

GEBRAUCHSANLEITUNG

BCA Protein Macro Assay Kit

Kit für die Proteinkonzentrationsbestimmung

(Kat.-Nr. 39228)



SERVA Electrophoresis GmbH • Carl-Benz-Str. 7 • D-69115 Heidelberg
Phone +49-6221-138400, Fax +49-6221-1384010
e-mail: info@serva.de • <http://www.serva.de>

Inhaltsverzeichnis

1.	BCA PROTEIN MACRO ASSAY KIT	2
1.1.	Allgemeine Hinweise	2
1.2.	Kit-Komponenten	2
1.3.	Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	3
1.4.	Lagerbedingungen	3
2.	DURCHFÜHRUNG DER PROTEINBESTIMMUNG	3
2.1.	Ansetzen der Lösungen und Standards	3
2.1.1.	Proteinstandard	3
2.1.2.	BCA-Arbeitslösung (BAL)	3
2.2.	Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen	4
2.3.	Durchführung der Proteinbestimmung	4
2.3.1.	Protokoll	4
2.3.2.	Schema zur Durchführung der Proteinbestimmung	5
2.4.	Berechnung der Proteinkonzentration	6
2.4.1.	Erstellung der Kalibrierungskurve	6
2.4.2.	Berechnung der Proteinkonzentration	6
3.	LITERATUR	7
4.	TROUBLESHOOTING	8

1. BCA Protein Macro Assay Kit

1.1. Allgemeine Hinweise

Der gebrauchsfertige SERVA BCA Protein Macro Assay Kit basiert auf der Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (*Bicinchoninic acid*, BCA).

Die Proteinquantifizierung mit BCA ist eine Kombination aus der Biuret- und einer Komplexbildungsreaktion mit BCA. Beim ersten Reaktionsschritt, der Biuret-Reaktion, wird Cu(II) in alkalischer Lösung zu Cu(I) reduziert. Im zweiten Reaktionsschritt bilden zwei BCA-Moleküle mit einem Cu(I)-Ion einen Chelatkomplex. Dieser wasserlösliche Komplex zeigt bei 562 nm eine starke Absorption und kann spektralphotometrisch analysiert werden.

BCA-Proteinreaktion

1. Protein (Peptidbindungen) + Cu²⁺ • Cu¹⁺ -Biuret Komplex
2. Cu¹⁺ + 2 Bicinchoninsäure • BCA-Cu¹⁺ Komplex (Absorptionsmaximum bei 562 nm).

Der SERVA BCA Protein Macro Assay Kit enthält standardisierte Reagenzien, die über einen weiten Konzentrationsbereich von 25 bis 1000 µg/ml Protein einen linearen Absorptionsverlauf bei 562 nm liefern. Die makromolekulare Proteinstruktur, die Anzahl der Peptidbindungen sowie das Vorhandensein der Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin sind für die Farbreaktion des Proteins mit BCA verantwortlich.

1.2. Kit-Komponenten

Komponente	Kat.-Nr. 39228.01 (250 Assays)	Kat.-Nr. 39228.02 (500 Assays)
Reagent A: BCA-Lösung	500 ml	2 x 500 ml
Reagent B: Kupfersulfat-Lösung	10 ml	20 ml
Proteinstandard (Rinderserumalbumin) BSA	10 x 2 mg	20 x 2 mg

1.3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Vortex-Mixer
- Spektralphotometer für Absorptionsmessung bei 562 nm
- Kunststoffküvetten

1.4. Lagerbedingungen

Der BCA Protein Macro Assay Kit ist bei der empfohlenen Lagertemperatur von +2 - +8 °C mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

2. Durchführung der Proteinbestimmung

2.1. Ansetzen der Lösungen und Standards

2.1.1. Proteinstandard

Das mitgelieferte BSA (2 mg/vial) wird durch Zugabe von 1 ml dest. H₂O mit 0,05 - 0,1 % NaN₃ rekonstituiert, so dass die BSA-Konzentration 2 mg/ml beträgt. Die so erhaltene **BSA-Stocklösung** kann bei 4 °C ca. 2 Wochen gelagert werden.

Für die Erstellung der Kalibrierungskurve wird die BSA-Stocklösung entsprechend dem Pipettierschema verdünnt. 2 mg BSA-Standard sind ausreichend für eine 3-fach Bestimmung.

2.1.2. BCA-Arbeitslösung (BAL)

Zur Herstellung der BAL mischen Sie 50 Teile Reagent A mit 1 Teil Reagent B. Bei Zugabe von Reagent A zu B zeigt sich zunächst eine Trübung, die sehr schnell verschwindet sobald beide Lösungen vermischt werden. Pro Ansatz werden 2 ml BAL benötigt, so dass die entsprechende Menge BAL zur Durchführung der Quantifizierung angesetzt werden sollte. Die BAL ist einen Tag stabil, wenn sie verschlossen bei Raumtemperatur gelagert wird.

2.2. Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen

BSA Endkonzentration [µg/ml]	Volumen BSA [µl]	Volumen Diluent [µl]
1000 (A)	750 (Stocklösung)	750
750 (B)	375 (A)	125
500 (C)	250 (A)	250
250 (D)	125 (A)	375
100 (E)	50 (A)	450
50 (F)	25 (A)	475
25 (G)	12,5 (A)	487,5

2.3. Durchführung der Proteinbestimmung

Aufgrund der Aminosäuresequenz, des isoelektrischen Punktes, der Struktur eines Proteins sowie der Anwesenheit bestimmter Seitengruppen oder prosthetischer Gruppen, kann es zu deutlichen Veränderungen der Farbreaktion eines Proteins kommen.

Bei den meisten Quantifizierungsassays ist die Genauigkeit, die entweder BSA oder Immunglobulin G (IgG) als Proteinstandard liefern, ausreichend. Falls große Genauigkeit erforderlich ist, sollte die Kalibrierungskurve mittels einer reinen Probe des Zielproteins erstellt werden.

Bitte beachten Sie, dass folgende Substanzen zu Störungen des Assays führen und deshalb in der Probe vermieden werden sollten.

Ascorbinsäure	Catecholamin	Creatinin
Cystein	EGTA	Glycerin, nicht reinst
Wasserstoffperoxid	Hydrazid	Eisen
Lipid	Melibiose	Phenolrot
Sucrose, nicht reinst	Tryptophan	Tyrosin
Harnsäure		

2.3.1. Protokoll

- Für jede Testreihe sollte separat eine Kalibrierungskurve erstellt werden.
- Vorlegen von 100 µl der BSA-Lösungen (Verdünnung siehe Schema), der Proben und des dest. H₂O in beschriftete Reaktionsgefäße.
- Zugabe von 2 ml BCA Arbeitslösung (BAL) in jedes Reaktionsgefäß, gut mischen.
- Inkubation der Ansätze wie folgt:
 - a. Standardprotokoll: 30 Min. 37 °C
 - b. modifiziertes Protokoll: 15 Min. 60 °C

- Nach der Inkubation Abkühlung auf Raumtemperatur (RT).
- Messung der Absorption bei 562 nm gegen Wasser als Referenz.

Wichtig: Da die die Reaktion mit dem BCA Reagenz keine wirkliche Endpunktreaktion ist, hält die Farbentwicklung/-änderung auch noch bei Abkühlung auf Raumtemperatur (RT) an. Da aber der Grad der Farbänderung bei RT sehr gering ist, ergibt sich bei der Messung innerhalb von 10 Min. kein signifikanter Fehler.

- Erstellung der Kalibrierungskurve unter Berücksichtigung der Blindwerte zur Ermittlung der Proteinkonzentration.

2.3.2. Schema zur Durchführung der Proteinbestimmung

Vorlegen von **100 μ l** dest. H₂O bzw. Puffer für die Blindwerte, Referenzlösungen und Proteinproben in Reaktionsgefäße



Zugabe von **2 ml BCA-Arbeitslösung**, gut mischen



Inkubation analog Standard- oder modifiziertes Protokoll



auf RT abkühlen



Überführen der Lösung in Küvette
Messung der Absorption bei 562 nm (A_{562nm})

2.4. Berechnung der Proteinkonzentration

2.4.1. Erstellung der Kalibrierungskurve

Erstellen Sie eine Tabelle mit den im Test erhaltenen Absorptionswerten. Aus den erhaltenen Werten für das Referenzprotein erstellen Sie eine Kalibrierungskurve indem Sie auf der y-Achse die gemessenen Absorptionswerte und auf der x-Achse die Menge Standardprotein/Reaktionsgefäß auftragen.

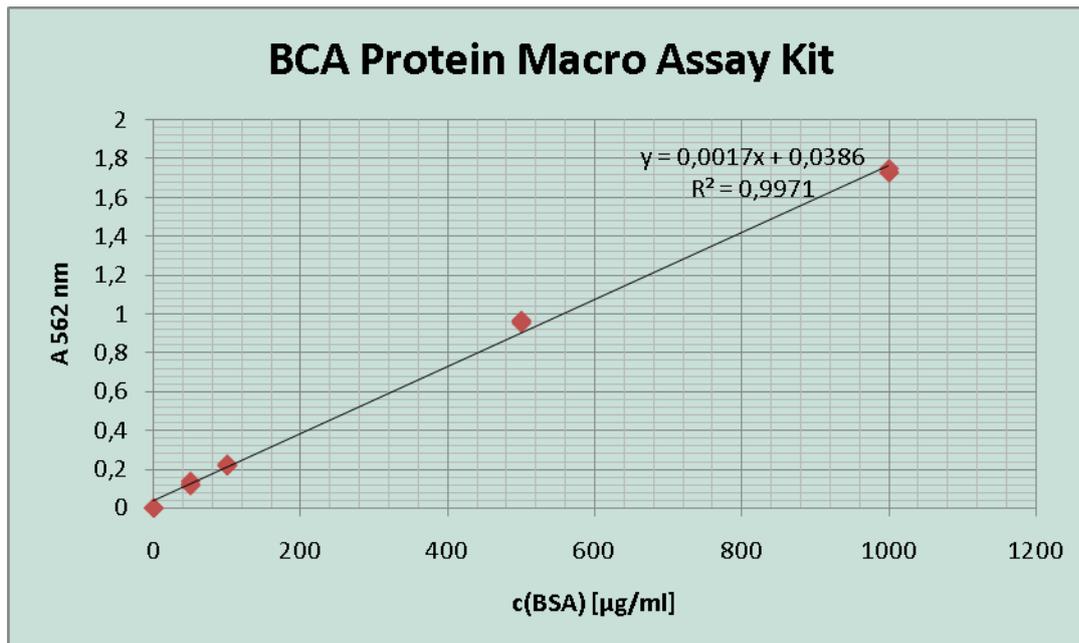


Abbildung 1: Exemplarische Darstellung der BSA-Kalibrierungskurve für 30 Min. Inkubation bei 37 °C.

2.4.2. Berechnung der Proteinkonzentration

Mit Hilfe dieser Kalibrierungskurve kann anschließend wie folgt die Proteinkonzentration der unbekannt Probe bestimmt werden:

- Anhand der Absorptionswerte für eine unbekannte Probe kann die Proteinmenge/Reaktionsgefäß mit Hilfe der Kalibrierungskurve ermittelt werden.
- Zur Berechnung der Proteinkonzentration wird die graphisch ermittelte Proteinmenge (X in µg) durch das eingesetzte Probenvolumen (V in µl) dividiert.

$$X [\mu\text{g}] / V [\mu\text{l}] = C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = C [\text{mg}/\text{ml}]$$

- Wenn eine Vorverdünnung der Probe durchgeführt wurde, muss der Verdünnungsfaktor (VF) berücksichtigt werden.

$$(X [\mu\text{g}] / V [\mu\text{l}]) * VF = C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = C [\text{mg}/\text{ml}]$$

3. Literatur

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C (1985).
Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.

Wiechelman, K., Braun, R. and Fitzpatrick, J. (1988).
Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* **175**, 231-237.

Brown, R., Jarvis, K. and Hyland, K. (1989).
Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.*

Peterson, G.L. (1979) .
Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* **100**, 201-220.

Kirschbaum, G. (1986).
Use of the bicinchoninic acid assay in measuring urinary proteins. *Clin. Chem.* **32**, No. 3, Letter to the Editor, 572.

4. Troubleshooting

- **Anwesenheit störender Agenzien in der Probe**

Störungen des BCA Assays können wie folgt beseitigt oder minimiert werden:

- a. Beseitigung der störenden Substanz mittels SERVA *BluePrep Kits*, wie DetergentEx oder CBD, sowie Dialyse oder Gelfiltration
- b. Verdünnung der Probe, so dass keine Störungen mehr erfolgen. Dies ist aber nur möglich, wenn die Anfangskonzentration der Probe sehr hoch ist.
- c. Fällung der Proteine in der Probe mit Aceton oder Trichloressigsäure (TCA); der Überstand mit den störenden Komponenten wird verworfen und das Protein mit BCA-Arbeitslösung leicht wieder in Lösung gebracht.
- d. Störungen durch Kupfer-Chelatbildner können durch Erhöhung der CuSO_4 -Menge in der BCA-Arbeitslösung (BAL) beseitigt werden

Wichtig: Um eine höhere Genauigkeit der Quantifizierung zu erzielen, sollten die Proteinstandards und Proben identisch behandelt werden.

- **Absorptionmessung bei einer anderen Wellenlänge**

Sollte für die Absorptionmessung kein Gerät mit 562 nm-Filter vorhanden sein, kann die violette Färbung auch bei einer anderen Wellenlänge zwischen 540 nm und 590 nm vermessen werden.

Das Absorptionsmaximum des BCA-Cu^{1+} -Komplexes liegt bei 562 nm. Bei einer von 562 nm abweichenden Absorptionmessung, ergibt sich eine geringere Steigung der Kalibrierungskurve und somit auch eine andere Nachweisgrenze als im Protokoll beschrieben.

- **Reinigung und Wiederverwendung von Glasgeräten**

Bei der Wiederverwendung von Glasgeräten ist Vorsicht geboten. Das BCA-Reagenz ist empfindlich gegenüber Metallionen, speziell Kupfer-Ionen, so dass bei der Reinigung von Glasgeräten ein finales Waschen mit hochqualitativem, deionisiertem Wasser notwendig ist.