

利用紫外-可见光吸光度法或荧光法进行蛋白微量定量

David L. Ash 和 Andrew F. Page | Thermo Scientific NanoDrop 产品, 美国特拉华州威明顿市

简介

尽管分光光度法或荧光是蛋白定量的常用方法, 但是在选择检测技术时必须考虑若干因素。直接紫外 A280 吸光度法、比色法和荧光法在很多情况下不能互换, 且必须考虑蛋白浓度、所用缓冲液、时间限制和样品要求。使用 NanoDrop™ 的微量功能可使三种定量方法都获益。

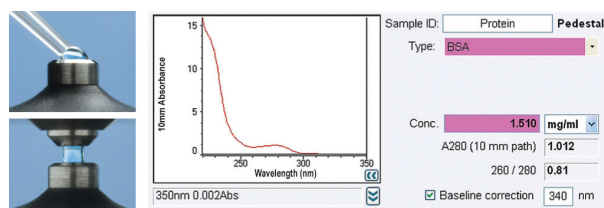
微量测量

NanoDrop 紫外-可见光分光光度计采用革命性的样品保留技术, 通过表面张力的作用, 可以将 1–2 μL 样品保留在两根光纤之间。测量后, 使用普通实验室无尘纸即可简便快捷地从光学表面除去样品。用户友好型软件上将显示最终蛋白浓度、纯度比和样品光谱图 (图 1)。

NanoDrop 2000/2000c 分光光度计采用可实时改变的多光程 (1.0、0.2、0.1 和 0.05 mm) 来测量 2 μL 蛋白样品 (图 1), 这样的宽动态范围, 能够使用直接紫外 A280 软件模块测量 0.1–400 mg/mL 的纯化 BSA 蛋白。该自动化光程优化过程无需样品稀释, 提高了精度。与此相反, 传统分光光度计采用标准的 10 mm 石英比色皿测量样品, 一般检测上限约为 1.8 mg/mL, 并需要 500 倍体积的样品才能满足最小样品体积要求 (1 mL)。此外, 使用比色皿时如清洗不当, 可能导致与前次样品交叉污染。

NanoDrop 2000c 的测量时间不足 5 秒, 在需要更高通量的情况下, NanoDrop 8000 最多可同时测量 8 个样品, 测量时间仅为 20 秒。此外, 如果需要更高的灵敏度, NanoDrop 3300 荧光分光光度计可实现微量荧光蛋白检测, 其检测样品体积亦可低至 2 μL 。

图 1: 左上角: 在测量底座上加载 2 μL 蛋白样品, 左下角: 样品测量时底座间形成的液柱, 右侧: 软件输出, 显示光谱图和数据



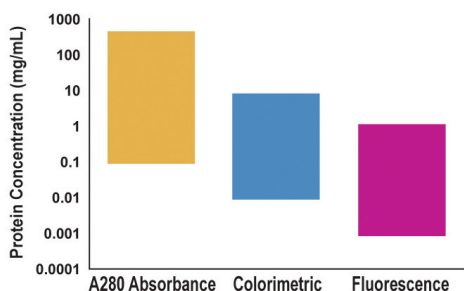
线性范围

分光光度法的典型吸光度上限约为 1.5 A, 进而定义了蛋白的最高可测量浓度。使用固定光程测量蛋白样品, 一般采用 1 cm 石英比色皿, 这限制了传统分光光度法的线性范围, 因而需要稀释样品。此类稀释既浪费时间又耗费样品, 还可能发生移液误差。采用 NanoDrop 分光光度计的微量样品保留技术和直接紫外 A280 测量法测量纯化蛋白样品时, 用户使用 2 μL 样品即可直接快速测量浓度高达 400 mg/mL (BSA 蛋白) 的样品 (图 2)。NanoDrop 样品保留技术的检测上限比标准 1 cm 光程石英比色皿高 200 倍。

执行同一检测时, 微量比色法与传统的基于比色皿的比色法的性能相当, 因为尽管吸光度信号被降低了大约 10 倍, 但是检测限制通常在于检测方法本身而非所用的分光光度计。比色法一般用于消除未纯化蛋白样品中的

污染物的干扰，但是与直接紫外 A280 测量相比，此类检测方法的动态范围有限（图 2）。同样地，对于大多数荧光蛋白检测，NanoDrop 3300 荧光光谱仪与基于比色皿的荧光光度计性能相当。荧光定量法也可用于未纯化蛋白样品，已证实其灵敏度高于直接紫外 A280 法和比色法（图 2）。

图 2：使用 NanoDrop 分光光度计或荧光分光光度计比较不同蛋白定量方法的大致动态范围



样品要求

样品要求会极大地影响定量方法的选择（表 1）。尽管比色法和荧光法均可测量未纯化的蛋白溶液，但是直接紫外 A280 吸光度法只适用于已纯化的蛋白溶液。缓冲液选择和其他因素（如样品浓度）也十分重要。最好咨询仪器供应商，了解比色法和荧光法对缓冲液组成和污染物的特定容许偏差。

表 1：直接紫外 A280 吸光度法、比色法和荧光法的样品要求，分别为样品纯度、缓冲液相容性和其他因素

	Direct UV A280 Absorbance	Colorimetric	Fluorescence
Sample purity	Samples must be purified as contaminants may interfere with measurement.	No purification necessary.	No purification necessary.
Buffer compatibility	Buffers with strong UV absorbance may be unsuitable (see next panel).	Some assays are sensitive to detergents or reducing reagents, which can artificially perturb or enhance color development.	Some assays are sensitive to buffers with primary amines or detergents, which perturb fluorescent signal.
Other considerations	Knowledge of an E1% value or molecular weight and molar extinction coefficient are required to calculate mg/mL concentration.	Colorimetric signals vary between proteins, therefore standards must be carefully chosen in order to minimize differences in signal between the standard and sample proteins.	Fluorescent assays typically have a lower detection limit than colorimetric assays or direct UV A280 measurement, but are limited by the maximum measurable protein concentration (fig. 2).

缓冲液相容性示例

简介：如 RIPA 等常用的蛋白缓冲液在紫外波长区域会产生强烈的紫外吸收信号（图 3A），因而对直接紫外 A280 测量精度具有不良影响。然而，使用兼容的比色法可实现准确定量。本实验使用 A280 和 BCA 比色法为两个相同浓度的蛋白样品定量；一个以 PBS 为缓冲液，一个以 RIPA 为缓冲液。

材料与方法：一支 2 mg/mL 的 BSA 蛋白标样（Thermo Scientific Pierce 产品）使用 PBS 或 RIPA 缓冲液以 1:1 稀释。随后采用稀释至 0.5x 的合适的缓冲液制备一组稀释样，以绘制标准曲线。制备的两个 BSA 样品浓度相同，一个以 0.5x PBS 为缓冲液，一个以 0.5x RIPA 为缓冲液。然后，使用直接紫外 A280 测量法和配有相关标准曲线的 BCA 比色法为两个样品定量。

结果：使用合适的 0.5x 缓冲液调零后测量蛋白样品时，在所监测的波长范围内观察到样品信号偏差（图 3B）。而且，直接紫外 A280 测量法测得的两个 BSA 样品的差异百分比高于 20%。此外，以 RIPA 为缓冲液的样品在重复样品精度方面也受到影响（图 4）。相反地，使用 BCA 比色法的两个蛋白样品的定量结果显示未知样品浓度相同，与缓冲液无关（图 4）。

图 3：缓冲液对直接紫外 A280 蛋白测量的影响，A) 0.5x RIPA 缓冲液的吸光度（使用水作为仪器空白样），B) 同一蛋白样品以 0.5x PBS 或 0.5x RIPA 为缓冲液时的吸光度（采用同一缓冲液进行样品和空白样测量）。注意即使使用了合适的空白样，两个样品的吸光度仍然不同。

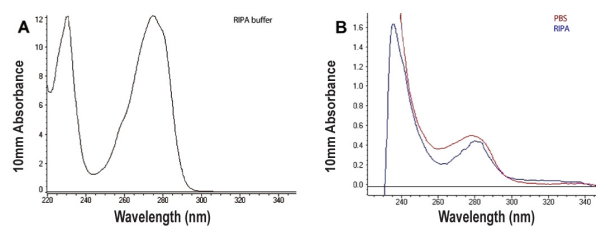
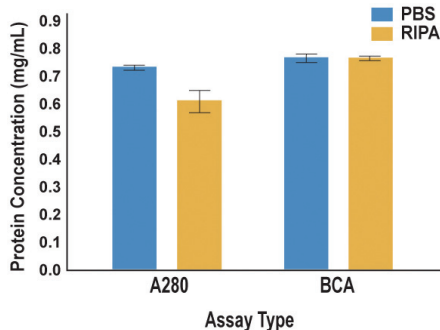


图 4: 0.5x PBS 或 0.5x RIPA 缓冲液体系中同一蛋白样品的定量结果。采用 A280 法（以适当的缓冲液为空白样）和 BCA 比色法（使用相同的缓冲液绘制标准曲线）进行定量。注意，以 RIPA 为缓冲液的样品，其 A280 测量结果不准确且重现性差。全部为 n = 3；误差线表示标准偏差。



缓冲液兼容性结论: 采用直接紫外 A280 吸光度法测得的两个蛋白样品浓度间存在差异，其原因主要是 RIPA 缓冲液中含有 NP-40 或 Triton X-100 等表面活性剂成分，具有强烈的紫外吸收性。在这些表面活性剂存在的情况下，当使用直接紫外 A280 法无法完全补偿缓冲液吸光度时，定量方法的选择尤为重要，其意义相当于所有分光光度法中的调零。

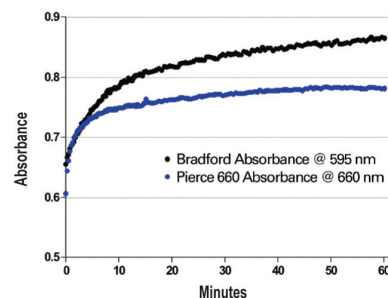
结果获取时间

完成整个方法所需的时间受样本提取后的三个主要步骤影响：制备、孵育和测量周期。直接紫外 A280 吸光度法是迄今为止最快的方法，因为其获得结果所需的时间仅取决于完成测量周期所需的时间。表 2 比较了三种不同类型的方法所需的测量时间，展示了方法的每个阶段对完成方法所需的整体时间有何影响。

表 2: 直接紫外 A280 吸光度法、比色法和荧光法的时间要求，分别为制备、孵育和测量时间

	Direct UV A280 Absorbance	Colorimetric	Fluorescence
Preparation	None	Production of working solutions is required in some assays; fresh standards need to be made for a calibration curve.	Production of working solutions is required in most assays; fresh standards need to be made for a calibration curve.
Incubation	None	Time required to stabilize colorimetric signal is between 10 and 60 minutes, depending on the assay used (fig. 5).	Typical time required to stabilize fluorescent signal is 10 – 30 minutes, depending on the assay used.
Measurement	~ 5 seconds using a NanoDrop	Colorimetric assays require more time than the direct UV A280 method as a calibration curve must be established prior to unknown sample quantification.	Fluorescent assays require more time than the direct UV A280 method as a calibration curve must be established prior to unknown sample quantification.

图 5: Bradford 法和 Pierce 660 法的比色检测显色时间，注意，各个方法的显色时间和显色稳定性均不同。



结论

随着用于筛选蛋白的分子技术所需的起始物质量日益减少，微量定量技术必须与之同步发展。现有多种吸光度和荧光测量方法，可确定蛋白样品提取后的浓度。但是，应该谨慎选择定量方法。需要考虑的重要因素包括灵敏度要求、所用缓冲液、时间限制和样品纯度。除此之外，NanoDrop 分光光度计或荧光计可用于进一步加速测量过程、扩展可测量浓度范围、节约耗材和试剂开销。因此，NanoDrop 产品系列中样品保留技术的出现使得小体积蛋白的定量更加精确高效。消除传统分光光度法中测量蛋白样品时必需的样品稀释步骤，对最大限度地减小确定蛋白浓度的误差方面至关重要。



thermoscientific.com/nanodrop

赛默飞世尔科技 | NanoDrop 产品
3411 Silverside Road
Wilmington, DE 19810 USA

美国和加拿大地区免费电话: 1.877.724.7690
1.302.479.7707

©2012 赛默飞世尔科技公司保留所有权利。所有商标均归赛默飞世尔科技公司及其子公司所有。



Part of Thermo Fisher Scientific