

Servicebio Набор реагентов для количественного определения белка методом BCA, 1000 реакций

Cat # : G2026

Инструкция

Наименование	Cat. No.	Спецификация
Набор реагентов для количественного определения белка методом BCA	G2026-200T	200 реакций
	G2026-1000T	1000 реакций

Описание набора

Методы Брэдфорда и BCA являются наиболее часто используемыми методами количественного определения концентрации белка. Набор для количественного определения белка BCA представляет собой совместимый с детергентом препарат на основе бицинхониновой кислоты (BCA) для колориметрического определения общего количества белка. Этот метод сочетает в себе хорошо известное восстановление Cu^{2+} до Cu^{+} белком в щелочной среде (биуретовая реакция) с высокочувствительным и селективным колориметрическим определением катиона меди (Cu^{+}) с использованием уникального реагента, содержащего бицинхониновую кислоту. Окрашенный в фиолетовый цвет продукт реакции этого анализа образуется в результате хелатирования двух молекул BCA с одним ионом меди. Этот водорастворимый комплекс обладает высокой поглощающей способностью при длине волны 562 нм, которая практически линейна при увеличении концентрации белка в широком рабочем диапазоне (50-2000 мкг/мл). На этот метод не влияют химические вещества и высокая концентрация детергента в большинстве образцов, включая 5% SDS, 5% Triton X-100 и 5% Tween-20, 60, 80 и т.д. Однако хелатообразователь и восстановитель высокой концентрации могут повлиять на результаты обнаружения. Итак, необходимо убедиться, что в образце отсутствует EGTA, концентрация EDTA составляет менее 10 мм, а концентрация DTT и β -меркаптоэтанола - менее 1 мм. Если образец содержит хелатообразователь или восстановитель, пожалуйста, воспользуйтесь набором для количественного определения белка по Брэдфорду (G2001).

Хранение и условие доставки

Хранить при комнатной температуре; G2026-3 хранить при температуре 2-8°C, срок годности - 12 месяцев. G2026-4 следует хранить при температуре -20°C и использовать в течение 6 месяцев. Остальные реагенты хранить при комнатной температуре, срок годности - 12 месяцев.

Состав набора

Состав набора:	Компоненты	G2026-200T	G2026-1000T
G2026-1	Бицинхониновая кислота (BCA)	40 мл	2×100 мл
G2026-2	Раствор сульфата меди	1.2 мл	5×1.2 мл
G2026-3	Стандарт белка (BSA)	25 мг	5×25 мг
G2026-4	Стандартный р-р разбавителя белка	1.5 мл	5×1.5 мл
Инструкция		1 шт.	

Протокол анализа

1. Приготовление стандартного раствора для хранения белка: добавьте 1 мл стандартного раствора для разбавления белка в стандарт белка (BSA) и полностью растворите 25 мг стандартного белка, чтобы получить стандартный раствор для хранения протеина с концентрацией 25 мг/мл. Стандартный раствор для хранения белка может храниться в течение длительного времени при температуре -20°C ;
2. Приготовление стандартного рабочего раствора белка: 25 мг/мл стандартного раствора белка для хранения разбавляют в 50 раз PBS или физиологическим раствором для получения стандартного раствора

белка с конечной концентрацией 0,5 мг/мл. Обратите внимание на метод разбавления с 10-кратным градиентом для обеспечения точности.

3. Стандартная кривая: Стандартный рабочий раствор белка добавляли в 96-луночный планшет в количестве 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16 и 20 мкл, а затем указанный выше градиентный рабочий раствор доливали до 20 мкл, добавляя 20, 19, 18, 16, 12, 8, 4 и 0 Мкл PBS или физиологического раствора, чтобы получить градиентные кривые с концентрациями белка на уровне 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400 и 500 мкг/мл в следующем порядке. Были получены градиентные кривые порядка 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 мкг/мл.
4. Подготовка тестируемой пробы: тестируемую пробу разбавляют соответствующим образом (при предварительном определении концентрация белка в тестируемой пробе находится в пределах стандартной кривой, что обеспечивает надежность результатов определения) и пипетируют 20 мкл каждой тестируемой пробы в 96-луночный планшет. Тестируемый образец и стандартный рабочий раствор белка разводят одним и тем же раствором.
5. Приготовление рабочего ВСА: смешайте 50 частей реагента ВСА с 1 частью раствора сульфата меди (50:1, реагент ВСА: раствор сульфата меди). Рабочий раствор ВСА можно хранить при комнатной температуре и использовать в течение 24 часов. Добавьте 200 мкл рабочего раствора ВСА в каждую лунку. Рекомендуется готовить по мере необходимости, чтобы избежать потерь.
6. Определение: добавьте 200 мкл рабочего раствора ВСА в каждую лунку и тщательно перемешайте планшет на шейкере в течение 30 секунд; После того, как планшет накрыли крышкой и выдерживали при 37°C в течение 30 минут, в качестве эталона использовали стандартную кривую № 0 для измерения оптической плотности на планшете, равной или близкой к 562 нм микропланшетного ридера. (Примечание: реакцию также можно проводить при комнатной температуре в течение 2 ч или при температуре 60°C в течение 30 мин. Если концентрация белка низкая, рекомендуется проводить реакцию при температуре 60°C)
7. Расчет: была построена стандартная кривая с градиентным содержанием белка (мкг/мл) по оси абсцисс и значением абсорбции по оси ординат. В соответствии со значением поглощения тестируемого образца на стандартной кривой можно найти концентрацию белка (мкг/мл) в тестируемом образце в соответствующей лунке, а затем умножить на коэффициент разбавления образца и получить фактическую концентрацию белка в тестируемом образце.

Примечание

1. Определение концентрации белка методом ВСА в значительной степени зависит от температуры и времени, и величина поглощения будет меняться с увеличением времени или температуры. Если невозможно точно контролировать время и температуру реакции окрашивания, рекомендуется составлять стандартную кривую для каждого определения.
2. При приготовлении стандартного раствора для хранения белка необходимо обеспечить достаточное растворение. При приготовлении стандартного рабочего раствора рекомендуется разбавлять в 10 раз по градиенту. Не разбавляйте в 50 раз за раз, чтобы избежать ошибок.
3. Чтобы гарантировать количественное определение белка, лучше выбирать один и тот же буферный раствор для экстракции образца и стандартного разведения белка, чтобы обеспечить одинаковые условия определения. Если фоновое значение буфера высокое, рекомендуется использовать другие методы.
4. В целях вашей безопасности и здоровья, пожалуйста, надевайте защитные очки, перчатки или защитную одежду.

Только для исследовательских целей!