

在 Opentrons Flex® 上自动化的 Bicinchoninic Acid (BCA) 检测法



作者

Evan Mettenbrink,¹ Nick Psychogios, Ph.D.,¹ Boren Lin, Ph.D.,²
Kinnari Watson, Ph.D.,² Andrea Casasola-LaMacchia, Ph.D.¹
¹Pfizer, Inc., ²Opentrons Labworks, Inc.

摘要

在生物分析领域，精准的总蛋白定量是蛋白质组学等工作的关键前提。实现 Bicinchoninic Acid (BCA) 检测法的自动化，既能帮助研究人员节省时间，又能保证结果的可靠性。本研究为 Opentrons Flex 平台开发了一套自动化 BCA 方案，并采用六只 Wistar Han 大鼠的四种不同器官组织对其性能进行了评估。该方案整合了自动化液体处理步骤与全集成的 Flex 板式吸光度读板器，实现了对蛋白质标准品、质控样品和组织裂解液吸光度的自动测量。与第三方酶标仪相比，测量结果在多次重复间保持一致。此外，全自动检测所得的组织裂解液总蛋白定量结果，也与手动制备样品高度匹配。这些发现共同证明了 Opentrons Flex 在劳动密集型实验中自动化的高度可靠性。

引言

BCA 检测法是一种基于比色原理，用于定量细胞或组织裂解液及纯化蛋白产品中总蛋白含量的常用方法。其检测原理是：将稀释后的蛋白样品与 BCA 工作试剂混合，在碱性环境下，蛋白中的肽键及部分氨基酸可将铜离子 (Cu^{+2}) 还原为亚铜离子 (Cu^{+1})；随后，每个亚铜离子与两个 BCA 分子通过螯合作用形成紫色复合物。该复合物在 562 nm 波长处存在特征吸收峰，通过测量此吸光度即可准确计算样品中的蛋白浓度。为确保定量准确，需使用已知浓度的牛血清白蛋白 (BSA) 校准品同步生成标准曲线。

鉴于该法定量结果可靠，常被用于蛋白质鉴定与结构分析等敏感的下游领域。为进一步提升分析效率与重现性，本研究将自动化理念引入该流程：我们针对 Opentrons Flex 平台优化了一套完整方案，实现了从样品分配、试剂添加到板式吸光度读板器吸光度测量的全流程自动化，专门用于蛋白质标准品与大鼠组织裂解液的 BCA 分析。

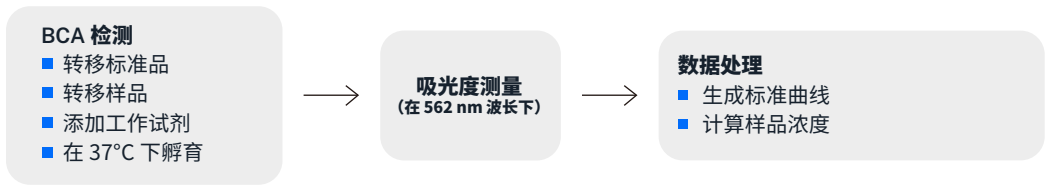
方法

使用 Opentrons Flex 制备了三种类型的蛋白样品，以评估自动化 BCA 方案的性能并与手动检测进行比较。通过连续稀释蛋白标准品（牛血清白蛋白 [BSA] Pierce™ 安瓿瓶，2 mg/mL；ThermoFisher Scientific Pierce BCA 蛋白检测试剂盒，货号 23227）在裂解缓冲液中制备了八个校准品（参见下图 2 表格），每个浓度点设置双复孔，浓度范围从 117.1 到 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。裂解缓冲液成分为：0.5% Triton X-100 (Fisher Scientific, 货号 PIB511) 和 1X 蛋白酶抑制剂混合物 (ThermoFisher, cat. 78430)，溶于 50% 的组织蛋白提取试剂 (ThermoFisher, 货号 78510) 中，并用去离子水稀释。另外制备了三个质控样品，每个设置双复孔，浓度分别为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (高浓度；QCH)、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (中浓度；QCM) 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (低浓度；QCL) (同样通过在裂解缓冲液中稀释制备)。对于实验样品，从野生型 Wistar Han 大鼠解剖了四种器官组织类型（心脏、大脑、肝脏和脾脏；每种组织 n=6）。对于手动和自动化方案，均使用自动化均质工作站 (Omni LH96) 进行组织称重和在裂解缓冲液中的均质化，达到 50 mg/mL 的浓度（均质前组织重量/裂解缓冲液体积）。最后，Flex 制备了总共 24 个大鼠组织样品，设置了两个稀释水平（10 倍和 20 倍；每个水平 1 个重复）。

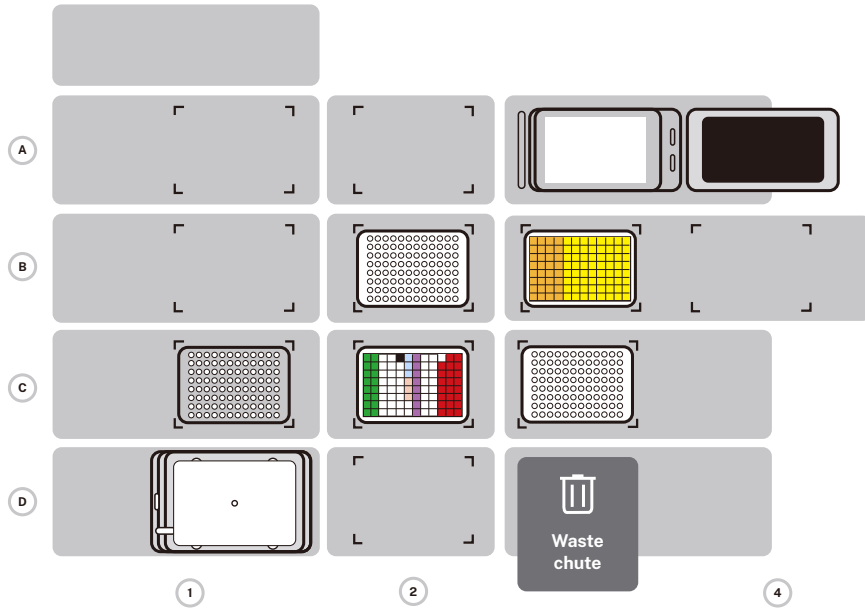
通过手动和自动化 BCA 检测对校准品、质控品和大鼠组织样品的总蛋白进行了定量。简而言之，在 96 孔检测板 (ThermoFisher Scientific Pierce™ BCA 蛋白检测试剂盒, 货号 23227) 中，将 20 μL 的校准品或质控/稀释样品与 180 μL BCA 工作试剂混合，并在 37°C 下孵育 30 分钟。孵育后，使用集成的 Opentrons Flex 板式吸光度读板器或类似的第三方系统在 562 nm 波长下测量每个板孔的吸光度。使用校准品浓度和吸光度值，通过二次校准曲线拟合计算样品和质控品的浓度。

结果

在 Opentrons Flex 上运行的优化方案包含以下步骤：首先精准执行标准品、质控品及实验样品的稀释与转移至 96 孔板的操作；随后自动添加 BCA 试剂，并启动在 37°C 下为期 30 分钟的孵育过程（依托 Opentrons 热振荡模块），以优化显色反应；最终，由集成于 Flex 的板式吸光度读板器在 562 nm 下自动完成吸光度检测。



甲板布局视图



- A3: Opentrons Flex 板式吸光度读板器
- B2: 96 孔板盖
- B3: 96 深孔板, 内含样品 (第 1-4 列)
- C1: Opentrons Flex 吸头架, 200 μL
- C2: 2 mL 方形 V 底 96 深孔板, 内含:
 - 每孔 1.5 mL BCA 试剂 (第 1 列)
 - 每孔 0.9 mL BCA 试剂 (第 2 列)
 - 450-600 uL BSA 标准品 (2 mg/mL; A5 孔)
 - 每孔 250 μL 裂解缓冲液 (B10 -> H10)
 - 每孔 1 mL 裂解缓冲液 (A11 -> H12)
- C3: 96 孔 BCA 检测板
- D1: Opentrons 热振荡模块

图 1. 总蛋白定量中 BCA 检测、吸光度测量和数据处理的 workflow (上图)。在 Opentrons Flex 上进行全自动 BCA 检测的甲板布局 (下图)。

最后，本研究对由蛋白标准品制备的八个校准品样品进行了评估，并用于绘制标准曲线（图 2）。每个校准品和质控品样品的吸光度测量值在六次独立运行中高度吻合，并且在集成的 Opentrons Flex 板式吸光度读板器与第三方酶标仪的直接比较中也表现一致（图 3）。

标准曲线准确性与重现性

校准品	浓度 (µg/mL)
S1	117.1
S2	175.6
S3	263.4
S4	395.1
S5	592.6
S6	888.9
S7	1333
S8	2000

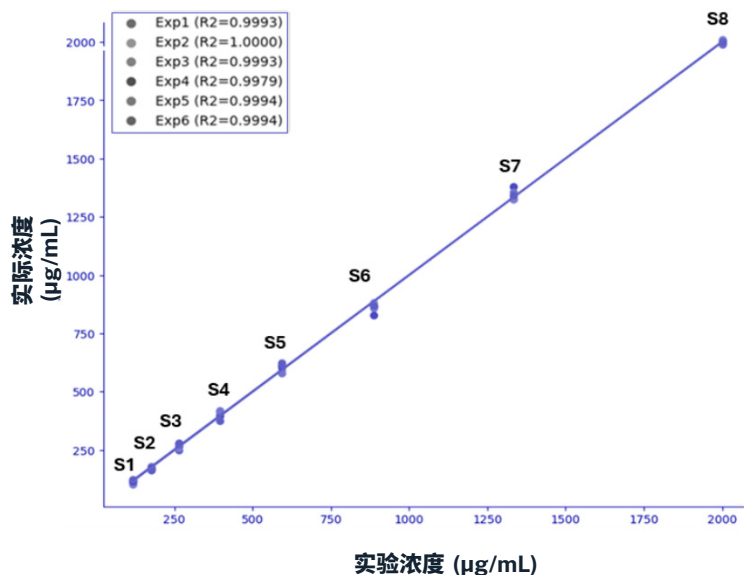


图 2. 从蛋白标准品制备了八个不同浓度的校准品（左）。进行了六次独立运行（标记为 Exp 1-6），设置双复孔，使用 BSA 的标准方案来绘制标准曲线（右）。

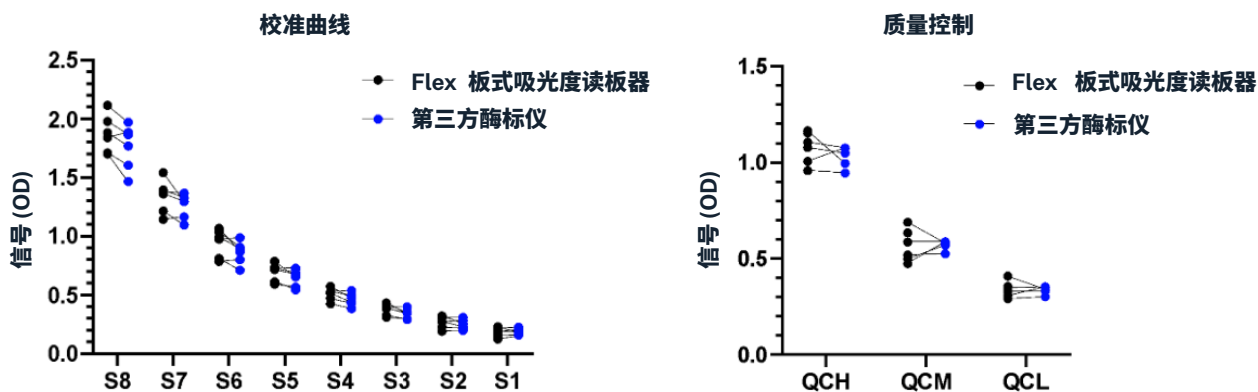
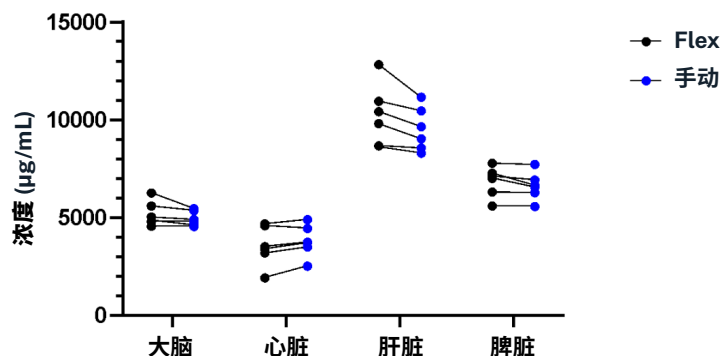


图 3. 对由蛋白标准品制备的八个校准品（左）和三个质控样品（右）（双复孔，3个水平；每个水平2个重复：QCH-1000 µg/mL, QCM-500 µg/mL, QCL-250 µg/mL）的吸光度测量值在六次独立运行之间进行了比较。吸光度测量在 562 nm 波长下使用第三方酶标仪（蓝色）或集成的 Flex 板式吸光度读板器（黑色）进行，显示出一致的线性和信号检测性能。

对大鼠器官组织裂解液（来自大脑、心脏、肝脏和脾脏）进行了总蛋白定量，以比较手动和自动化 BCA 检测方案。在 Opentrons Flex 上进行的全自动 BCA 检测计算出的样品浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 与使用手动 BCA 方案测量的浓度在四种器官类型和每种组织的六个样品中均保持一致（图 4）。

Flex BCA 方案与手动 BCA 样品定量比较

A 手动与 Flex 样品定量



B 手动与 Flex 样品定量

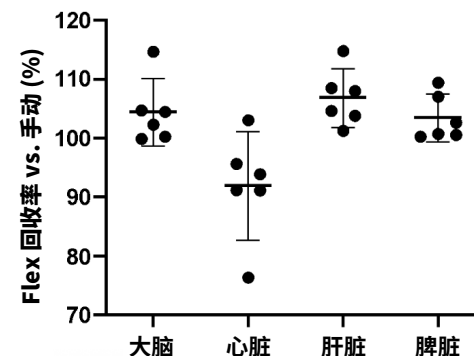


图 4. 对四种大鼠组织器官类型（大脑、心脏、肝脏和脾脏）的六个组织样品完成了总蛋白定量。测量总蛋白浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 以比较手动 BCA 检测方案与自动化方案。误差线 (B) 显示了总体均值的 95% 置信区间。

结论

BCA 检测法是总蛋白定量中广泛应用的一种方法，但其操作步骤通常较为繁琐，且对研究人员而言耗时较多。Opentrons 与辉瑞公司合作，基于 Opentrons Flex 平台开发了一套全自动 BCA 检测方案，可适用于蛋白质标准品、质控样品以及未知来源的大鼠组织裂解液的检测。结果显示，Opentrons Flex 板式吸光度读板器模块所测得的吸光度数据及其计算得出的蛋白浓度，与第三方酶标仪结果高度一致，使研究人员在确保检测稳健性与可靠性的同时，能够进一步实现实验流程的自动化。此外，该自动化 Flex BCA 方案显著减少了分析人员至少 50% 的手动操作时间。

综上所述，这一全自动蛋白定量方案展现出优异的准确度与可靠性，充分体现了 Opentrons Flex 在标准化实验室应用中的高效价值。