

使用 BioSpec-nano 定量蛋白质

铃木 里沙、后藤 明里

特点描述

- ◆ 不使用比色池，即可进行微量测定，最低样品量 1~2 μL 。
- ◆ 根据氨基酸序列输入色氨酸、酪氨酸、半胱氨酸残基数，可在软件上计算 280 nm 时的摩尔吸光系数 (ϵ_{280})。
- ◆ 只需滴下样品，按下开始，即可开始测定。使用自动擦拭功能，可轻松实现连续测定。

摘要

蛋白质溶液中包含表面活性剂、还原剂、变性剂等各种共存物质，这些物质会影响定量分析，需要选择适合样品的分析方法。

紫外吸收法（测定 280 nm 处的光密度 (OD)）是使用分光光度法定量总蛋白浓度的最简单的方法。该技术基于蛋白质中的芳香族氨基酸在 280 nm 时的具有紫外吸收特性，无需预处理，分析操作简单。但是，不同种类的蛋白质即使浓度相同，吸光度也有所差异，此外，当存在核酸等在相同波长范围内有光吸收的物质时，定量会受到影响。相比之下，BCA 法（BCA: Bicinchoninic Acid）是一种在不同蛋白质之间显色差异较小的蛋白定量方法。该方法的原理是 Cu(II) 离子在蛋白质存在的条件下会与二喹啉甲酸配位键合显示紫色，浓度范围大，灵敏度高。

如上所述，蛋白质的定量方法有很多种，但在生物药物的生产中，需要更简单、更加微量的蛋白质定量方法。本文介绍了使用最小可测定 1~2 μL 样品量的生命科学紫外可见分光光度计 BioSpec-nano，通过 OD280 nm 法和 BCA 法等 2 种方法定量分析免疫球蛋白 (IgG) 浓度的案例。

BioSpec-nano 的特点

图 1 所示的 BioSpec-nano 不使用比色池（吸收池），即可测定最小 1~2 μL 的微量样品，因此适合测定核酸和蛋白质等珍贵的生物样品。

只需在图 2 所示的滴下位置（目标）滴下样品，按下开始按钮，即可开始测定。此外，使用自动擦拭功能，测定后不需要擦拭样品。

BioSpec-nano 在保持与标准型分光光度计（比色池测定、双光束）的高度相关性的同时，实现了高重现性和测量精度。如图 3 所示，根据样品浓度，可选择 0.2 mm 和 0.7 mm 的光程^{*2}。此外，BioSpec-nano 配备核酸定量、蛋白质定量、指定波长的 OD 值显示等各种定量模式，1 台设备即可应对多种用途。

*2 可选配 5 mm 光程（样品量需为 2 mL）。

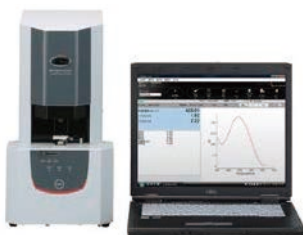


图 1 BioSpec-nano

*1 表面张力较弱的样品，1~2 μL 的样品量可能不会形成液滴。

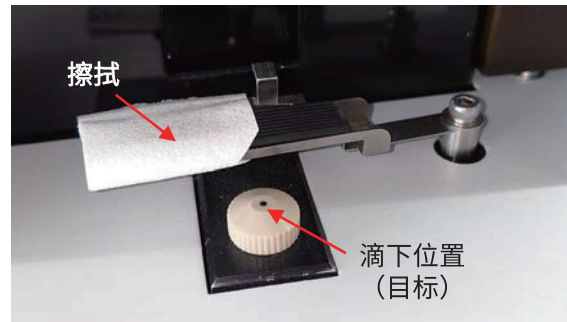


图 2 样品滴下位置与自动擦拭功能

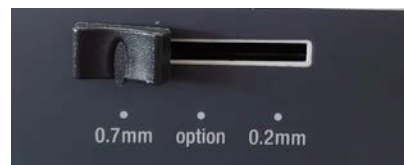


图 3 光程的设置

紫外吸收法 (OD280 nm 法)

在软件的分析选择界面（图 4）中选择蛋白质定量（OD280 法），输入 280 nm 时的摩尔吸光系数 (ϵ_{280}) 和分子量，即可自动计算蛋白质浓度。根据氨基酸序列输入色氨酸、酪氨酸、半胱氨酸残基数，还可在软件上计算 ϵ_{280} 。可在测定结果界面中确认样品浓度值和光谱。此外，可以按照 CSV 或 PDF 格式导出结果。

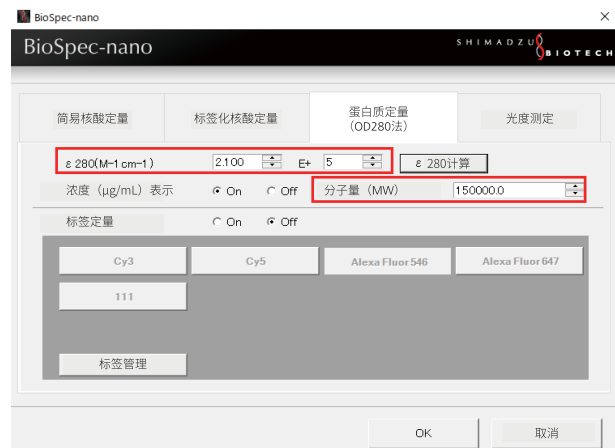


图 4 蛋白质定量 (OD280 法) 模式的分析选择界面

■ 使用 OD280 法测定牛 IgG 的定量结果

使用磷酸盐缓冲液将牛的免疫球蛋白 (IgG) 稀释至 1,000 $\mu\text{g/mL}$, 作为测定样品。

将光程设置为 0.7 mm, 摩尔吸光系数 (ϵ_{280}) 设置为 $2.1 \times 10^5 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$, 分子量 (MW) 设置为 150,000, 取 4 μL 样品滴在目标位置, 测定 280 nm 时的 OD 值 (换算为光程 10 mm 的吸光度)。

图 5 为测定结果。结果与制备一致, 浓度约为 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 。

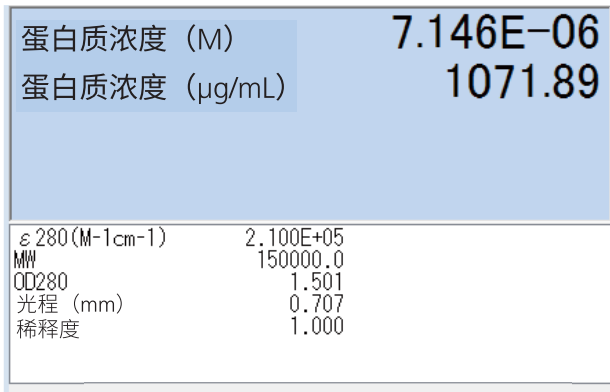


图 5 光程 0.7 mm 时的牛 IgG 测定结果

■ BCA 法

光度测定最大可显示 8 波长的 OD 值 (图 6)。BCA 法使用此光度测定进行测定。



图 6 光度测定的分析选择界面

BioSpec 为岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。

■ 使用 BCA 法测定纯化 IgG 的定量结果

使用抗 IgG 抗体色谱柱亲和纯化^{*3} 1 mL 市售的人血浆, 之后通过 BCA 法定人 IgG 的浓度。取 10 μL 已纯化人 IgG 溶液分别稀释至 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32。向 5 μL 各稀释溶液中添加 100 μL BCA assay kit 的反应溶液后, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 分钟。光程设置为 0.7 mm, 使用光度测定, 测定 4 μL 反应后的样品在 562 nm 时的吸光度值。采用与样品相同的反应, 测定牛血清白蛋白 (BSA), 制作用于定量的标准曲线。结果表明线性关系良好 (相关系数 $R^2 = 0.9976$, 图 7)。通过标准曲线的公式, 将纯化的人 IgG 各稀释液的吸光度值转化为浓度值, 绘制浓度值与稀释比的图表 (图 8)。根据具有线性的 1/4 ~ 1/32 的稀释点近似公式, 得出纯化的人 IgG 浓度为 2.32 mg/mL 。

*3 参照岛津应用报告 01-00118-JP “对蛋白质进行连续纯化和评估”。

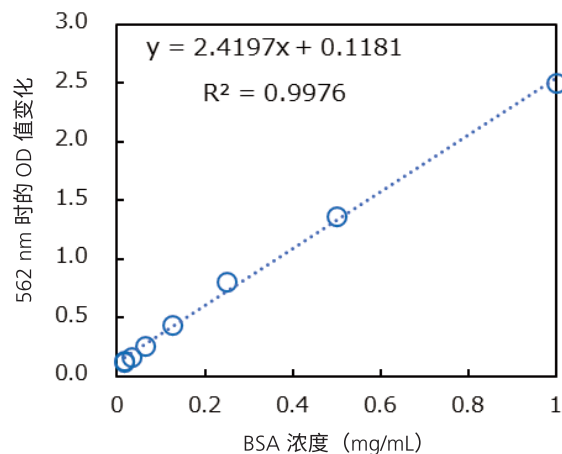


图 7 与 BSA 反应时的标准曲线

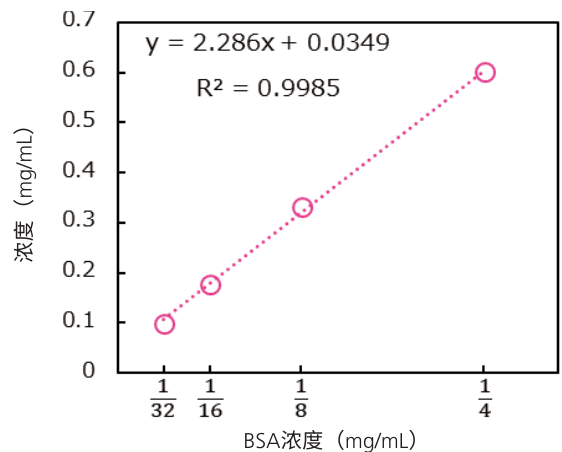


图 8 人 IgG 的测定结果

■ 结论

本文使用生命科学紫外可见分光光度计 BioSpec-nano, 通过 OD280 nm 法及 BCA 法定量分析了 IgG 的浓度。两种方法均在 4 μL 的少量样品量下得到了良好的定量结果。这些结果表明, 可根据溶解蛋白质的缓冲液种类、添加剂

(如还原剂、表面活性剂) 和样品的特性, 通过各种分析方法对样品进行准确的测量。

BioSpec-nano 提供了一种简单的方法来定量分析微量的蛋白质, 非常适合用于生物制药的开发和生产应用中。

岛津应用云

