



臺北醫學大學
TAIPEI MEDICAL UNIVERSITY

生物化學實驗報告

蛋白質定量分析

組 別：第 14 組

主寫人：王威鈞 b202110089

組 員：陳相瑋 b202110082

李品辰 b202110064

日 期：2023/09/10

實驗目的：

本實驗目的為使用 ELISA 分光光度計建立蛋白質濃度標準曲線，並測量未知蛋白質溶液濃度。預期蛋白質吸光值與蛋白質濃度呈線性，可根據已知濃度蛋白質溶液吸光值建立的迴歸直線與未知蛋白質溶液吸光值回推其濃度。

而吸光值設定則因本次實驗使用 Bradford assay，其中染劑 Coomassie Blue G-250(CBG-250) 與蛋白質結合後會再 595nm 有吸光值高峰，所以設定分光光度計 595nm。

實驗步驟：

1. 實驗材料準備

- (1) BSA 胎牛血清蛋白，濃度為 1 mg/ml，以 1.5ml eppendorf 裝取 35 μ l
- (2) Bradford reagent，以離心管裝取 2.5ml
- (3) ddH₂O，以 1.5ml eppendorf 裝取 40ml
- (4) 再取八支 1.5ml eppendorf，其中六支標上組別 1~6，剩下兩支標示 A、B
- (5) unknown 待測溶液
- (6) 96 孔盤，**注意**不要接觸盤底
- (7) ELISA reader
- (8) 微量吸管 P2、P200、P1000 及 tip 將 1~6 及 A、B eppendorf 至於 rack 中，按照下表加入 BSA 及 ddH₂O。**注意**吸取微量體積時，tip 不可沒入液面太深，避免取量誤差。

2. 將 1~6 及 A、B eppendorf 置於 rack 中，按照下表加入 BSA 及 ddH₂O。**注意**吸取微量體積時，tip 不可沒入液面太深，避免取量誤差。

管號	BSA (μ l)	ddH ₂ O(μ l)
1	0	10
2	2	8
3	4	6
4	6	4
5	8	2
6	10	0
A	5	5
B	10	0

3. 將 Bradford reagent 吸取 300 μ l 加入 1~6 及 A、B eppendorf。**注意**加入時不要碰到樣品，如此可重複使用 tip。
4. 加入後，手指輕彈 eppendorf 底部，並靜置 5 分鐘。
5. 5 分鐘後，自 1~6 及 A、B eppendorf 吸取 150 μ l 樣品至 96 孔盤。
6. 96 孔盤放入 ELISA reader，待機器讀取後，紀錄讀值。

實驗結果及討論：

結果：

我們第一次染色反應後五分鐘，標準溶液透過迴歸分析得到的標準曲線 R^2 為 0.889，依此回歸線得未知樣品濃度為 0.811mg/ml；第二次實驗的吸光值，是我們再用第一次染色反應等待 30 分鐘後的樣品再跑一次 ELISA reader，得到 R^2 為 0.916，依此標準曲線得到的未知樣品濃度為 0.925mg/ml。第三次實驗數據是我們使用微量吸管重新調配 1~6 及 A、B eppendorf，再跑一次 ELISA reader 測得，標準曲線 R^2 為 0.797，推得未知樣品濃度 0.892 mg/ml。

Table 1 BAS 吸光值回歸直線與未知 BSA 濃度

y=a+bx	第一次	第二次	第三次
a	0.0334	0.0238	0.0300
b	0.0232	0.0224	0.0750
R^2	0.889	0.916	0.797
A(mg/ml)	0.823	0.966	0.918
B(mg/ml)	0.799	0.884	0.867
平均	0.811	0.925	0.892

實驗數據：

Table 2 三次實驗實驗吸光值數據

BSA (mg)	第一次		第二次		第三次	
	OD _{595nm}	raw data	OD _{595nm}	raw data	OD _{595nm}	raw data
0	0	0.122	0	0.119	0	0.731
2	0.107	0.229	0.091	0.21	0.116	0.847
4	0.12	0.242	0.102	0.221	0.29	1.021
6	0.199	0.321	0.177	0.296	0.799	1.53
8	0.244	0.366	0.229	0.348	0.517	1.248
10	0.227	0.349	0.216	0.335	0.707	1.438
A(5µl unknown)	0.144	0.266	0.132	0.251	0.374	1.105
B(10µl unknown)	0.249	0.371	0.222	0.341	0.68	1.411

實驗作圖：

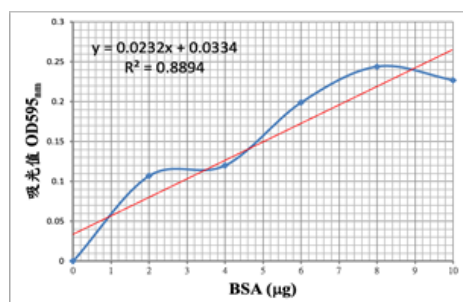


Fig 1 第一次實驗迴歸直線

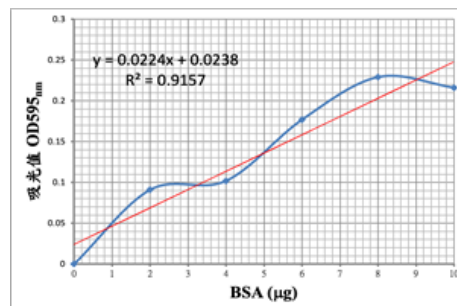


Fig 2 第二次實驗迴歸直線

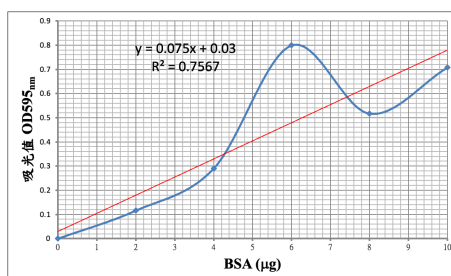


Fig 3 第三次實驗迴歸直線

實驗討論：

1. 如果實驗上有誤差，可能造成的原因為何？

- (1) 操作微量吸管技術不佳，在吸取 2~10μl 時，可能將 tip 插入液面太深，使 tip 外部沾取過多樣品，使得後續濃度出現誤差。
- (2) 機器量測問題，老師有提到我們使用的機器在過往觀察中有個傾向是會在第 6 個樣品的吸光值會降低。
- (3) 染色時間問題，我們組第一次與第二次實驗使用同一台機器在不同時間讀取同一組樣品，卻做出兩個不同的 R 平方值，推測如果染劑應該能與蛋白質維持一段時間穩定結合，那也有可能是染劑老化，品質較差。
- (4) 添加染劑後，可能混和不均，再等待染色反應的 5 分鐘裡，我們發現有一管樣品呈現分層的狀況，上層為藍色，下層為深咖啡色，推測可能是混不均勻。
- (5) 在第三次實驗中 BSA=0.6μg 的吸光值特別高，我們認為可能是 ELISA reader 測量時存在氣泡或灰塵導致。

2. 如何減少本次實驗所造成的誤差與錯誤？

在其他組有做出 R 平方值高達 0.98 的情況下，我認為最主要還是自己操作微量吸管的技巧要再更加精進。

3. 與本次實驗相關的其他方法或研究。

(1) 同的蛋白質定量方法^[1-3]

- a. 凱氏定氮法：原理是利用蛋白質含氮量，通過測定物質中含氮量來回推蛋白質的量。
- b. UV 吸光值 280nm：主要利用含有苯環的氨基酸對於波長 250nm 以上有吸收作用的性質來測定蛋白質，含有 phenylalanine、tyrosine 或 tryptophan 的蛋白質可用此法測定。不過要注意可能有在 280nm 處有吸收作用的物質造成誤差 (像是核酸)。檢測範圍：0.1-100 ug/ml。優點試紙需要少量樣品、便宜、快速；缺點是跟一些會使用到介面活性劑 detergents、變性劑 denaturing agents 的蛋白質萃取方法不相容。
- c. Biuret 法：機制是在鹼性溶液中二價銅離子與蛋白質反應後產生一價銅離子，後續再添加不同反應物可分為 BCA 法及 Lowry 法，不過反應皆是與一價銅離子產生反應，再進行吸光值測試。此法優點是不受介面活性劑以及變性劑影響、靈敏度佳；BCA 法及 Lowry 法的缺點各有不同，不過同樣是會受到還原性強的物質干擾 (例如還原糖)。
- d. 螢光染色法：利用螢光染劑來檢測蛋白質中的胺。優點是敏感度高，僅需要少量樣品 (0~ 150µg/100µl)；缺點是需要特別的影像系統。

參考資料

- [1] James E Noble and Marc JA Bailey. Quantitation of protein. *Methods in enzymology*, 463:73–95, 2009.
- [2] Overview of protein assays methods. <https://www.thermofisher.com/tw/zt/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-assays.html>.
- [3] 蛋白質研究及教學主題. <https://www.bio.fju.edu.tw/teaching-excellence-project/content04/index.htm>.