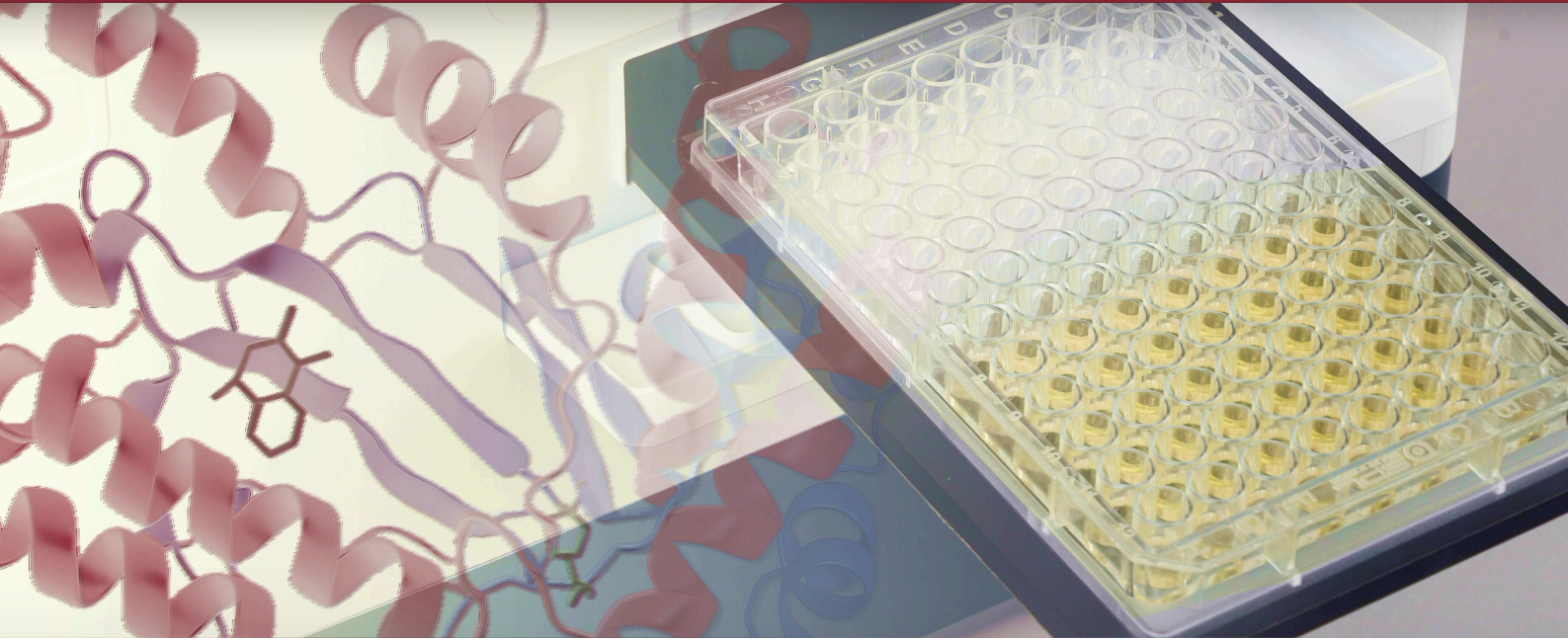


MRX A2000 기반 Rapid BCA 단백질 정량 분석



요약

본 실험에서는 K LAB MRX A2000 Microplate Reader의 자동화된 [Workflow] 기능을 이용하여 Rapid BCA 단백질 정량 분석을 수행하였다. 0.125-5.000 mg/mL 농도 범위에서 측정된 BSA 표준용액은 2차 다항식 검량선 기반으로 $R^2 \geq 0.999$ 의 우수한 직선성을 보였다.

Back-calculated 농도를 기준으로 한 %RE는 -8~+4% 범위로 정확도 기준을 만족했으며, %CV는 모든 농도에서 6% 이하로 나타나 높은 반복 정밀도를 확인하였다.

추가 관찰에서 Rapid BCA 반응액은 시간 경과에 따라 발색이 변화하는 특성을 보였으나, MRX의 자동 워크플로우는 혼합·인큐베이션·측정 타이밍의 변동을 최소화하여 이러한 영향을 억제하였다.

본 결과는 MRX A2000이 Rapid BCA Assay에 적합한 자동화 플랫폼임을 보여준다.

국내 분석장비 산업을 선도하는 케이랩 주식회사, 연구 및 제조까지 전 과정을 한 곳에서 책임지는 국내의 유일한 전문 연구·제조 기업입니다.

주소
(34014) 대전광역시 유성구 테크노 2로 94-23

홈페이지
www.klab.im

전화번호
042-932-7586

문의
info@klab.im

담당자 이메일
mint5135@klab.im

개요

단백질 정량은 생명과학 및 바이오 연구에서 기본적으로 필수적인 분석 과정이며, BCA(Bicinchoninic Acid) 단백질 정량법은 다양한 시료에 적용 가능하고 정확도가 높아 널리 활용되고 있다. Rapid BCA Assay는 기존 BCA 방식에 비해 반응 시간이 짧아 신속한 결과 확인이 가능하지만, 시약 분주 및 혼합 속도, 인큐베이션 편차 등 작업자 간 변동이 결과 재현성에 중요한 영향을 미치는 특성이 있다.

본 노트의 목적은 MRX A2000 Microplate Reader의 [Workflow] 자동화 기능을 적용하여 Rapid BCA Assay를 수행하고, 자동화된 시약 혼합·인큐베이션·흡광도 측정 과정이 분석의 직선성(Linearity), 정확도(%RE), 정밀도(%CV)에 미치는 영향을 평가하는 것이다. MRX의 자동화 기능이 Rapid BCA Assay의 시간 민감적 특성을 보완하여 보다 안정적이고 재현성 높은 단백질 정량을 지원할 수 있는지 확인하였다



[그림 1] MRX A2000 Microplate Reader - K LAB의 다기능 흡광도 측정 장비로, 다양한 well plate 및 포맷을 지원하며 온도 제어와 인큐베이션 기능을 제공한다.

실험 조건

1. 사용 장비

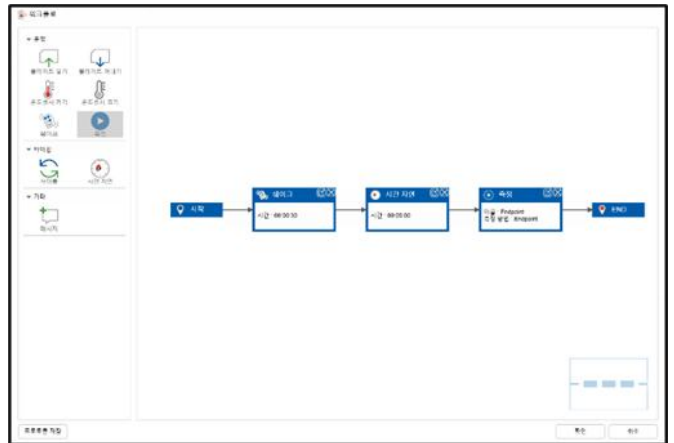
- MRX A2000 Microplate Reader (K LAB)

2. 시약 및 표준물질

- Pierce™ Dilution-Free™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat.No. A55860)
 - Bovine Serum Albumin (BSA) 표준용액 (0.125-10 mg/mL, 제공된 pre-diluted tubestrip)

3. 측정 조건

- 파장: 480 nm
 - 반응 조건: 상온에서 5분 인큐베이션
 - MRX [Workflow] 설정: Plate shaking (30초, Double orbital) - Incubation (5분) - Absorbance 측정 (480nm)



[그림 2] MRX Microplate Reader 소프트웨어에서 설정한 Rapid BCA Assay [Workflow] - 본 [Workflow]는 연구자의 개입 없이 자동으로 실행된다.

실험 절차

1. Working Reagent (WR) 제조

① Reagent A와 Reagent B를 50:1 비율로 혼합하여 Working Reagent를 준비하였다.
본 실험에서는 Reagent A 22 mL와 Reagent B 0.44 mL를 혼합하여 사용하였다.

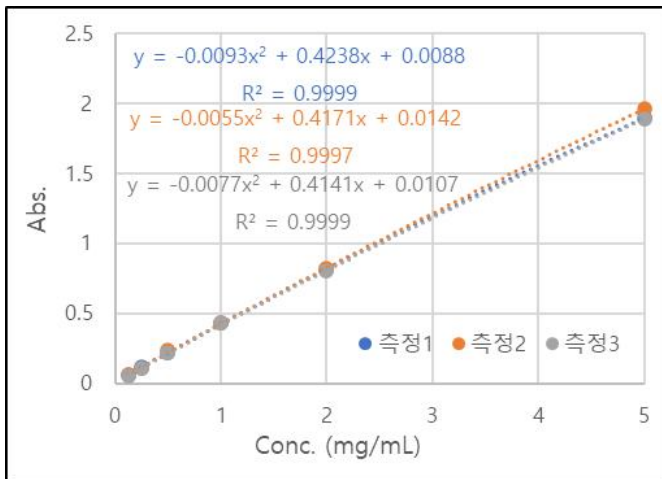
2. 시료 준비 및 측정 과정

- ① BSA 표준 용액(0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 5 mg/mL)을 각 10 µl씩 96-well microplate에 분주하였다.
- ② 각 well에 Working Reagent 200 µl를 멀티채널 파이펫으로 분주하였다. 시료 혼합 과정에서 발생할 수 있는 시간 차이를 줄이기 위해 빠른 연속 분주를 수행하였다.
- ③ Well plate를 MRX Microplate Reader의 측정부에 장착한 후, 사전 설정된 [Workflow]를 실행하여 자동 수행되었다.
- ④ 각 well의 흡광도 값을 수집하고, Blank 값을 보정한 후 표준곡선을 작성하였다. 동일한 방법으로 3회 반복 실험을 수행하였다.

결과

1. 곡선 피팅

0.125-5.000 mg/mL 구간에서 측정된 데이터는 2차 다항식으로 피팅되었으며, 모든 반복 실험에서 결정계수(R²)가 0.999 이상으로 나타났다.



[그림 3] Rapid BCA Assay 표준곡선 - 3회 반복 측정, 2차 다항식 피팅 결과

2. 정확도 (%RE)

측정된 흡광도 값으로부터 back-calculated 농도를 산출하고, 기준 농도와 비교하여 %RE (Relative Error)를 계산하였다.

Conc. (mg/mL)	Avg. Measured Abs.	Avg. Back-calculated Conc. (mg/mL)	%RE
0.125	0.0593	0.115	-7.98
0.250	0.1088	0.234	-6.32
0.500	0.2258	0.518	5.33
1.000	0.4329	1.027	2.70
2.000	0.8096	1.979	-1.07
5.000	1.9155	5.000	-0.01

[표 1]. 기준 농도 대비 Back-calculated 농도 및 %RE

3. 정밀도 (%CV)

각 농도에서 3회 반복 측정값을 이용하여 %CV(Coefficient of Variation)를 계산하였다.

Conc. (mg/mL)	%CV
0.125	5.9
0.250	3.8
0.500	3.9
1.000	0.5
2.000	1.0
5.000	1.7

[표 2]. 각 농도별 %CV (정밀도)

4. Rapid BCA Assay 반응액의 시간 경과에 따른 색 변화

추가로, 반응액의 색 변화 양상을 시간에 따라 확인하였다. 반응 직후(5분 시점)에는 단백질 농도에 따라 황색에서 주황색으로 이어지는 구배가 뚜렷하게 나타났다. 그러나 동일한 플레이트를 30분 후에 촬영한 결과, 발색 강도가 변화하면서 초기 구배와 차이가 발생하였다. 이는 Rapid BCA Assay에서 시간 경과가 결과 해석에 영향을 줄 수 있음을 시각적으로 보여준다.



[그림 4] Rapid BCA Assay 반응액의 시간 경과에 따른 색 변화

결론

본 실험에서는 MRX Microplate Reader를 이용해 Rapid BCA Assay를 수행하였다.

0.125-5.000 mg/mL 구간에서 작성된 검량선은 2차 다항식 피팅 시 R^2 값이 0.999 이상으로 계산되었다.

Back-calculated 농도 기준 %RE는 -8%에서 +4% 범위였으며, %CV는 모든 농도에서 6% 이하였다.

또한 MRX의 [Workflow] 기능을 활용하여 시약 혼합·인큐베이션·흡광도 측정을 자동으로 수행함으로써, 반복 측정 간 조건을 일정하게 유지할 수 있었다.

*참고문헌(자료출처):

- Thermo Fisher Scientific. *Pierce™ Dilution-Free™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit User Guide*. Pub. No. MAN0029413, Rev. B.0, 26 October 2023.