BCA法定量测定粒子表面结合蛋白

Technical Note 002

纳 微
NanoMicro

译自ThermoFisher公司技术文档 *TN-038 Reagent Optimization BCA Assay Quick Elution Technique*，部分细节有修改。

简介

本文档介绍了一种简便快捷的方法，可以对微粒子表面结合的蛋白进行定量测定。此方法可用于：

- 对微粒子表面结合的蛋白进行定量
- 优化偶联反应条件，最大化利用宝贵的蛋白
- 研究蛋白偶联量与免疫反应活性之间的关系
- 提升产品生产过程中的QC监控能力

基本原理

微粒子表面结合的蛋白可以通过BCA法直接测定。在碱性环境下，蛋白可以将二价铜离子还原为一价铜离子，一价铜离子与BCA形成深颜色的可溶性配合物，最大吸收波长在562 nm处。

测定微粒子表面结合的总蛋白，要将已知固含量的微粒子分散液与BCA试剂反应，当显色反应完成后，用离心法去除微粒子，再用分光光度计测定吸光度。结合蛋白量以每mg粒子结合多少μg蛋白的单位表示。

快速洗脱法

此方法可以区分共价结合与非共价吸附的蛋白。在含有表面活性剂的碱性环境下，非共价吸附的蛋白可以在30分钟内从粒子表面完全洗脱，余下的蛋白即为共价结合在粒子表面的蛋白，可以通过上述的BCA法进行测定。此方法假定所有无法被洗脱的蛋白均为共价结合。

微粒子试剂的开发

在微粒子试剂开发过程中，BCA蛋白定量法可以帮助解决以下问题：

1. 微粒子表面是否确实有蛋白结合？

蛋白定量显色方法通常用于测定偶联反应之后上清液中蛋白含量的降低。这类方法容易受到缓冲液各个组分的干扰，而且往往缺乏足够的灵敏度（*译注：当偶联前后蛋白浓度变化不大的时候*）。本文档的方法能够直接测定粒子表面偶联的蛋白，灵敏度更高。

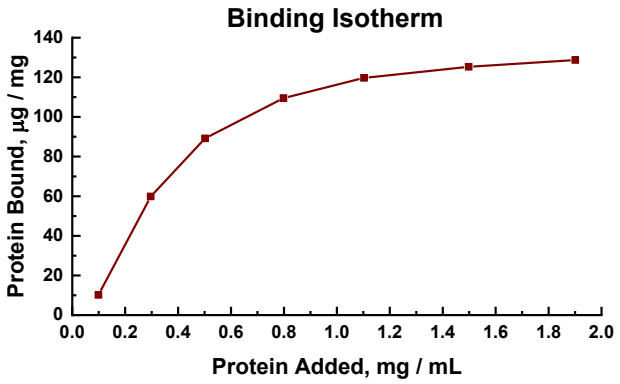
2. 何种条件能使得偶联效率最高？

该方法可以帮助优化偶联反应的各项条件，包括pH、反应物浓度、缓冲液组成、使用共价结合还是非共价结合、共价结合的偶联剂、粒子的表面基团等。

3. 偶联过程是否令人满意？

微粒子试剂的性能与其表面结合蛋白量高度相关。该方法可以作为一种有效的优化及质控手段。

下图是一个典型的吸附等温示意图，给出了BCA法测定的粒子表面蛋白结合量与偶联反应中蛋白加入量的关系曲线。



实验材料及方法

1. Micro BCA法蛋白定量试剂盒（ThermoFisher #23235或其他品牌同类产品）
2. 预稀释的蛋白标准溶液（译注：原文中使用BSA作为蛋白标样，由于BCA法对于不同蛋白的标准曲线差别不大，如果对于测量精度要求不是很高，可以采用BSA作为标样，如果对于测量精度要求较高，应当采用与偶联蛋白相同或者结构相近的蛋白作为标样，例如测定抗体偶联量时，可以采用人IgG或者丙种球蛋白作为标样）

- 标样1：125 µg/mL
- 标样2：250 µg/mL
- 标样3：500 µg/mL
- 标样4：750 µg/mL
- 标样5：1000 µg/mL
- 标样6：1500 µg/mL
- 标样7：2000 µg/mL

3. 内控粒子（可选）：

可选择0.3 µm Power-Bind链霉亲和素粒子（ThermoFisher #29000701010150）

4. 空白粒子（未偶联蛋白的同种粒子）
5. 去离子水
6. 海美溴铵（CAS # 28728-55-4）1%（w/v）水溶液（仅用于沉淀小粒径粒子）
7. 用于快速洗脱法的洗脱液：碱性SDS溶液，含有0.20 M Tris以及1.0% SDS，通过混合4 mL 1.0 M Tris（*译注：不是Tris盐酸盐*）水溶液、2 mL 10% SDS溶液以及14 mL去离子水得到。

其他实验设备包括：

- 微量离心管
- 移液器与吸头（25 – 500 µL）
- 涡旋混合器
- 水浴加热装置
- 微量离心机
- 96孔酶标板
- 酶标仪（能够读取562 nm吸光度）

其他注意事项

- 查阅BCA法试剂盒附带的说明书以确定其他相关细节。
- BCA法给出的标准曲线是非线性的，因此必须每次先测定标样。
- 对于同样量的蛋白，固定在粒子表面的蛋白比溶液中游离的蛋白在BCA法条件下显色值会略低。
- 不同蛋白在BCA法中的显色程度不同，如果需要准确的定量结果，应使用与未知样品相同的蛋白作为标样。
- 微粒子试剂经常会添加BSA作为稳定剂。对于表面结合蛋

白的测定必须在添加BSA之前进行。

- 虽然大多数常用试剂不会干扰BCA法，以下几种缓冲盐（*译注：有还原性*）还是会产生影响：bis-tris、bis-trispropane以及tricine。此外，会干扰测定结果的物质还包括NHS、海藻酸钠、苯酚和酚红。

实验步骤：

1. 将水浴加热装置设定至55 °C（注：与试剂盒说明书所示温度可能略有不同）。
2. 标记离心管
   - 取8个离心管，分别标记为std 0（空白）以及std 1 – 7（标准蛋白溶液）
   - 根据未知样品的数量，取相应数量的离心管，分别做标记，另取一个离心管标记为par 0（空白粒子）。每个样品的取样需足够重复测定两次。
3. 稀释标样：将每个标样取出25 μL，加入475 μL去离子水中得到稀释标样。另取一管加入500 μL去离子水作为本底，标为bkgd。
4. 在取用微粒子分散液之前，用涡旋混合器将粒子充分混匀，保证底部没有肉眼可见的团块。将每个蛋白偶联的粒子分散液取50 μL，加去离子水稀释至总体积为500 μL。另取一离心管，向其中加入适当体积的空白粒子分散液并加入去离子水稀释，使其稀释后的粒子固含量与蛋白偶联的粒子稀释后固含量相同。
5. 配制BCA反应试剂（现用现配）：至少配制（总管数 × 0.6 mL）体积的反应试剂。
   - 按照5：4.8：0.2的体积比混合试剂盒中的试剂A、B和C。
   - 向上面的每个管子（包括所有的空白、标样和待测样）中加入0.5 mL混好的BCA反应试剂，盖上盖子，涡旋混匀。
6. 在55 °C的水浴中将所有管子孵育50 ± 5分钟。
   - 将所有样品一起放入水浴并一起取出。
   - 若粒子直径较大，应当隔一定时间将管子取出，快速上下颠倒混匀，再重新放入水浴中。
7. 将管子取出，在室温下放置1小时冷却。
8. 分离粒子：对于密度较小的粒子，向每个管子中加入50 μL 1% 海美溴铵溶液，涡旋混匀，使粒子絮凝，便于沉淀。在14000 rpm下离心至粒子完全沉淀至底部。对于0.2 μm以下的小粒子，可能需要15分钟以上的离心时间。
9. 将每管中上清液取200 μL加入酶标板的孔中。
10. 用酶标仪读取562 nm下每个孔中溶液吸光度。
11. 按照以下标准评估实验结果

    1）如果标准曲线的相关系数R^2 < 0.975，应当重新进行实验。

    2）如果某个样品的吸光度落在标准曲线范围以外，则应该修改其稀释倍数，按照新的稀释倍数重新进行实验（包括空白粒子）。

快速洗脱法步骤：

1. 取一稀释后的待测粒子样品，向其中加入500 μL碱性SDS洗脱液。
2. 混匀，在室温下静置30分钟。
3. 在高速离心机上离心沉淀粒子。
4. 小心移除上清液，最好保留少量上清液在管中以免吸到底部的粒子。
5. 将沉淀的粒子用500 μL碱性SDS洗脱液洗涤一次以去除残余的洗脱蛋白。丢弃上清液。
6. 向沉淀的粒子中加入500 μL去离子水，重新分散，然后从BCA法实验步骤的第5步开始进行测定。

计算过程

1. 以蛋白标样的总质量（单位：μg）为x轴，吸光度为y轴，作图，用二次多项式拟合出标准曲线方程。

2. 通过标准曲线方程，将未知样品的吸光度折算成对应的蛋白质量，进而计算每mg微粒子结合的蛋白质量。