

蛋白定量的精明选择



对许多实验来说，确定蛋白样品浓度是至关重要的。如果在 2D 电泳中，蛋白过多或过少，产生的后果都将是相当严重的。大多数蛋白样品可通过比色测定法定量。在典型的蛋白测定中，化学试剂加入到蛋白样品溶液里产生颜色变化，这一变化可由分光光度计或酶标仪检测，并与已知浓度的蛋白标准曲线作比较。Bio-Rad 提供了 4 种蛋白测定手段，每种都有其独特的优点。

Quick Start Bradford 蛋白测定是一种简单、精确的蛋白浓度定量方法。现成的 1 倍浓度染料和 7 个预稀释浓度 (0.125、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0 mg/ml) 的蛋白标准品，让你拥有现成的检测工具。无需稀释标准品和染料，一步完成蛋白浓度定量。

Bio-Rad 蛋白测定也是一种简单的蛋白浓度测定方法。该方法适应标准浓度测定、低浓度微量测定，或 96 孔微孔板的快速测定。它的基本原理和流程和上面的 **Quick Start Bradford** 都是一样的，不过要麻烦一点点。因为除了要稀释蛋白标准品，配成几个不同浓度之外，还要稀释染料，再过滤除去不溶颗粒。后面的步骤就没有区别了，还有一点小差别就是价格。不过联想一下奶粉和液体奶，就会想通了吧。

Quick Start Bradford 和 **Bio-Rad** 蛋白测定方法的起源都是 **Bradford** 染料结合方法 (**Bradford 1976**)，该方法检测考马斯亮蓝 **G-250** 染料与蛋白结合时 (主要结合碱性或芳香族氨基酸残基) 的颜色变化。这种测定方法能定量多数蛋白或多肽 (分子量 > 3,000–5,000 Da)，操作简单、速度快，灵敏度高，与一些还原剂 (如 **DTT**、巯基乙醇) 兼容。但有些去垢剂、黄酮、碱性缓冲液会干扰测定。

DC (Detergent Compatible) 蛋白测定是一种适用于含有去垢剂的蛋白样品比色测定方法。该方法类似于常规的 **Lowry** 测定方法 (**Lowry et al.1951**)，但经过改良，节省了操作时间。**DC** 蛋白测定只需要 15 分钟的温育过程，而且吸光值读数能保持 2 小时的稳定。它可以兼容 **NaOH** 和多种去污剂，如 10% **SDS**、2% **NP-40**、1% **CHAPS**、1% **Triton X-100** 等，但还原剂还是会干扰测定。

RC DC (Reducing agent Compatible & Detergent Compatible) 蛋白测定是一种适用于含还原剂和去垢剂的蛋白样品比色测定方法。以 **Lowry** 方法 (**Lowry et al.1951**) 为基础的 **RC DC** 蛋白测定，具有原来 **DC** 蛋白测定的特点，并能与更多的试剂兼容，简化了复杂蛋白样品溶液的定量测定。吸光值至少稳定 1 小时。除了与 **DC** 蛋白测定兼容的试剂外，**RC DC** 蛋白测定还与以下试剂和缓冲液兼容：2% **CHAPS**、350 mM **DTT**、0.1M **EDTA**、**Laemmli** 缓冲液、10% **beta**-巯基乙醇、**ReadyPrep** 抽提试剂等。

选择合适的蛋白标准

大家可能从来没有在意过蛋白标准，认为不就是 **BSA** 嘛。其实不然。在蛋白测定中，最好的标准品是待测蛋白的纯化制品。当没有这种绝对的对照蛋白时，可以选择另一种蛋白

作为相对标准。如果是用 Bradford 方法测定，不同的标准品会导致同一样品的结果差异较大，无可比性。因此在蛋白测定之前，最好是参照要测试的样品的化学构成，寻找化学构成类似的标准蛋白作标准品。如果只需要相对蛋白浓度，那么任何一种纯化蛋白均可作为对照标准品。

Bio-Rad 提供两种蛋白标准品，小牛 gamma-球蛋白和牛血清白蛋白 (BSA) 标准品。当你用 Quick Start Bradford 和 Bio-Rad 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度时，那么标准品的选择就要慎重一些。如果你的样品中主要含有白蛋白，那么 BSA 将是一个好选择。如果你的样品包含了多种蛋白，gamma-球蛋白可能更合适。而 DC 和 RC DC 蛋白测定就几乎不受到标准品的影响，你爱选哪个选哪个。不

过假如你想比较几个蛋白的量时，最好还是用同一种标准品。

选择合适的蛋白测定方法

正如一个硬币的正反面，每种蛋白测定方法都有其优缺点。当你选择一种蛋白测定方法时，需要考虑两个重要因素：缓冲液的化学组成和检测的蛋白量。基于 Bradford 方法的 Quick Start Bradford 和 Bio-Rad 蛋白测定灵敏度高，可以兼容糖、巯基乙醇、DTT 等。而对于去污剂和 NaOH 这两种干扰 Bradford 测定的物质，DC 蛋白测定却可以兼容。如果蛋白是在 loading buffer 中，准备跑 1D 或 2D 电泳，或者刚从细胞裂解液中抽提出来，需要定量，那么 RC DC 蛋白测定更合适。下表总结了每一种蛋白测定方法的特点。

	Quick Start Bradford	Bio-Rad	DC	RC DC
标准浓度测定				
样品体积	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul
线性范围	0.125-1.5 mg/ml	0.2-1.5 mg/ml	0.2-1.5 mg/ml	0.2-1.5 mg/ml
低浓度测定				
样品体积	1 ml	800 ul	200 ul	200 ul
线性范围	1.25-25 ug/ml	1.25-25 ug/ml	5-250 ug/ml	5-250 ug/ml
微孔板分析	5 ul	5 ul	5 ul	*
最短孵育时间	5 min	5 min	15 min	15 min
方法来源	Bradford (1976)	Bradford (1976)	Lowry et al. (1951)	Lowry et al. (1951)
标准反应次数	200	450	500	500
价格 (元)	1108	1027	2217	3000
单次价格 (元)	5.5	2.3	4.4	6.0

比色皿

最后还要提一下比色皿这个小东西。一般定量核酸和紫外定量蛋白，都是采用石英杯或者玻璃杯，但是不适合比色法测定蛋白质。因为反应中的染料（如考马斯亮蓝）能让石英和玻璃着色，所以必须采用一次性的塑料杯。而塑料杯一般不适合用于在紫外范围内测试样品。Bio-Rad 也提供了一次性的比色皿。这些比色皿可直接用于样品的混匀，这样你就省掉

了转移溶液的麻烦。而且比色皿所需的样品体积只是标准反应的一半左右，因此每个试剂盒的使用次数实际上变成了两倍。另外，它的非光学面是凹槽设计，非常容易拿捏，而且不容易搞错，在光学面上留下指纹或在分光光度计中放反了方向。

蛋白定量这个看似简单的实验中，也蕴藏了不少学问，所以还是要有一双慧眼，来选择最适合的试剂盒。（生物通 余亮）