

一种可准确分析蛋白浓度且快速、灵敏的蛋白定量方法

蛋白定量是许多实验室工作流程中不可或缺的一部分，通常是通过色谱、电泳或免疫化学技术进行分选、分离和分析之前的必要步骤。Thermo Scientific™ Pierce™ 蛋白定量产品具有出色的准确性、兼容性和广泛的适用性，可轻松对大多数实验室的蛋白样品进行定量（或量化）。蛋白定量方法的最新研发成果是Thermo Scientific™ Pierce™ Rapid Gold BCA快速蛋白定量试剂。该比色检测方法具有与经典BCA试剂相当的高灵敏度和线性范围，同时仅需极短的孵育时间即可开始测定。

Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂是基于经典BCA试剂而改进的一种方法，经优化后可在室温下快速完成孵育，仅需5分钟即可提供待读取的结果，免去了高温孵育的必要性

（图1）。与BCA定量方法相似，Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂也是在碱性环境下，使蛋白将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ （广为人知的双缩脲反应），然后通过一种新型铜整合剂进行高灵敏度和高选择性的比色检测。 Cu^{2+} 被还原的量与溶液中的蛋白浓度成正比。选择性铜整合剂会形成金橙色复合物，在480 nm处表现出最高的吸光度。

本文将提供数据以证明Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂的性能，并将其与多种众所周知且深受信赖的蛋白定量方法进行平行比较。

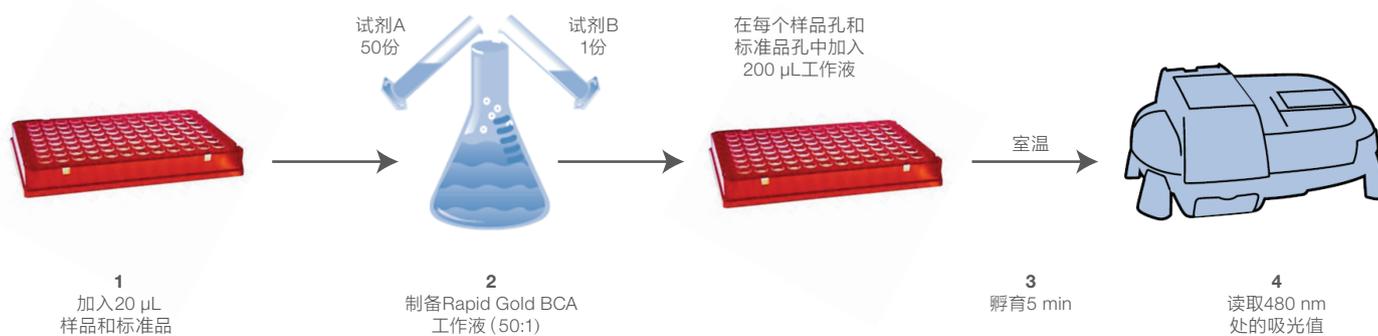


图1. Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量操作方案。

结果和讨论

线性度

1985年, Smith等人研发了现今被称为Thermo Scientific™ Pierce™ BCA蛋白定量的方法。从那时起, 它逐渐成为用于比色检测和总蛋白定量的最准确的方法。BCA法的一个主要优点是, 它可以生成线性反应曲线。该反应曲线可准确测定未知蛋白浓度, 并具有比其他标准定量方法更宽的动态范围。Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂可生成与标准BCA几乎相同的线性响应曲线 ($R^2 > 0.99$), 但它无需长时间孵育样品, 所以耗时极短 (图2A)。与经典BCA定量试剂相似, Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂具有宽动态范围, 可用于检测试管和微孔板中的蛋白浓度, 线性范围为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。此外, 两种定量试剂的性能相同, 而全新Rapid Gold试剂所需的样品量更少 (20 μL , 而经典BCA试剂需要25 μL)。当比较经典BCA与Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂进行蛋白浓度测定的结果时, 二者测得的复杂裂解物浓度相近, 检测间的变异系数 (CV) 为5.41% (图3)。

另一种常用于测定总蛋白浓度的简单比色方法是考马斯染料结合法 (例如Bradford定量)。这种快速、简单的定量方法可在室温下进行, 不需要使用特殊设备。Bradford蛋白定量试剂盒测量的是考马斯亮蓝G-250染料与碱性和芳香族氨基酸残基结合时的颜色变化。在试剂的酸性环境中, 蛋白与考马斯染料结合, 导致染料从红棕色形式 (最大吸收峰位于465 nm处) 到蓝色形式 (最大吸收峰位于595 nm处) 的光谱迁移。

这种定量方法虽然简便, 但存在标准曲线线性度差、线性范围较窄和蛋白间差异较大的缺点 (图2B)。与基于铜整合的BCA法相比, 这会导致更高的错误率和CV值。Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂的线性范围 (20-2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 比Bradford蛋白定量方法 (125-1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 更宽 (图2B)。

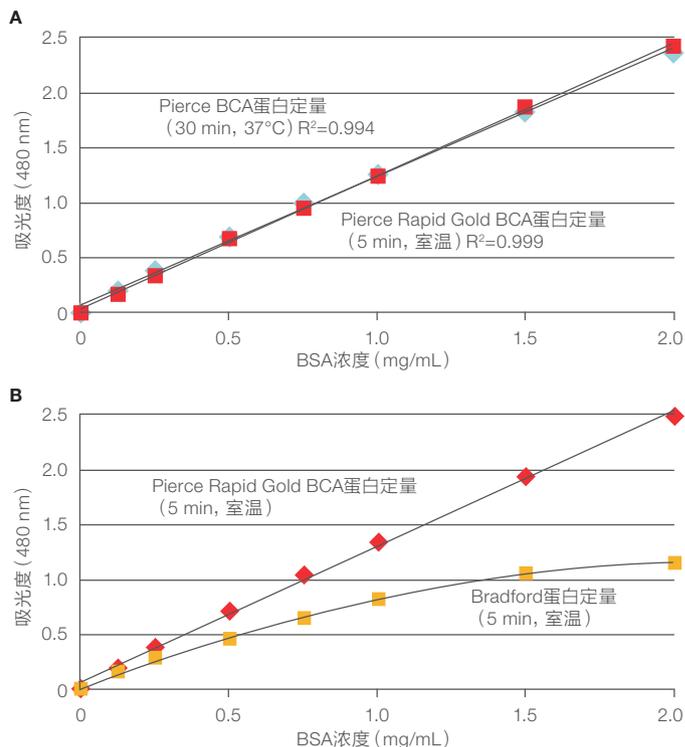


图2.蛋白定量标准曲线。(A) 使用溶于0.9%生理盐水中的纯化BSA (0-2 mg/mL) 生成Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量和经典BCA定量的标准曲线。两种定量实验均按照制造商的操作方案在微孔板中进行。对于经典BCA定量, 将25 μL BSA样品添加到200 μL BCA工作液中, 并在37°C下孵育30分钟。对于Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量, 将20 μL BSA样品添加到200 μL Rapid Gold BCA工作液中, 并在室温下孵育5分钟。(B) 使用(A)中所述的相同方式生成Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量和Bio-Rad™ Bradford蛋白定量的标准曲线。对于Bradford蛋白定量, 将10 μL BSA样品添加到200 μL Bradford试剂中, 并在室温下孵育5分钟。

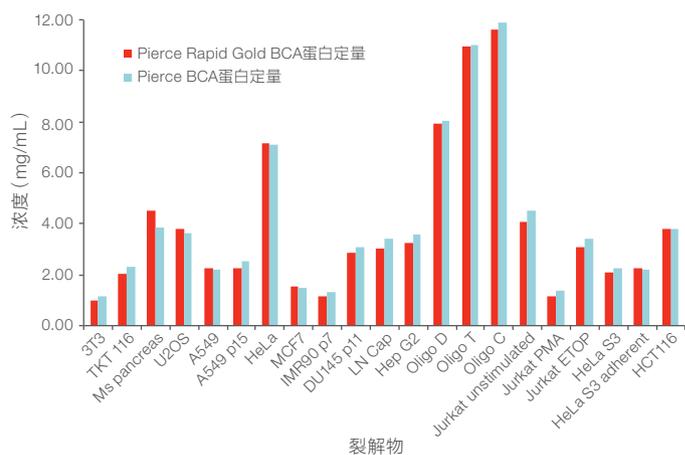


图3.使用经典Pierce BCA蛋白定量和Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂测定裂解物的浓度。两种定量实验均按照制造商的操作方案在微孔板中进行。对于经典BCA定量, 将25 μL 样品添加到200 μL BCA工作液中, 并在37°C下孵育30分钟。对于Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量, 将20 μL 样品添加到200 μL Pierce Rapid Gold BCA工作液中, 并在室温下孵育5分钟。

Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量结合了考马斯染料法定量的优势(快速、易于操作),以及BCA法的高质量,即具有更高的线性度和更准确的定量结果。

蛋白间差异

BCA蛋白定量的优势之一是较低的蛋白间差异。由于蛋白质的组成和结构各不相同,在一些定量方法中,蛋白质在氨基酸序列、等电点(pI)、二级结构和侧链或辅基上的差异会导致比色响应出现差异。表1展示了不同蛋白定量试剂预计的相对蛋白间差异水平。在选择蛋白定量方法时应当考虑这些

差异,尤其是当样品中蛋白质的相对颜色响应比率未知时。正如预期,基于相同化学反应原理的定量方法具有相似的蛋白间差异。此处所用的五种定量方法均使用标准操作方案在单次运行中对14种蛋白质进行检测。然后计算每种蛋白质的平均净(空白校正)吸光值。每种蛋白质的净吸光值表示为相对于BSA净吸光值的比率。如果一种蛋白质的比率为0.80,则意味着该蛋白质的吸光值相当于等量BSA的80%。Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂产生的蛋白间吸光值差异相对较低,CV为15.6%。

表1.常用蛋白定量方法的蛋白间差异。所有蛋白样品均采用标准试管方案进行定量,使用的蛋白浓度为1,000 µg/mL。每个数字代表相对于BSA的定量响应。未测试的样品用“x”标记。

	Pierce Rapid Gold BCA法	经典BCA法	Pierce考马斯法 (Bradford)	Coomassie Plus assay	Pierce 660 nm assay*
BSA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
醛缩酶,兔肌肉	1.22	0.85	0.76	0.74	0.83
α-胰凝乳蛋白酶原	1.46	1.14	0.48	0.52	x
细胞色素C,马心脏	1.27	0.83	1.07	1.03	1.22
丙种球蛋白,牛	1.58	1.11	0.56	0.58	0.51
IgG,牛	1.64	1.21	0.58	0.63	x
IgG,人	1.43	1.09	0.63	0.66	0.57
IgG,小鼠	1.40	1.18	0.59	0.62	0.48
IgG,兔	1.52	1.12	0.37	0.43	0.38
IgG,羊	1.24	1.17	0.53	0.57	x
胰岛素,牛胰腺	1.34	1.08	0.60	0.67	0.81
肌红蛋白,马心脏	0.96	0.74	1.19	1.15	1.18
卵清蛋白	1.18	0.93	0.32	0.68	0.54
转铁蛋白,人	1.16	0.89	0.84	0.90	0.80
平均比率	1.31	1.02	0.68	0.73	0.71
SD	0.20	0.15	0.26	0.21	0.27
CV (%)	15.6	14.7	38.2	28.8	37.0

*使用Pierce 660 nm定量试剂测量14种蛋白质的蛋白间差异;本表中包括其中11种蛋白质。

这种低蛋白间差异可在检测未知蛋白样品的蛋白浓度时实现更高的准确度。为了证明Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂的准确性，我们使用浓度已知的蛋白制备了几种不同的蛋白混合物，并测量280nm处的吸光值以确认浓度。分别使用Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂和Bradford蛋白定量试剂在室温下孵育5分钟后测定浓度（图4）。对于Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂，已知浓度样品检测的CV为20.5%；对于Bradford蛋白定量试剂，已知浓度样品检测的CV为62.2%。

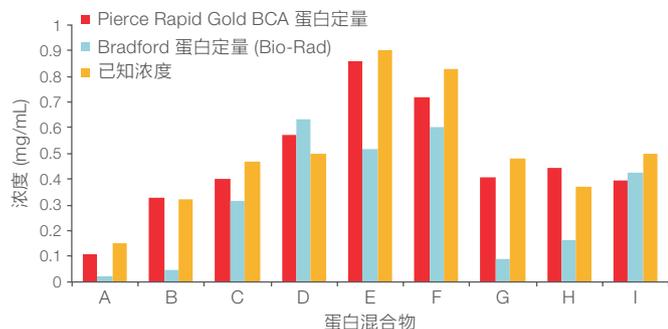


图4.使用Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量和Bradford蛋白定量试剂定量已知蛋白混合物的准确度。两种定量实验均按照制造商的操作方案在微孔板中进行。对于Bradford定量，将10 μ L BSA样品添加到200 μ L工作液中，并在室温下孵育5分钟。对于Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量，将20 μ L 样品添加到200 μ L Rapid Gold BCA工作液中，并在室温下孵育5分钟。已知浓度基于制造商的指示浓度，并通过280 nm处的吸光值进行确认。

试剂兼容性

与Thermo Scientific™ Pierce™改良Lowry法和任何考马斯染料蛋白定量方法相比，BCA法蛋白定量均具有独一无二的优势——它能够兼容去垢剂含量高达5%的样品。在对去垢剂和其他常用缓冲液的兼容性方面，Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量和经典BCA定量试剂相似。我们使用在典型蛋白质研究实验室中常用的缓冲液和去垢剂，对Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂的兼容性进行了验证。表2总结了受试物质以及与其兼容性。“方法”中的表3提供了受试缓冲液的配方。

表2.检测兼容性。为获得受试物质的最大兼容浓度，使用微孔板方案以BSA标准品的中点浓度（1,000 μ g/mL）进行检测。所列浓度是指蛋白样品中的实际浓度。∅表示在最低测试浓度下不兼容的化合物。稀释度以未稀释或以比例的形式表示，其中“1:2”表示2倍稀释（例如，1 mL样品缓冲液与1 mL超纯水，总计2 mL）。

测试化合物	兼容性
2-巯基乙醇	∅
ACES (pH 7.8)	25 mM
丙酮	10%
乙腈	10%
硫酸铵	∅
抑肽酶	10 mg/L
Bicine	20 mM
硼酸盐 (pH 8.5)	50 mM
B-PER试剂	未稀释
Brij-35	5%
Brij-58	1%
氯化钙 (在TBS中, pH 7.2)	10 mM
碳酸盐-碳酸氢盐	1:2稀释
CHAPS	5%
CHAPSO	5%
CHES	100 mM
氯化钴 (在TBS中, pH 7.2)	0.8 mM
二硫苏糖醇 (DTT)	∅
DMF	10%
DMSO	10%
D-PBS	未稀释
EDTA	10 mM
EPPS (pH 8.0)	100 mM
乙醇	10%
氯化铁 (在TBS中, pH 7.2)	10 mM
葡萄糖	10 mM
甘油	10%
甘氨酸-HCl (pH 2.8)	100 mM
异硫氰酸胍-HCl	4 M
盐酸 (HCl)	100 mM
咪唑 (pH 7.0)	12.5 mM
I-PER试剂	未稀释
亮抑酶肽	10 mg/L
Mem-PER Plus试剂	未稀释
MES (pH 6.1)	100 mM
MES缓冲液 (pH 4.7)	未稀释
甲醇	10%
MOPS (pH 7.2)	100 mM
M-PER试剂	未稀释
醋酸钠 (pH 4.8)	200 mM
叠氮化钠	0.20%
碳酸氢钠	100 mM

表2.检测兼容性(续)

测试化合物	兼容性
氯化钠	1 M
柠檬酸钠 (pH 4.8)	200 mM
柠檬酸钠-碳酸盐 (pH 9.0)	1:8稀释
柠檬酸钠-MOPS (pH 7.5)	1:8稀释
脱氧胆酸钠 (DOC)	5%
PBS中的原钒酸钠 (pH 7.2)	1 mM
磷酸钠	100 mM
N-乙酰氨基葡萄糖	10 mM
NE-PER (CER) 试剂	1:2稀释
NE-PER (NER) 试剂	未稀释
NP-40	5%
辛基β-葡糖苷	5%
磷酸盐缓冲液 (PBS)	未稀释
异丙醇中的PMSF	1 mM
硫氰酸钾	3 M
RIPA裂解液	未稀释
SDS	5%
Span 20	0.5%
蔗糖	40%
TLCK	0.1 mg/mL
TPCK	0.1 mg/mL
T-PER试剂	1:2稀释
Tricine (pH 8.0)	25 mM
三乙醇胺 (pH 7.8)	25 mM
Tris缓冲液 (TBS)	未稀释
Tris甘氨酸 (pH 8.0)	1:2稀释
Tris甘氨酸SDS (pH 8.3)	未稀释
Tris-HCl (pH 8.0)	∅
Tris-HEPES-SDS (pH 7.5)	100 mM
Triton X-100	5%
Triton X-114	1%
Triton X-305	1%
Triton X-405	1%
Tween 20	5%
Tween 60	5%
Tween 80	5%
尿素	3 M
Y-Per Plus试剂	∅
Y-Per试剂	∅

结论

Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂是一种通用、准确且快速的蛋白定量工具,在室温下5分钟即可完成孵育。正如“经典或标准”BCA定量试剂, Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂也基于铜螯合剂,可用于比色检测和总蛋白定量。其定量原理与经典BCA法相同。与考马斯染料法相比, Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量的蛋白间差异更小,其在蛋白标准品中的

差异为15%,而考马斯染料法的差异则大于40%(表1)。总体而言,全新Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂可针对生物样品中的蛋白浓度提供最准确的测量结果。它与去垢剂兼容,操作简单快速,可生成范围达20-2,000 µg/mL的线性标准曲线。

参考文献

1. Bradford MM (1976) *Anal Biochem* 72:248-254.
2. Smith PK et al. (1985) *Anal Biochem* 150:76-85.

方法

Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量

对于每个标准品或样品,取20 µL加至96孔微孔板中,每种上样两个重复。通过混合50份试剂A和1份试剂B制备Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量(货号A53225)工作液,使用多通道移液器将200 µL工作液添加到每个孔中,并在孔板振荡器上振荡30秒以充分混匀。将孔板在室温下孵育5分钟,然后置于Thermo Scientific™ Multiskan™ Go微孔板分光光度计上,在480 nm处检测吸光值。使用Thermo Scientific™ Pierce™牛血清白蛋白标准预稀释试剂盒(货号23208)生成的标准曲线来确定未知蛋白的浓度。

蛋白间差异

Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂(货号A53225)、Pierce BCA蛋白定量试剂(货号23225)、Thermo Scientific™ Pierce™ Micro BCA™蛋白定量试剂(货号23235)、Pierce改良Lowry法蛋白定量试剂(货号23240)、Thermo Scientific™ Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) 定量试剂(货号23236),以及Bio-Rad Bradford蛋白定量试剂(货号50000002)均按照制造商的操作说明进行使用。分别测定14种浓度为1,000 µg/mL的常用蛋白标准品的平均蛋白吸光值。将每种蛋白质的平均吸光值与使用每种试剂盒测得的BSA平均净吸光值进行比较。

使用市售的浓度已知 (通过测量280nm处吸光值进行了验证) 的纯化蛋白质, 制备几种不同的蛋白混合物。然后, 将已知量的这些市售蛋白与其他市售蛋白混合, 以获得浓度已知的蛋白混合物。根据制造商的使用说明, 分别使用Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂 (货号A53225) 和Bio-Rad Bradford蛋白定量试剂 (货号50000002) 在室温下孵育5分钟后对蛋白混合物进行定量。对于每种定量方法, 均使用Pierce牛血清白蛋白标准预稀释试剂盒 (货号23208) 生成的标准曲线计算观测到的蛋白混合物浓度。

试剂兼容性

如前所述, 使用Pierce Rapid Gold BCA蛋白定量试剂对含有常用缓冲液和干扰物的1,000 µg/mL BSA样品进行定量。定量检测共重复进行三次, 并将所得吸光值与0.9%盐水中的BSA吸光值进行比较。如果在受试物质存在的情况下, 蛋白浓度估算值的误差小于20%, 则认为该定量试剂与指定浓度下的受试物质兼容。

表3. 兼容性测试中使用的缓冲液配方。

缓冲液	配方
MES缓冲液, pH 4.7	0.1 M MES、150 mM NaCl, pH 4.7
碳酸钠-碳酸氢盐, pH 9.4	0.2 M 碳酸钠-碳酸氢盐, pH 9.4
柠檬酸钠-碳酸盐, pH 9.0	0.6 M 柠檬酸钠、0.1 M 碳酸钠, pH 9.0
柠檬酸钠-MOPS, pH 7.5	0.6 M 柠檬酸钠, 0.1 M MOPS, pH 7.5
磷酸盐缓冲液 (PBS)	100 mM 磷酸钠、150 mM NaCl, pH 7.2
RIPA裂解液	50 mM Tris、150 mM NaCl、0.5% DOC、1% NP-40、0.1% SDS, pH 8.0
Tris缓冲液 (TBS)	25 mM Tris、150 mM NaCl, pH 7.6
Tris甘氨酸, pH 8.0	25 mM Tris、192 mM 甘氨酸, pH 8.0
Tris甘氨酸SDS, pH 8.3	25 mM Tris、192 mM 甘氨酸、0.1% SDS, pH 8.3
Tris-HEPES-SDS	100 mM Tris、100 mM HEPES、3 mM SDS

了解更多信息, 请浏览 thermofisher.com/bca-assays



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC