培养。先用 10 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗细胞，加入 2 mL RIPA 缓冲液孵育 5 分钟，枪头上下吹打数次使得瓶壁上的细胞也消化下来。将消化液均分至 2 个 1.5 mL 离心管中，加入蛋白抑制剂。消化液 15000 rpm 离心 20 分钟，收集上清作为待测样本，以 3 倍梯度稀释待测样本。梯度稀释是为了待测样本浓度在标准曲线检测范围内。

BSA 标准品根据各自试剂盒中的操作说明准备。试剂 A 和试剂 B 按照 50：1 配置，得到 12 mL BCA 工作液。将 25 µL 的蛋白标准品和待测细胞样本分别加入 96 孔透明微孔板中，每个样本 3 个重复。其中一个微孔板加入 200 µL BCA 工作液，另一个加入 200 µL Rapid Gold BCA 工作液。BCA 检测试剂板 37°C 孵育 30 分钟，Rapid Gold BCA 检测试剂板室温孵育 5 分钟。

用 SpectraMax iD5 多功能微孔板读板机读取光吸收值，采用预设的 BCA 分析程序 (SpectraMax iD3 多功能微孔板读板机与 SpectraMax iD5 有同样优异的光吸收检测表现，同样适用该类检测) 进行检测。BCA 检测板在 562 nm 检测光吸收值，预设程序中检测波长就是 562 nm，无需做任何更改即可直接读板；BCA Rapid Gold 检测板在读板前需要更改检测波长至 480 nm。

SoftMax Pro 软件已根据检测试剂盒说明书预设了标准曲线，读板后会自动拟合出一条 BSA 标准曲线。每次分析都可以用标准曲线来计算 HEK-293 细胞样本中的蛋白浓度。图 1 是两个试剂盒的工作流程。

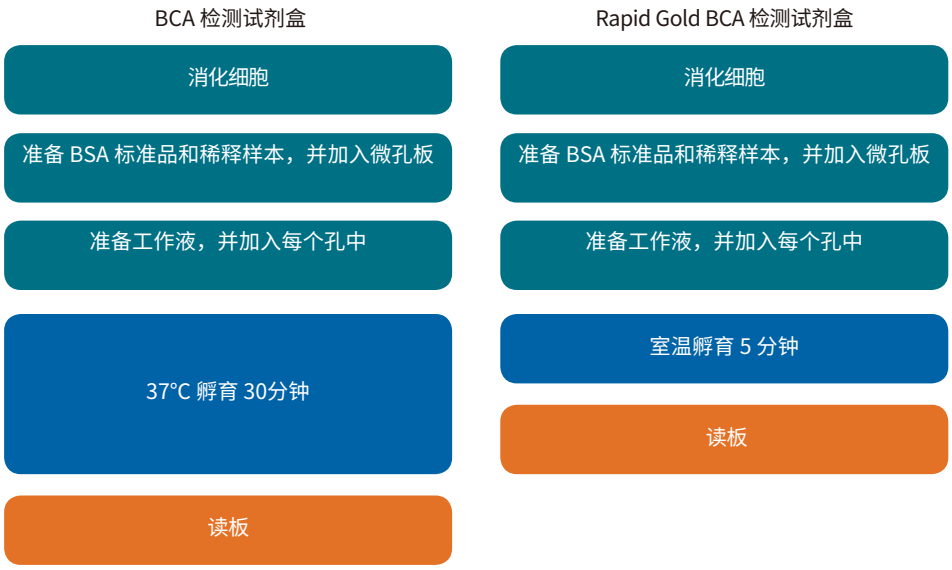


图 1 比较两种检测试剂盒的工作流程。上图是 BCA 检测试剂盒和 Rapid Gold BCA 检测试剂盒的实验流程图。BCA 检测试剂盒需要 37°C 孵育 30 分钟，而 Rapid Gold BCA 检测试剂盒仅需室温孵育 5 分钟

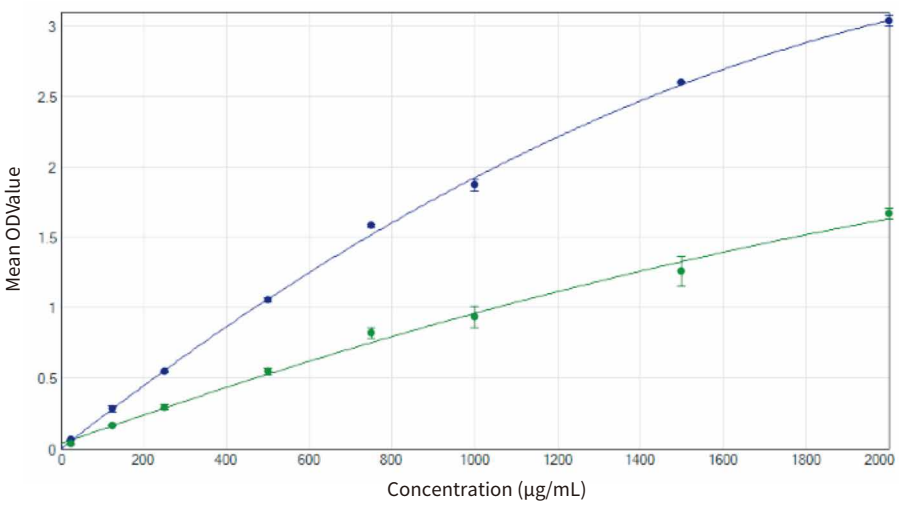


图 2 BSA 标准曲线。标准曲线在 SoftMax Pro 软件中采用二次曲线拟合，其中 BCA 检测试剂盒为绿色，Rapid Gold BCA 为蓝色。BCA 检测试剂盒的 $r^2 = 0.997$，Rapid Gold BCA $r^2 = 0.999$。每个样本有 3 个复孔，n = 3

结果

BCA 和 Rapid Gold BCA 检测试剂盒的 BSA 标准曲线采用二次曲线拟合 r^2 值都大于 0.99（图 2）。Rapid Gold BCA 检测试剂盒的 BSA 标准品无论低浓度还是高浓度的 OD 值都大于 BCA 检测试剂盒的。

在 SoftMax Pro 软件中，未知样品蛋白浓度会自动带入标准曲线中计算出来，并以表格形式在软件中显示（表 1 是 Rapid Gold BCA 检测试剂盒的待测样本浓度）。

用 Rapid Gold BCA 检测试剂盒，计算得出原始蛋白浓度是 680 µg/mL，BCA 检测试剂盒是 640 µg/mL。以上两个不同 OD 值范围标准曲线用 SpectraMax iD5 多功能微孔板读板机得出了相近的蛋白浓度。

结论

Rapid Gold BCA 检测试剂盒仅需室温孵育 5 分钟，与原来的 BCA 检测试剂盒 37°C 孵育 30 分钟相比，可节省大量时间，提高工作效率。两种检测试剂盒的标准曲线都得出了出色的 r^2 和相近的待测样品浓度。

SpectraMax iD5 多功能微孔板读板机能够快速、精准的进行光吸收检测，SoftMax Pro 软件中的预设程序能够直接给出标准曲线和未知样品浓度。预设程序包括读板设置和样品分组信息等设置，因此未知样品浓度可直接根据标准曲线计算出来，并在软件中显示。

Unk_Dilution

Sample	Wells	OD_Values	R	Concentration	MeanConc	SD	Dilution	AdjConc
01	B4	0.838		386	419	121.8	1.0	419
	B5	1.166		554				
	B6	0.698		317				
02	C4	0.486		217	209	33.4	3.0	626
	C5	0.529		237				
	C6	0.388		172				
03	D4	0.192		84	76	9.4	9.0	684
	D5	0.179		78				
	D6	0.151		66				
04	E4	0.056	R	24	25	3.4	27.0	679
	E5	0.066		29				
	E6	0.051	R	22				

表1 一组 Rapid Gold BCA 检测数据。每个检测出的 OD 值，都会自动带入标准曲线计算浓度。如果检测出的 OD 值超出了标准曲线的范围，会用“R”标出。每个样品的平均浓度都会对应一个校正浓度，校正浓度是根据每个样品的稀释倍数计算出的未稀释样品的浓度值。样本 02、03 和 04 的校正后浓度基本一致，估算出原始样本的蛋白浓度为 680 µg/mL

更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器（上海）有限公司
全国咨询服务热线：400-820-3586 www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com
上海 电话：86-21-3372 1088 传真：86-21-3372 1066 地址：上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335
北京 电话：86-10-6410 8669 传真：86-10-6410 8601 地址：北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124
成都 电话：86-28-6558 8820 传真：86-28-6558 8831 地址：成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016
台北 电话：886-2-2656 7585 传真：886-2-2894 8267 地址：台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼
香港 传真：852-2289 5385 地址：香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼

MOLECULAR DEVICES