

BCA - количественное определение белка

Артикулы Servicebio: G2026-200T, G2026-1000T

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО / ПОДГОТОВКА И РАБОЧИЕ УСЛОВИЯ

Что подготовить

Подготовьте планшетный фотометр, подходящий прозрачный планшет, термостат, дозаторы и буфер образца. До начала реакции составьте схему размещения стандартов, фона и неизвестных проб. Укажите разведения рядом с номерами образцов: ошибку в коэффициенте разведения невозможно заметить только по оптической плотности.

ОСНОВНЫЕ УСЛОВИЯ ПО ИНСТРУКЦИИ SERVICEBIO

Для какой задачи

Определение концентрации белка по окрашенному комплексу BCA с медью. Измерение проводят при 562 нм относительно стандартов BSA.

Подготовка

Стандарт: 25 мг BSA растворяют в 1 мл комплектного растворителя. Из запаса 25 мг/мл готовят рабочий стандарт 0,5 мг/мл; производитель рекомендует последовательное разведение. Для планшетного протокола указаны стандарты 0; 25; 50; 100; 200; 300; 400; 500 мкг/мл, по 20 мкл. Образцы и стандарты разводят одинаковым буфером.

Реакция и расчёт

Смешайте BCA-реагент и раствор сульфата меди 50:1. На 20 мкл образца или стандарта внесите 200 мкл смеси. Основной режим: 37 °C, 30 мин. По калибровке определите концентрацию и умножьте на коэффициент разведения образца. Образец должен попадать в диапазон выбранной калибровки.

Что мешает измерению

Результат зависит от температуры и времени. Хелаторы и восстановители создают помехи: EGTA исключают; EDTA должен быть ниже 10 мМ, DTT и β-меркаптоэтанол - ниже 1 мМ.

Хранение

Сухой BSA: 2-8 °C, 12 месяцев; растворённый стандарт: -20 °C, до 6 месяцев. Остальные компоненты - при комнатной температуре, 12 месяцев.

Как спланировать постановку • рекомендации Молекулаб

Для первого запуска предлагаем измерить несколько разведений неизвестного образца и предусмотреть технические повторы. Это позволит выбрать участок калибровки и увидеть разброс дозирования. Рассчитайте число лунок заранее: стандарты и фон тоже расходуют реагент. Отдельно запишите состав лизирующего буфера и проверьте совместимость его компонентов с BCA.

Результат и контроль качества

Пояснения к методу и практические рекомендации Молекулаб

Что означает результат

ВСА определяет суммарную концентрацию белка, а не содержание конкретного белка-мишени. Результат удобно использовать для выравнивания белковой нагрузки перед электрофорезом. Показания образца следует сопоставлять с калибровкой, полученной в той же постановке. Наличие нескольких стандартов не отменяет проверки их фактического сигнала и воспроизводимости.

Какие контроли нужны

Фоновая лунка содержит буфер без белка и рабочую реакционную смесь. Её сигнал учитывают при обработке стандартов и образцов одинаковым способом. Если неизвестная проба находится за пределами выбранной калибровки, предпочтительно повторить её с другим разведением, а не продолжать кривую далеко за область измеренных стандартов.

Учебный пример расчёта

По калибровке получено 180 мкг/мл. Проба была разведена в 5 раз. Исходная концентрация: $180 \times 5 = 900$ мкг/мл = 0,9 мг/мл. Для загрузки 18 мкг белка нужно $18 / 0,9 = 20$ мкл этого образца. Это пример арифметики, не результат испытания набора.

Если результат вызывает вопросы

Высокий фон	Проверьте буфер, чистоту посуды и отсутствие мешающих компонентов. Один только вычет фона не доказывает совместимость буфера.
Разброс повторов	Сверьте дозирование, перемешивание и одинаковое время начала реакции.
Разведения не согласуются	Проверьте расчёт коэффициентов и возможность матричного влияния; повторите подготовку пробы.

Что сохранить в лабораторном журнале

Сохраняйте исходные значения A562, концентрации стандартов, способ аппроксимации, разведения, время и температуру реакции. Для дальнейшей нормализации указывайте единицы концентрации рядом с каждым результатом.