



Руководство по использованию

Набор для определения концентрации белка на основе бицинхониновой кислоты (БЦК)

BCA protein assay

Содержимое набора

- Раствор А (основной активный компонент - бицинхониновая кислота)
- Раствор Б (сульфат меди)
- Раствор стандартного белка (BSA 2 мг/мл)

Выпускается в виде наборов:

- **BCA-500**

500 мл Раствора А, 15 мл раствора В, 5 виал по 1 мл раствора стандартного белка

- **BCA-100**

100 мл Раствора А, 3 мл раствора В, 1 виала x 1 мл раствора стандартного белка

Хранение

Хранение при комнатной температуре. Допускается замораживание.

Описание

Стандартный набор для определения концентрации белков на основе восстановления Cu(II) в Cu(I) в присутствии белков и колориметрической детекцией через формирование соли с Бицинхониновой кислотой (БЦК/BCA). Уровень детекции пропорционален концентрации пептидных связей, а также 4 аминокислот (цистеин, цистин, тирозин и триптофан) в широком диапазоне концентраций. Тест-система может быть использована как для белков, так и для пептидов.

Тест система совместима с многими детергентам (см. таблицу совместимости) и удобна для измерения концентрации белков при приготовлении лизатов. В отличие от Bradford assay, может быть без проблем использована для анализа образцов с кислотолabile/преципитируемыми в кислоте реактивами, такими как дезоксихололевая кислота (SDC) или RapiGest (Waters, USA). Однако определение концентрации белков должно проводиться до добавления восстанавливающих агентов, таких как DTT или TCEP.

****Название тест-системы стандартно в научной среде произносится как “би-си-эй”*

Использование

Тест-система поставляется в виде 2 реактивов (А и В), которые необходимо смешивать **непосредственно** перед проведением анализа. Приготовленный реактив рекомендуется использовать в течение 1-2 ч после смешивания. Со временем повышается базовый уровень поглощения и снижается чувствительность анализа.

Для измерения концентрации белка исследуемый образец инкубируется с растворами тест-системы. Далее проводится измерение поглощения продуктов реакции и сравнение полученной оптической плотности с калибровочным графиком, построенным для растворов с известной концентрацией белков. В качестве стандартного белка обычно используется бычий сывороточный альбумин (BSA), раствор которого входит в набор в концентрации 2 мг/мл в воде.

Примечание. Также в качестве стандарта могут быть использованы любые другие белки или белковые смеси с заданной концентрацией и их разведения, если это требуется в рамках поставленной задачи: наибольшая точность измерения абсолютной концентрации достигается при использовании в качестве стандарта материала, сходного по аминокислотному составу и размерам молекул с измеряемым (например, для определения концентрации антител можно использовать стандартный раствор любых других антител). При этом в большинстве экспериментальных случаев систематической ошибкой при измерении абсолютной концентрации с использованием в качестве стандарта BSA, а не сходной по типу белковой материи, можно пренебречь.

Приготовление разведений стандартного белка для построения калибровочного графика

Для построения калибровочного графика необходимо приготовить последовательные двухкратные разведения стандартного раствора белка в следующем виде:

	Исходный образец	Последовательные разведения в 2 раза				Нулевая точка	Пустой образец
Название образца	BSA2	BSA1	BSA0.5	BSA0.25	BSA0.125	К	Empty
Концентрация	2 мг/мл	1 мг/мл	0,5 мг/мл	0.25 мг/мл	0.125 мг/мл	Буфер без белка	Реактив сам по себе без добавок

Внимание	При приготовлении последовательных разведений мы КРАЙНЕ рекомендуем менять носики пипетки после каждого разведения. В противном случае, существует высокая вероятность получения нелинейного падения концентрации в результате заноса остатков высококонцентрированного образца через стенки носика пипетки в нижние разведения.
-----------------	---

ВАЖНО. Разведение стандарта необходимо проводить В ТОМ ЖЕ растворе (буфере/лизис-буфере), в котором растворены образцы: с тем же набором солей/детергентов/химических реагентов. В дальнейшем необходимо следить, чтобы при каждом измерении в вials/лунке находился объем буфера/лизирующего буфера одинаковый для измеряемых образцов, для стандартных образцов, а также в образце К (контроль без белков). Как правило, можно пренебречь тем фактом, что в исходном стандартном образце BSA2 белок находится в воде, а не в буфере, а в BSA1 содержание буфера 50%. Однако, если в образце К наблюдается очень высокий фон интерференции: прибавка сигнала в образце К составляет >15% от сигнала в образце Empty, содержащего реактивы тест-системы без добавок/с добавкой воды до суммарного объема остальных образцов, - это означает, что в буфере/лизис-буфере присутствуют агенты, превращающие Cu(II) в Cu(I), помимо как таковой белковой материи. В этом случае стандартный образец следует титровать в воде, а буфер/лизис-буфер добавлять во все контрольные кюветы/лунки отдельно в одинаковом объеме, чтобы в итоге в каждой точке исследуемых образцов и калибровочного графика были одинаковые объемы BCA реактива, буфера/лизис-буфера и раствора белка.

Измерение в формате кювет

1. Приготовьте разведения стандартного раствора белка (можно использовать ранее приготовленные разведения при условии их длительного хранения при -20°C).
2. Рассчитайте необходимый для проведения измерения объем реактива для приготовления. Для этого рассчитайте количество анализируемых образцов.

Пример расчета:

Название образца	Название образца	Название образца	Название образца
BSA2 - повтор 1	BSA2 - повтор 2	Образец 1 - повтор 1	Образец 1 - повтор 2
BSA1 - повтор 1	BSA1 - повтор 2	Образец 2 - повтор 1	Образец 2 - повтор 2
BSA0.5 - повтор 1	BSA0.5 - повтор 2	Образец 3 - повтор 1	Образец 3 - повтор 2
BSA0.25 - повтор 1	BSA0.25 - повтор 2	Образец 4 - повтор 1	Образец 4 - повтор 2
BSA0.125 - повтор 1	BSA0.125 - повтор 2	Образец 5 - повтор 1	Образец 5 - повтор 2
К – повтор 1	К – повтор 2	Образец 6 – повтор 1	Образец 6 – повтор 2
Empty – повтор 1	Empty – повтор 2		

Для измерения концентрации в 6 экспериментальных образцах требуется 26 измерений: 12 контрольных точек для построения калибровочного графика, 12 точек для измерения 6 образцов и 2 точки Empty для оценки влияния буфера/лизис-буфера на поглощение (если постоянно используется один и тот же буфер и есть понимание уровня его влияния на поглощение, этими точками можно пренебречь) Данный расчет приведен для 2 технических повторов на образец.

Примечание. Мы рекомендуем всегда ставить, минимум, 2 технических повтора для экспериментальных образцов. Контрольные точки можно ставить по 1 техническому повтору (ошибка единичного контрольного образца будет нивелирована при построении линейной регрессии), однако, опять же, рекомендуется ставить не менее 2 повторов. Возможен анализ каждой точки в 3 и более технических повторах по желанию экспериментатора/требованиям регламента.

3. Приготовьте и подпишите все кюветы/пробирки.

Примечание. Реакцию можно ставить в пластиковых кюветах, в пробирках типа Эппендорф, стеклянных пробирках, виалах или любых других удобных емкостях с крышкой.

4. Приготовьте рабочий раствор тест-системы (смесь растворов А и Б в соотношении 1/50) в объеме

$$V = (\text{количество анализируемых образцов} + 1) * \text{объем одной реакции},$$

Объем одной реакции отталкивается от минимального объема измеряемого образца в кювете. Часто встречающийся достаточный объем в 2 мл 1 см кюветах составляет 400 мкл, при этом фактически этот объем

может быть достаточно произвольным – если удобно, можно ставить и 2 мл. Однако, **ни в коем случае нельзя** ставить двойной объем в одной кювете/пробирке из расчета дальнейшего использования в качестве 2 технических повторов измерения. Каждый технический повтор ТРЕБУЕТ постановки независимой реакции (независимый отбор исследуемого/контрольного образца).

Например, для вышеописанного эксперимента по измерению 6 образцов в 2 технических повторах требуется 26 точек, т.е. объем смешиваемого реактива BCA assay будет $= (26+1) \cdot 400 \text{ мкл} = 10.8 \text{ мл}$. Для этого необходимо взять $10.8/50 = 216 \text{ мкл}$ реактива Б и 10.584 мл реактива А. Смесь перемешать переворачиванием пробирки несколько раз.

Примечание. Допускаются отклонения в 3-5% от соотношения 1/50 реактивов А и Б. Т.е. на практике вместо отмеривания 10.584 мл нужно добавить в 15 мл пробирку ~10.6 мл реактива А (на глаз по рискам на пробирке), а 216 мкл реактива Б уже добавить автоматической пипеткой.

5. Разлейте реактив по кюветам/пробиркам, например, по 400 мкл (объем должен быть одинаковым во всех точках).
6. Внесите от 3 до 100 мкл раствора белка. Удобно, когда вносимый объем стандартных растворов и исследуемых образцов идентичен. Тогда полученные значения поглощения напрямую пересчитываются в мг/мл без необходимости учета разницы в разведениях. Следите за тем, чтобы в каждом образце был одинаковый объем буфера/лизис-буфера, в котором растворены анализируемые образцы, а также идентичный суммарный конечный объем. Чем больший объем образца вносится, тем чувствительнее будет анализ. Однако при внесении слишком большого количества образца/стандарта поглощение полученного раствора после реакции может быстро уйти в нелинейную область.
7. Перемешайте пипетированием и закройте емкости, или закройте емкости и перемешайте взбалтыванием/вortexированием.

Примечание. Розлив реактива BCA по кюветам/пробиркам можно проводить одним и тем же носиком пипетки (сделайте за воспроизводимостью добавляемого объема). Внесение образца должно проводиться **новым носиком пипетки для каждого технического повтора** (использование одного и того же носика для техповторов очень сильно снижает воспроизводимость анализа, а также может привести к случайной контаминации исходного образца раствором BCA)

8. Поместите емкости (все одновременно) в термостат для ускорения реакции (Часто доступен термостат на 37°C – реакция в нем проходит за 10-45 мин. Чем выше температура, тем быстрее проходит реакция. Греть более 50°C, вероятно, смысла не имеет). Следите за протеканием реакции в образце BSA2 до появления выраженного фиолетового цвета. Чем дольше реакция инкубируется, тем ярче становится окрашивание и повышается чувствительность для низких концентраций белка.

О времени инкубации...

Если передержать реакцию, высокие значения концентраций уйдут в нелинейную область поглощения и не могут быть нормально использованы как для построения калибровочного графика, так и для измерения концентраций в анализируемых образцах. В этом случае, если поглощение измеряемых образцов попадает в нелинейную область на графике, реакцию придется ставить заново для всех точек, включая контрольные, и снижать время инкубации и/или добавляемый объем образцов. Если поглощение высших точек

калибровочного графика ушло в нелинейную область, однако измеряемые образцы попадают в линейную часть графика, ничего переставлять не требуется – просто при построении ЛИНЕЙНОГО калибровочного графика точки из нелинейной области калибровки требуется исключить.

Важно. Поскольку интенсивность окрашивания зависит от времени инкубации, для измерения концентрации для построения калибровочного графика могут быть использованы калибровочные точки, поставленные исключительно в параллели с измеряемыми образцами – ранее построенные калибровочные графики НЕЛЬЗЯ использовать для независимо поставленных экспериментальных образцов.

- Если концентрация белка в анализируемых образцах очень низкая и прирост интенсивности по сравнению с точкой К недостаточен для точного измерения (например, находится в районе нижних точек разведения стандарта BSA0.125-BSA0.25), время инкубации можно увеличить (оставить кюветы с реакцией до появления видимой окраски в экспериментальных образцах).

- Если поглощение анализируемых образцов ниже поглощения образца S0.125, образцы можно вносить в большем объеме чем стандарты (с соответствующим пересчетом конечной концентрации): например, добавить по 3 мкл стандартных образцов и по 30 мкл анализируемых образцов (при этом нужно не забыть выровнять объемы буфера/лизис-буфера между стандартами и измеряемыми образцами),

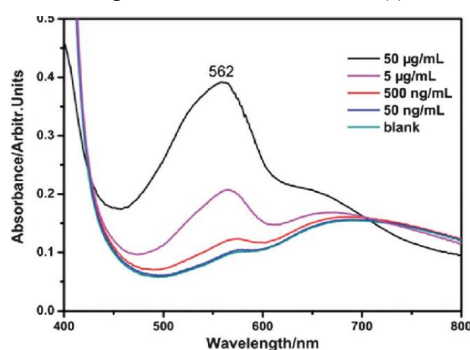
- Если поглощение анализируемых образцов слишком высокое и выходит за пределы калибровочной кривой, их можно развести (обычно кратно 10х разведениям).

9. Выньте образцы из термостата и переставьте в холодильник/морозильник (замораживать не нужно, но на -20°C образцы остынут быстрее, после чего их можно переставить на 4°C в холодильное отделение). Оставьте образцы на +4°C/-20°C на 10-15 мин для их параллельного охлаждения и остановки реакции.

Примечание. После вынимания образцов из термостата реакция продолжает идти. Если образцы параллельно не охладить, с учетом последовательного измерения образцов в спектрофотометре, суммарное время реакции между анализом первого и последнего образцов будут существенно отличаться, что приведет к серьезным искажениям результатов. Искажения результатов также будут в случае, если измерения начать сразу после перемещения образцов в холодильник, не дав им времени на охлаждение (чтобы все образцы охладились за одинаковое время и суммарное время реакции во всех образцах было идентичным).

10. По очереди доставайте образцы из холодильника, переносите в кювету для измерения и измеряйте поглощение при $\lambda = 562$ нм (по факту, подойдет любая длина волны в диапазоне от 530 до 590 нм в соответствии с доступными установленными фильтрами).

Спектр поглощения ВСА+Cu(I) [1]



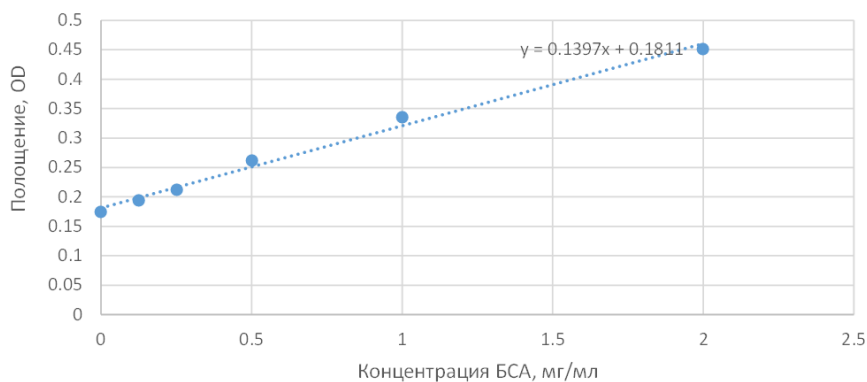
11. Постройте калибровочный график.

Пример расчета и построения калибровочного графика

(для межлабораторной стандартизации мы рекомендуем откладывать концентрацию по оси x, а значение поглощения по оси y).

поглощение			
образец	повтор 1	повтор 2	среднее значение
S 2	0.447	0.456	0.4515
S 1	0.339	0.332	0.3355
S 0.5	0.266	0.256	0.261
S 0.25	0.209	0.215	0.212
S 0.125	0.197	0.19	0.1935
S 0	0.176	0.173	0.1745

Калибровочный график



12. Для калибровочного графика постройте линейную регрессию вида $y = a \cdot x + b$.

Примечание. В обычных программах, типа, Excel, для построения графика необходимо одновременно выделить два столбца данных с концентрацией и со средним поглощением (выбрать первый столбец, зажать клавишу Ctrl и выбрать второй столбец)

поглощение			
образец	повтор 1	повтор 2	среднее значение
S 2	0.447	0.456	0.4515
S 1	0.339	0.332	0.3355
S 0.5	0.266	0.256	0.261
S 0.25	0.209	0.215	0.212
S 0.125	0.197	0.19	0.1935
S 0	0.176	0.173	0.1745

и выбрать Вставка -> Точечная диаграмма. Далее на диаграмме выделить точки значений (нажать мышкой на любой точке данных) -> правая кнопка мыши -> Добавить линию тренда -> линейная -> отобразить уравнение на графике. При этом на графике появится уравнение вида $y = a \cdot x + b$.

13. Полученные коэффициенты a и b используются для расчета концентрации белка в анализируемых образцах по формуле

$$c = (OD_{562} - b) / a,$$

Если объем анализируемого образца и стандартных образцов был идентичен, то при пересчете сразу получается концентрация в мг/мл. При использовании разведений и/или разных объемов контрольных и измеряемых образцов требуется перемножение полученных результатов пропорционально разведениям.

Пример расчета концентрации:

				a	0.1397
				b	0.1811
поглощение					
samples	повтор 1	повтор 2	концентрация 1	концентрация 2	среднее
	1	0.266	0.263	0.607730852	0.586256263 0.596994
	2	0.265	0.265	0.600572656	0.600572656 0.600573
	3	0.256	0.261	0.53614889	0.571939871 0.554044
	4	0.245	0.25	0.457408733	0.493199714 0.475304
	5	0.273	0.268	0.657838225	0.622047244 0.639943
	6	0.25	0.249	0.493199714	0.486041518 0.489621
	7	0.277	0.273	0.686471009	0.657838225 0.672155
	8	0.24	0.243	0.421617752	0.443092341 0.432355

Примечание. Программы типа Excel имеют опцию автозаполнения. Т.е. вставив формулу в первую строку, можно автозаполнить все остальные такой же формулой (знак \$ в ссылке на ячейку обозначает абсолютную ссылку, которая не будет меняться от строки к строке при автозаполнении).

Измерение в 96-луночном планшете

по большинству пунктов повторяет измерения в кювете, но для удобства повторно приведено полное описание пунктов протокола:

1. Приготовьте разведения стандартного раствора белка (можно использовать ранее приготовленные разведения при условии их долговременного хранения при -20°C).
2. в лабораторном журнале заполните таблицу с указанием позиций каждого образца на планшете. Рассчитайте необходимый для проведения измерения объем реактива для приготовления. Для этого рассчитайте количество анализируемых образцов.

Пример расчета:

	1	2	3	4
A	BSA2 - повтор 1	BSA2 - повтор 2	Образец 1 - повтор 1	Образец 1 - повтор 2
B	BSA1 - повтор 1	BSA1 - повтор 2	Образец 2 - повтор 1	Образец 2 - повтор 2
C	BSA0.5 - повтор 1	BSA0.5 - повтор 2	Образец 3 - повтор 1	Образец 3 - повтор 2
D	BSA0.25 - повтор 1	BSA0.25 - повтор 2	Образец 4 - повтор 1	Образец 4 - повтор 2
E	BSA0.125 - повтор 1	BSA0.125 - повтор 2	Образец 5 - повтор 1	Образец 5 - повтор 2
F	K – повтор 1	K – повтор 2	Образец 6 – повтор 1	Образец 6 – повтор 2
G	Empty – повтор 1	Empty – повтор 2		
H				

Для измерения концентрации в 6 экспериментальных образцах требуется 26 измерений: 12 контрольных точек для построения калибровочного графика, 12 точек для измерения 6 образцов и 2 точки Empty для оценки влияния буфера/лизис-буфера на поглощение (если постоянно используется один и тот же буфер и есть понимание уровня его влияния на поглощение, этими точками можно пренебречь) Данный расчет приведен для 2 технических повторов на образец.

Примечание. Мы рекомендуем всегда ставить, минимум, 2 технических повтора для экспериментальных образцов. Контрольные точки можно ставить по 1 техническому повтору (ошибка единичного контрольного образца будет нивелирована при построении линейной регрессии), однако, опять же, рекомендуется ставить

не менее 2 повторов. Возможен анализ каждой точки в 3 и более технических повторах по желанию экспериментатора/требованиям регламента.

3. Приготовьте рабочий раствор тест-системы (смесь растворов А и Б в соотношении 1/50) в объеме

$$V = (\text{количество анализируемых образцов} + 1) * 200 \text{ мкл (объем одной реакции)},$$

Объем ячейки 96-луночного планшета составляет 250 мкл. Практически удобный объем составляет до 210 мкл.

Например, для вышеописанного эксперимента по измерению 6 образцов в 2 технических повторах требуется 26 точек, т.е. объем смешиваемого реактива ВСА assay будет $= (26+1) * 200 \text{ мкл} = 5.4 \text{ мл}$. Для этого необходимо взять $5.4/50 = 108 \text{ мкл}$ реактива Б и 5.292 мл реактива А. Смесь перемешать переворачиванием пробирки несколько раз.

Примечание. Допускаются отклонения в 3-5% от соотношения 1/50 реактивов А и Б. Т.е. на практике вместо отмеривания 5.292 мл нужно добавить в 15 мл пробирку 5.3-5.4 мл реактива А (на глаз по рискам на пробирке), а 108 мкл реактива Б уже добавить автоматической пипеткой.

4. Разлейте по 200 мкл реактива в каждую лунку. Для удобства внесения может быть использован многоканальный дозатор и ванночка для реактива.
5. Внесите по 3 мкл стандартных и исследуемых растворов белка (если образец не жалко, можно вносить по 5 или даже по 10 мкл, но практически 3 мкл достаточно для точного измерения). Для количественного переноса несколько раз выдавите - наберите 3 мкл раствора в носик пипетки при внесении образцов.

Примечание. Объем вносимого образца может быть другим, вплоть до 100 мкл (в этом случае нужно в каждую ячейку на этапе 4 вносить не 200, а 100 мкл раствора ВСА, и при расчете на этапе 3 соответственно уменьшить объем смешиваемых реактивов А и Б). Чем больший объем образца вносится, тем чувствительнее будет анализ. Однако при внесении слишком большого количества образца/стандарта поглощение полученного раствора после реакции может быстро уйти в нелинейную область.

Удобно, когда вносимый объем стандартных растворов и исследуемых образцов идентичен. Тогда полученные значения поглощения напрямую пересчитываются в мг/мл без необходимости учета разницы в разведениях. Однако для сильно разбавленных образцов возможно внесение большего объема по сравнению с объемом стандартных образцов. Следите за тем, чтобы в каждом образце был одинаковый объем буфера/лизис-буфера, в котором растворены анализируемые образцы, а также идентичный суммарный конечный объем.

Примечание. Розлив реактива ВСА по кюветам/пробиркам можно проводить одним и тем же носиком пипетки (сделайте за воспроизводимостью добавляемого объема). **Внесение образцов должно проводиться новым носиком пипетки для каждого технического повтора** (использование одного и того же носика для техповторов очень сильно снижает воспроизводимость анализа, а также может привести к случайной контаминации исходного образца раствором ВСА)

6. Аккуратно перемешайте планшет вращательными движениями, не поднимая планшет со стола (планшет стоит на столе, плавно двигаем планшет по кругу со скоростью 2-3 круга в секунду и следим, чтобы не произошло перелива раствора между лунками).

7. Закройте планшет чистым резиновым ковриком/липкой пленкой/липкой фольгой или просто куском плоского пластика или стекла для снижения испарения. Поместите планшет в термостат для ускорения реакции (Часто доступен термостат на 37°C – реакция в нем проходит за 10-45 мин. Чем выше температура, тем быстрее проходит реакция. Греть более 50°C, вероятно, смысла не имеет). Следите за протеканием реакции в образце BSA2 до появления выраженного синего цвета. Чем дольше реакция инкубируется, тем ярче становится окрашивание и повышается чувствительность для низких концентраций белка.

Пример, как выглядит планшет после проведения реакции



	1	2	3	4
A	BSA2 повтор 1	BSA2 повтор 2	Образец 3 повтор 1	Образец 3 повтор 2
B	BSA1 повтор 1	BSA1 повтор 2	Образец 4 повтор 1	Образец 4 повтор 2
C	BSA0.5 повтор 1	BSA0.5 повтор 2	Образец 5 повтор 1	Образец 5 повтор 2
D	BSA0.25 повтор 1	BSA0.25 повтор 2	Образец 6 повтор 1	Образец 6 повтор 2
E	BSA0.125 повтор 1	BSA0.125 повтор 2	Образец 7 повтор 1	Образец 7 повтор 2
F	К повтор 1	К повтор 2	Образец 8 повтор 1	Образец 8 повтор 2
G	Образец 1 повтор 1	Образец 1 повтор 2	К повтор 3	К повтор 4
H	Образец 2 повтор 1	Образец 2 повтор 2		

О времени инкубации...

Если передержать реакцию, высокие значения концентраций уйдут в нелинейную область поглощения и не могут быть нормально использованы как для построения калибровочного графика, так и для измерения концентраций в анализируемых образцах. В этом случае, если поглощение измеряемых образцов попадает в нелинейную область на графике, реакцию придется ставить заново для всех точек, включая контрольные, и снижать время инкубации и/или добавляемый объем образцов. Если поглощение высших точек калибровочного графика ушло в нелинейную область, однако измеряемые образцы попадают в линейную часть графика, ничего переставлять не требуется – просто при построении **ЛИНЕЙНОГО** калибровочного графика требуется исключить точки с высокой концентрацией белка из нелинейной области калибровки.

Важно. Поскольку интенсивность окрашивания зависит от времени инкубации, для измерения концентрации для построения калибровочного графика могут быть использованы калибровочные точки, поставленные **ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО В ПАРАЛЛЕЛИ** с измеряемыми образцами – ранее построенные калибровочные графики **НЕЛЬЗЯ** использовать для независимо поставленных экспериментальных образцов.

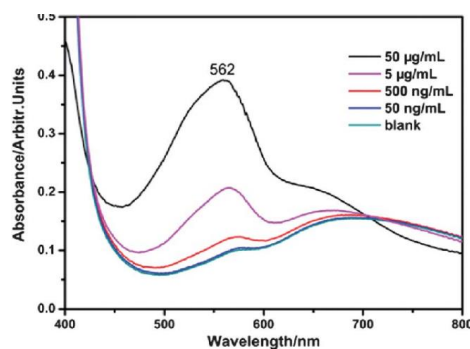
- Если концентрация белка в анализируемых образцах очень низкая и прирост интенсивности по сравнению с точкой К недостаточен для точного измерения (например, находится в районе нижних точек разведения стандарта BSA0.125-BSA0.25), время инкубации можно увеличить (оставить планшет еще на 30-60 мин в термостате).

- Если поглощение анализируемых образцов ниже поглощения образца S0.125, образцы нужно вносить в большем объеме чем стандарты (с соответствующим пересчетом конечной концентрации): например, добавить по 3 мкл стандартных образцов и по 20 мкл анализируемых образцов (при этом нужно не забыть выровнять объемы буфера/лизис-буфера между стандартами и измеряемыми образцами),

- Если поглощение анализируемых образцов слишком высокое и выходит за пределы калибровочной кривой, их можно развести (обычно кратно 10х разведениям).

8. Выньте планшет из термостата и измерьте поглощение при $\lambda = 562$ нм (по факту, подойдет любая длина волны в диапазоне от 530 до 590 нм в соответствии с доступными установленными фильтрами).

Спектр поглощения BSA+Cu(I) [1]



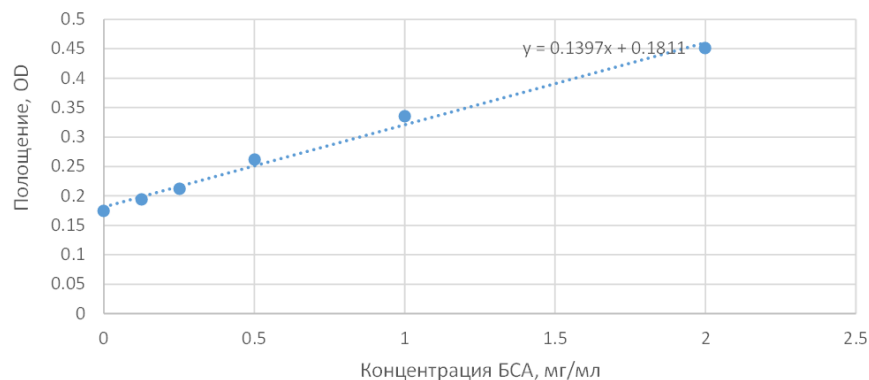
9. Постройте калибровочный график.

Пример расчета и построения калибровочного графика

(для межлабораторной стандартизации мы рекомендуем откладывать концентрацию по оси x, а значение поглощения по оси y).

поглощение			
образец	повтор 1	повтор 2	среднее значение
S 2	0.447	0.456	0.4515
S 1	0.339	0.332	0.3355
S 0.5	0.266	0.256	0.261
S 0.25	0.209	0.215	0.212
S 0.125	0.197	0.19	0.1935
S 0	0.176	0.173	0.1745

Калибровочный график



10. Для калибровочного графика постройте линейную регрессию вида $y = a \cdot x + b$.

Примечание. В обычных программах, типа, Excel, для построения графика необходимо одновременно выделить два столбца данных с концентрацией и со средним поглощением (выбрать первый столбец, зажать клавишу Ctrl и выбрать второй столбец)

поглощение			
образец	повтор 1	повтор 2	среднее значение
S 2	0.447	0.456	0.4515
S 1	0.339	0.332	0.3355
S 0.5	0.266	0.256	0.261
S 0.25	0.209	0.215	0.212
S 0.125	0.197	0.19	0.1935
S 0	0.176	0.173	0.1745

и выбрать Вставка -> Точечная диаграмма. Далее на диаграмме выделить точки значений (нажать мышкой на любой точке данных) -> правая кнопка мыши -> Добавить линию тренда -> линейная -> отобразить уравнение на графике. При этом на графике появится уравнение вида $y = a \cdot x + b$.

11. Полученные коэффициенты a и b используются для расчета концентрации белка в анализируемых образцах по формуле

$$c = (OD_{562} - b) / a,$$

Если объем анализируемого образца и стандартных образцов был идентичен, то при пересчете сразу получается концентрация в мг/мл. При использовании разведений и/или разных объемов контрольных и измеряемых образцов требуется перемножение полученных результатов пропорционально разведениям.

Пример расчета концентрации:

				a	0.1397
				b	0.1811
поглощение					
samples	повтор 1	повтор 2	концентрация 1	концентрация 2	среднее
	1	0.266	0.263	0.607730852	0.586256263 0.596994
	2	0.265	0.265	0.600572656	0.600572656 0.600573
	3	0.256	0.261	0.53614889	0.571939871 0.554044
	4	0.245	0.25	0.457408733	0.493199714 0.475304
	5	0.273	0.268	0.657838225	0.622047244 0.639943
	6	0.25	0.249	0.493199714	0.486041518 0.489621
	7	0.277	0.273	0.686471009	0.657838225 0.672155
	8	0.24	0.243	0.421617752	0.443092341 0.432355

Примечание. Программы типа Excel имеют опцию автозаполнения. Т.е. вставив формулу в первую строку, можно автозаполнить все остальные такой же формулой (знак \$ в ссылке на ячейку обозначает абсолютную ссылку, которая не будет меняться от строки к строке при автозаполнении).

	A	B	C	D	E	F	G	H
17								
18						a		0.1397
19						b		0.1811
20				поглощение				
21				повтор 1	повтор 2	концентрация 1	концентрация 2	среднее
22	samples		1	0.266	0.263	0.607730852	0.586256263	0.596994
23			2	0.265	0.265	0.600572656	0.600572656	0.600573
24			3	0.256	0.261	0.53614889	0.571939871	0.554044
25			4	0.245	0.25	0.457408733	0.493199714	0.475304
26								
27			5	0.273	0.268	0.657838225	0.622047244	0.639943
28			6	0.25	0.249	0.493199714	0.486041518	0.489621
29			7	0.277	0.273	0.686471009	0.657838225	0.672155
30			8	0.24	0.243	0.421617752	0.443092341	0.432355

Таблицы совместимости BCA protein assay с различными компонентами буферных систем/лизис-буферов можно найти на просторах интернета по поисковому запросу «BCA protein assay compatibility».

Данное руководство в электронном виде,
а также дополнительную информацию можно найти на сайте

www.molecta.ru.

1. Quantitative Evaluation of Proteins with Bicinchoninic Acid (BCA): Resonance Raman and Surface-enhanced Resonance Raman Scattering-based Methods. October 2012. The Analyst 137(24). Lei Chen et al.