

细胞裂解液对蛋白质定量方法的影响

徐珊珊¹, 阎春兰², 刘黎明¹, 曾群力¹

(1. 浙江大学医学院 浙江省生物电磁学重点实验室, 2. 毒理学教研室, 浙江 杭州 310058)

[摘要] **目的:**观察不同细胞裂解液对Bradford法和bicinchoninic acid(BCA)法的影响,以确定适合蛋白质组学研究中细胞全蛋白含量的定量方法。**方法:**采用Bradford法和BCA法测定牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)样品溶液,样品BSA溶液分别由双蒸水和不同裂解液(荧光差异双向凝胶电泳裂解液、三种传统双向凝胶电泳裂解液)配制;然后,采用这两种方法测定上述裂解液所提取的细胞全蛋白样品;采用Bradford法定量反复冻融、不同比色杯和不同时期标准曲线下的样品。**结果:**各细胞裂解液对Bradford法均有显著性影响,使所定量的BSA浓度普遍偏高1.2至2倍,但定量值可随着加样浓度的增加而增加($r=0.989\sim0.996, P<0.05$);各裂解液对BCA法也均有显著性的干扰,多数定量结果超出仪器读数范围;对于同批全蛋白溶液样品,BCA法的定量结果与Bradford法相比可有千倍差异;反复冻融后蛋白浓度变化统计学上无显著性差异,但有下降趋势,不同比色杯和不同时期标准曲线对Bradford法无显著影响。**结论:**Bradford法是蛋白质组学中细胞全蛋白定量的较适方法,但需根据具体实验进行优化。

[关键词] 蛋白质组学; 蛋白质类/分析; 电泳, 凝胶, 双向; 血清白蛋白, 牛

[中图分类号] R 446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2008)01-0045-06

Effects of different cell lysis buffers on protein quantification

XU Shan-shan¹, YAN Chun-lai², LIU Li-ming¹, ZENG Qun-li¹ (1. Bioelectromagnetics Laboratory of Zhejiang Province, 2. Department of Toxicology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of different cell lysis buffers on protein quantification with Bradford method and bicinchoninic acid (BCA) method. **Methods:** Bradford method and BCA method were used to determine the concentration of bovine serum albumin (BSA) in different solutions (distilled water, cell lysis buffer used in two-dimensional differential in-gel electrophoresis and three kinds of cell lysis buffers used in conventional two dimensional gel electrophoresis), as well as the protein concentrations of cell lysates using these different lysis buffers. Bradford method was also applied to determine the protein concentrations of samples with repeated freeze thaw cycle, in different colorimetric cylinders, or using different standard curves

收稿日期: 2007-10-15 修回日期: 2007-12-06

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(50137030); 国家自然科学基金面上项目(30170792); 浙江省科技攻关重点科研项目(021106135); 浙江省自然科学基金面上项目(301524); 浙江省卫生厅重点项目(2004ZD006)。

作者简介: 徐珊珊(1984-), 女, 硕士研究生, 劳动卫生与环境卫生专业。

通讯作者: 曾群力(1969-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事电磁场生物学效应研究; E-mail: zengql@zju.edu.cn.

from different periods. **Results:** The protein measurements increased for 1.2 to 2 fold when different cell lysis buffers were used in Bradford method, but the measurements increased with the increased concentration of BSA ($r=0.989\sim0.996, P<0.05$). For BCA, measurement reading increased about thousands times higher, even overflowed the limits of machine. Protein measurements didn't change significantly, only showed a declined trend after repeated freeze thaw cycle, while no significant changes were found using different colorimetric cylinders or standard curves from different periods. **Conclusions:** Bradford method may be the choice of the protein quantification in proteomics. However, optimization is required for specific experimental conditions.

[Key words] Proteomics; Proteins/anal; Electrophoresis, gel, Two-dimensional; Serum albumin, bovine

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2008, 37(1):45-50.]

在蛋白质组学研究中,细胞蛋白样品的制备和精确定量是保证研究结果可靠的关键。在细胞蛋白的制备中,裂解液起到关键的作用,不同的裂解液,细胞蛋白的得率不同,而且在蛋白定量时,裂解液成分对蛋白定量方法的影响也不同。蛋白定量的常用方法主要有 Bradford 法、BCA 法、Lowry 法、双缩脲法、紫外分光光度法和凯氏定氮法等。其中,Bradford 法和 BCA 法是蛋白质组学研究中最常使用的两种定量方法。

Bradford 法是 Bradford 于 1976 年提出的,即考马斯亮蓝染色法,其原理是染料考马斯亮蓝 G250 最大吸收峰在 465 nm,当它和蛋白结合形成复合物时,其最大吸收峰改为 595 nm,在一定蛋白质浓度范围内,吸收峰值的大小与蛋白质含量呈线性关系,以此来定量溶液中的蛋白质^[1]。BCA(bicinchoninic acid)法是 20 世纪 80 年代中期研制的一种改进的 Lowry 测定法,其原理是在碱性条件下蛋白质的酰胺键与 Cu^{2+} 反应中生成的 Cu^+ 与 BCA 结合,形成的复合物在 562 nm 处有最大吸收峰,在一定蛋白质浓度范围内,光吸收强度与蛋白质浓度成正比^[2]。但这两种方法均会受到裂解液成分的影响,如,去污剂 CHAPS、SDS 和 Triton X-100 等可提高 Bradford 法的定量值^[3-4];还原剂 DTT、螯合剂 EDTA 和 EGTA 等可分别提高和降低 BCA 法的定量值^[3]。

荧光差异双向凝胶电泳(two-dimensional differential in-gel electrophoresis, DIGE)和传统双向凝胶电泳(two dimensional gel electrophoresis, 2DE)技术对样品的要求不同,需采用不同的裂解液配方。因此,本研究探讨了不同细胞裂解液对 Bradford 法和 BCA 法蛋白定量的影响,以期为后续的蛋白质组学研究提供合适的蛋白定量方法;同时,还分析了在蛋白质定量实验中反复冻融、不同比色杯以及不同时间的标准曲线等对蛋白质定量结果的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂:牛血清白蛋白(生物工程上海有限公司),考马斯亮蓝 G-250(国药集团化学试剂有限公司),BCA TM Protein Assay Kit (PIERCE, USA),标准 BSA 溶液(PIERCE, USA)。其余试剂均来自 Bio-Rad, USA。石英比色杯(Bio-Rad, USA),塑料比色杯(Bio-Rad, USA)。

1.1.2 溶液配制: DIGE 裂解液: 7 mol/L Urea, 2 mol/L Thiourea, 4% CHAPS, 30 mmol/L Tris, 罗氏蛋白酶抑制剂, HCl 调 pH 值至 8.5; 2DE 裂解液 A: 7 mol/L Urea, 2 mol/L Thiourea, 4% CHAPS, 2% IPG buffer pH 3~10, 65 mmol/L DDT, 罗氏蛋白酶抑制剂^[5]; 2DE 裂解液 B: 8 mol/L Urea, 4% CHAPS, 40

mmol/L Tris, 60 mmol/L DDT, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 罗氏蛋白酶抑制剂^[6]; 2DE 裂解液 C: 8 mol/L Urea, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 65 mmol/L DDT, 2% IPG buffer pH 3~10, 罗氏蛋白酶抑制剂^[7]。样品BSA溶液: 准确称量BSA干粉, 分别由双蒸水、DIGE裂解液和3种2DE裂解液配制成浓度为0.5 mg/ml的溶液。考马斯亮蓝溶液: 考马斯亮蓝 G-250 (10%, M/V), 95%乙醇 (5%, V/V), 磷酸 (10%, V/V), 过滤后, 4℃棕色瓶保存。

1.1.3 细胞种类: 人乳腺癌细胞 MCF-7 (DIGE裂解液, 2DE裂解液A), 小鼠胚胎成纤维细胞 NIH3T3 (2DE裂解液B), 人羊膜细胞 FL (2DE裂解液C)。

1.1.4 主要设备: SmartSpec 3000 分光光度计 (Bio-Rad, USA), 酶标仪 (infinite M200, TECAN, Switzerland), 旋转振荡仪 (Bio-Rad, USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 Bradford 法标准曲线制作: 分别取一定体积的浓度为0.5 mg/ml的标准BSA溶液于eppendorf管中, 加0.15 mmol/L NaCl溶液至100 μ l以配制成如下浓度梯度的BSA溶液: 0 mg/ml、0.025 mg/ml、0.05 mg/ml、0.075 mg/ml、0.1 mg/ml、0.2 mg/ml, 最后加900 μ l考马斯亮蓝溶液, 旋转混匀5 min后分光光度计上595 nm处读数。样品定量时, 用0.15 mmol/L NaCl溶液将样品(样品BSA溶液或蛋白质溶液)稀释至100 μ l, 再加900 μ l考马斯亮蓝溶液, 旋转混匀5 min后分光光度计上读数。

1.2.2 BCA法: 使用96孔板和BCA试剂盒。分别取一定体积的浓度为2 mg/ml的标准BSA溶液, 加PBS溶液至20 μ l配成如下浓度梯度的BSA溶液: 0 mg/ml、0.025 mg/ml、0.125 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、0.75 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml。样品(样品BSA溶液或蛋白质溶液)与PBS共20 μ l加样, 最后每孔均加160 μ l工作液混匀, 37℃孵育30 min, 冷却到室温后, 酶标仪上562 nm处读数。

1.2.3 细胞蛋白样品制备: 将细胞置于冰上, 弃培养液, 用预冷的PBS缓冲液洗3次, 加一定

量的裂解液后用刮棒将细胞刮下, 4℃旋转混匀裂解30 min, 再于冰上进行超声破碎(50~80 W, 工作5 s, 间隔8 s, 共8次循环), 最后14 000 r/min 4℃离心1 h, 取上清。分装冻存于-70℃冰箱。

1.2.4 反复冻融: 取上清时, 将同一蛋白样品均分为8份。第1天冰上解冻1份, -70℃继续冻存; 第2天冰上解冻2份, 包括第1天的1份; 第3天冰上解冻3份, 包括第2天的2份; 依次类推, 第8天全部冰上解冻后, 进行蛋白定量。8份蛋白分别被反复冻融1次、2次……8次。

1.3 统计方法 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 同一样品两组数据间比较采用配对 t 检验, 同一样品多组数据间比较采用重复测量方差分析, 不同样品间比较采用单因素方差分析, 组内定量浓度与加样浓度变化采用直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性, 数据统计处理由SPSS软件完成。

2 结果

2.1 裂解液对Bradford法定量的影响 用PIERCE标准BSA溶液做标准曲线, 分别定量由双蒸水、DIGE裂解液和3种2DE裂解液配制的样品BSA溶液。样品BSA溶液按落在标准曲线中间的浓度加样: 0.050 mg/ml、0.075 mg/ml、0.100 mg/ml、0.125 mg/ml、0.150 mg/ml。3次重复的定量结果如表1所示。

2.2 裂解液对BCA法定量的影响 使用BCA试剂盒分别测定由双蒸水、DIGE裂解液和3种2DE裂解液配制的样品BSA溶液, 配制的样品BSA溶液按标准曲线中部的浓度加样: 0.125 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml。3次重复的定量结果如表2所示。

2.3 BCA法和Bradford法对不同裂解液裂解提取的样品溶液的定量比较 分别采用BCA法和Bradford法对细胞全蛋白溶液样品进行定量, 全蛋白溶液分别由DIGE裂解液、2DE裂解液A、2DE裂解液B和2DE裂解液C裂解所得。4次重复的结果如表3所示。

2.4 反复冻融对定量的影响 将细胞全蛋白溶液样品分装为8份, 分别反复冻融1到8次, 用Bradford法定量。反复冻融后蛋白溶液浓度

表 1 五种溶剂配制的样品 BSA 溶液的 Bradford 法定量结果

Table 1 Concentrations of different BSA solutions determined by Bradford method

($n=3, \bar{x} \pm s, \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

BSA 样品 溶剂	BSA 溶液加样浓度					<i>r</i>
	0.05	0.075	0.1	0.125	0.15	
双蒸水	0.043±0.002	0.073±0.005	0.101±0.005	0.125±0.002	0.158±0.004	0.996**
DIGE 裂解液	0.068±0.001**	0.104±0.002**	0.133±0.005**	0.159±0.001**	0.181±0.001**	0.995**
2DE 裂解液 A	0.098±0.004*	0.128±0.008**	0.158±0.003**	0.182±0.006**	0.200±0.006**	0.990**
2DE 裂解液 B	0.038±0.003**	0.090±0.005**	0.140±0.001**	0.170±0.008**	0.200±0.003**	0.989**
2DE 裂解液 C	0.058±0.004**	0.107±0.002**	0.142±0.009**	0.180±0.002**	0.199±0.004**	0.990**
<i>F</i>	186.865	49.234	48.978	71.541	70.1	
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

在同一加样浓度下,4 种裂解液溶剂组的定量值分别与双蒸水溶剂组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;各溶剂组定量值上样浓度变化采用直线相关分析,** $P<0.01$

表 2 五种溶剂配制的样品 BSA 溶液的 BCA 法定量结果

Table 2 Concentrations of different BSA solutions determined by BCA method

($n=3, \bar{x} \pm s, \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

BSA 样品 溶剂	BSA 溶液加样浓度			<i>r</i>
	0.125	0.25	0.5	
双蒸水	0.113±0.010	0.277±0.025	0.550±0.069	0.0911**
DIGE 裂解液	--	--	--	
2DE 裂解液 A	--	--	0.674±0.034	
2DE 裂解液 B	0.874±0.065**	1.111±0.114**	1.065±0.030**	0.0499
2DE 裂解液 C	2.057±0.082**	--	--	
<i>F</i>	828.422	12.34	20.427	
<i>P</i>	0.001	<0.001	0.002	

在同一加样浓度下,4 种裂解液溶剂组的定量值分别与双蒸水溶剂组比较,** $P<0.01$;各溶剂组定量值上样浓度变化采用直线相关分析,** $P<0.01$;--表示样品的定量浓度超出了酶标仪读数范围

表 3 BCA 法和 Bradford 法对不同裂解液裂解的样品溶液的定量结果比较

Table 3 Concentrations of cell lysates in different lysis buffers determined by Bradford method and BCA method

($n=3, \bar{x} \pm s, \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

裂解液	BCA 法	Bradford 法
DIGE 裂解液	2000.138±43.789**	1.651±0.068
2DE 裂解液 A	1785.107±33.072**	6.127±0.114
2DE 裂解液 B	2.735±0.379**	1.713±0.045
2DE 裂解液 C	39.840±6.899**	1.177±0.048

采用配对 *t* 检验,vs Bradford 法,** $P<0.01$

3 次重复的定量结果如图 1 所示,经重复测量方差分析,发现反复冻融后蛋白浓度变化无规律性,但有下降的趋势。

2.5 不同比色杯对定量结果的影响 同一批蛋白样品分别使用石英杯和塑料杯进行 Bradford 法定量。3 次重复的定量结果如图 2 所示,经配对 *t* 检验分析,发现不同比色皿对定量结果无明显影响。

2.6 不同时期标准曲线对定量结果的影响 同一批蛋白样品分别使用新作标准曲线和原有保存旧标准曲线进行 Bradford 法定量。3 次重复的定量结果如图 3 所示,经配对 *t* 检验分析,

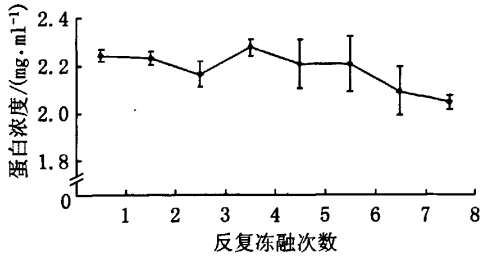


图1 反复冻融后蛋白样品浓度变化 (Bradford法)

Fig. 1 Changes of cell lysates concentration after repeated freeze-thaw cycles using Bradford method

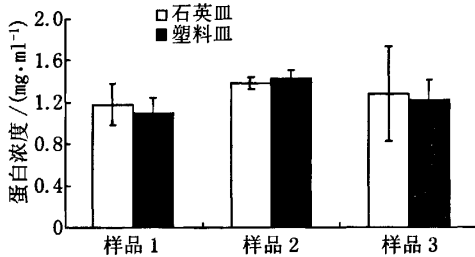


图2 不同比色杯下Bradford法定量结果

Fig. 2 Concentrations of cell lysates determined using Bradford method with different cuvettes

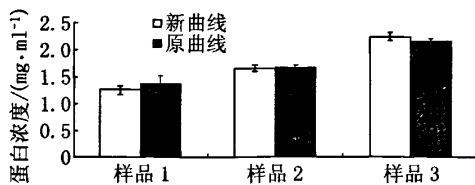


图3 不同标准曲线下Bradford法定量结果

Fig. 3 Concentrations of cell lysates determined using Bradford method with different standard curves

发现不同时期标准曲线对定量结果无明显影响。

3 讨论

为考查不同裂解液对两种定量方法的影

响,我们首先选用了商品化的BSA,用不同裂解液配制后以不同浓度上样进行定量分析。结果显示,采用Bradford法,除2DE裂解液B的0.05 mg/ml加样外,其余所有定量出的样品BSA溶液的浓度均高于真实值,最低为1.2倍左右,最高2倍左右,但同一裂解液配制的BSA溶液间的定量值可随着加样浓度的增加而增加(表1)。由于上述裂解液中均含有非离子表面活性剂CHAPS,Bradford法对CHAPS的最高耐受浓度是1%^[8]。表面活性剂可破坏考马斯亮蓝分子间的疏水相互作用,使考马斯亮蓝聚集体解聚从而加深溶液颜色^[4],这可能是本实验中Bradford法定量值普遍偏高的一个主要原因。

但是上述样品采用BCA法测定,发现多数BSA样品溶液的OD读数超出仪器读数范围,2DE裂解液A配制的BSA溶液定量浓度与真实加样浓度呈反向关系,2DE裂解液B配制的BSA溶液的定量值之间无明显线性关系(表2)。由于商品化BSA为单一蛋白质,为明确实际提取的混合样品的定量情况,我们对几种裂解液提取的样品溶液进行了分析,结果显示BCA法的定量结果远远高于Bradford法的定量值,可有千倍差异(表3)。BCA法对尿素、CHAPS和DDT的最高可接受浓度分别是3 mol/L、1%和1 mmol/L^[8],但在上述裂解液中的浓度分别为7 mol/L或8 mol/L、4%和65 mmol/L或60 mmol/L。推测这可能的主要原因是裂解液中还原剂DDT将Cu²⁺还原为Cu⁺,对BCA法产生较大干扰,使得定量值普遍偏高^[9]。EDTA和EGTA虽可螯合铜离子,但低于BCA法的最高耐受浓度10 mmol/L,不会对结果产生较大影响。但该现象还需作进一步的分析和探讨。

以上的研究表明Bradford法是蛋白质组学中较为适合的定量方法,对于裂解液的干扰,定量时可采用相应优化措施消除本底值。在实际工作中,应根据样品成分选择具体的定量方法,以避免后续结果的不可靠。

反复冻融是否会使得蛋白降解导致浓度发生变化;考马斯亮蓝颗粒较易黏附于石英比色杯上使其着色,这种黏附是否会影响蛋白定量结果;采用原有储存的标准曲线定量新样品是否

会因条件不同而使定量结果出现偏差。为此,我们对这些定量过程中的细节也进行了初步研究。结果显示,反复冻融后蛋白浓度变化无规律性,但有下降的趋势(图1)。对于提取的蛋白样品,需按量分装保存,尽量避免反复冻融。塑料杯、石英杯、新旧标准曲线对定量结果均无明显影响(图2、3)。但我们仍建议在每次定量前重新做标准曲线,以保证标准曲线和样本处于相同条件,从而得到更为准确的定量值。

References:

- [1] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976 (72):248-254.
- [2] WIECHELMAN K J, BRAUM R D, FITZPATRICK J D. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation [J]. *Anal Biochem*, 1988, 175(1):231-237.
- [3] FAN Hua-jie, LI Wen-jie (范华杰, 李文捷). Rational application of protein assay [J]. *Chin Int Med & Pharm* (中华国际医药杂志), 2003, 2 (2):126-128. (in Chinese)
- [4] CHAO Wen-gen, JIAO Qing-cai, LIU Xi, CHEN Lei (曹稳根, 焦庆才, 刘茜, 陈雷). Study on the mechanism of color changes of comassie brilliant blue G-250 [J]. *ACTA CHIMICA SINICA* (化学学报), 2002, 60(9), 1656-1661. (in Chinese)
- [5] ZENG Qun-li, WENG Yu, CHEN GUANG-di, et al (曾群力, 翁瑜, 陈光弟, 等). Effects of GSM 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields on protein expression profile of human breast cancer cell MCF-7 [J]. *Chin J Prev Med* (中华预防医学杂志), 2006, 40(3). (in Chinese)
- [6] JIN B F, HE K, WANG H X, et al. Proteomics analysis reveals insight into the mechanism of H-Ras-Mediate transformation [J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(10):2815-2823
- [7] SHEN J, WU M, YU Y. Proteomic profiling of cellular responses to different concentrations of N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine [J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(2):385-395
- [8] WANG Jia-zheng, FAN Ming (汪家政, 范明). *Manuals of Protein Technical* (蛋白质技术手册) [M]. 2000, 55-57. (in Chinese)
- [9] CHRISTINE V. SAPAN, ROGER L. LUNDBLAD, NICHOLAS C. Price. Colorimetric protein assay techniques [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, 29, 99-108.

[责任编辑 黄晓花]