کیت اندازه گیری پروتئین BCA

KBCA96

برای انجام ۹۶ آزمایش

اصول کار

سنجش پروتئین به روش BCA روشی است که برای اندازه گیری مقدار پروتئین در یک نمونه استفاده می شود. اصول روش بدین صورت است که پروتیین می تواند در یک محیط قلیایی Cu^{+2} را به Cu^{+1} احیا کند (واکنش بیوره) و در حضور bicinchoninic acid منجر به تولید رنگ ارغوانی شود.

این روش در مقایسه با روش برادفورد روش دقیق تری است چرا که تمامی زنجیره های پیوندهای پپتیدی در تشکیل رنگ شرکت می نمایند. همچنین برخلاف روش برادفورد با دترجنت هایی مانند NP-40، Triton-X100 و یا SDS تداخل ندارد.

کمپلکس CU^{+1}-BCA در طول موج 560 nm دارای جذب است که این طول موج تداخل کمتری با عوامل دیگر ایجاد می کند.

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:
در 4°C و در محل تاریک به مدت یک سال پایدار است

محدوده اندازه گیری داینامیک:31.12-1000 µg/ml

حساسیت: 10 µg/mL

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Tissues from animal/plant	10 mg	5 mg
Cells	3×10^6	1×10^5 –1×10^6
Serum	10 µl	10 µl

محتویات کیت

مقدار/تعداد	ماده	شماره
5 mL	BCA Reagent	1
150 µL	Cu Solution	2
Lyophilized	Albumin Standard (1 mg)	3
1	96-well Photometric Plate	4

موارد مورد نیاز اضافی

- ست سمپلر متغیر و چند کاناله
- سرسمپلر مناسب
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سانتریفیوژ دور بالا (12000 RPM)
- فور یا هات پلیت با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد
- دستگاه Plate Reader با طول موج 570-520 نانومتر
- بافر PBS یا بافر استخراج پروتئین کیازیست (KPEX50)
- مهار کننده پروتئازها (پیشنهادی کیازیست KPI100)

نکته: قبل از شروع، آزمایش با یک نمونه جهت مشخص ساختن مقدار نمونه به صورت پایلت (Pilot) به همراه یک استاندارد انجام شود.

- قبل از انجام تست کل پروتکل را بخوانید.

انجام آزمایش به صورت پایلت (Pilot) حتما توصیه می شود.

آماده سازی نمونه

هموژن کردن بافت

نمونه بافت: ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از بافت را توسط سونیکاتور و یا هموژنایزر در بافر PBS (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد لیز کرده و سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80˚C- فریز کنید.

سلول های چسبنده

محیط را خالی و سپس سلول ها را تریپسینه کرده و پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در بافر PBS (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد تا ۳ بار فریز و دفریز نمایید تا سلول ها لیز شوند. سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80˚C- فریز کنید.

سلول های معلق

پس از سانتریفیوژ کردن سوپرناتانت را دور ریخته و در بافر PBS (یا بافر جایگزین) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز می باشد تا ۳ بار فریز و دفریز کرده تا سلول ها لیز شوند. سپس در 12000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ کنید . سوپرناتانت را در تیوب جدید در دمای 80˚C- فریز کنید.

نمونه پلاسما

خون را در تیوب حاوی ضد انعقاد ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در 1000×g سانتریفیوژ کنید . پلاسمای زرد رنگ را بدون آسپیره کردن لایه سفید بافی (لکوسیت) برداشته و تا زمان آزمایش در دمای 80˚C- فریز کنید.

آماده سازی کیت و استاندارد

- پس از آماده سازی نمونه موارد زیر را آماده کنید.
- همه محلول ها در دمای اتاق گرم شوند.

۱. همه تیوب ها اسپین شوند تا مواد در دیواره تیوب ها باقی نماند.

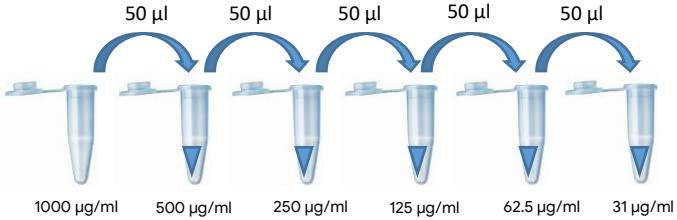
۲. به ازای هر نمونه یا استاندارد طبق فرمول زیر محلول کاری آماده شود:

1. BCA Reagent 50 uL
2. Cu Solution 1 uL

} × تعداد تست + ۱

آماده سازی استاندارد:

- ابتدا به ویال استاندارد یک میلی لیتر از محلول PBS اضافه کنید و به آرامی پیپتاژ کنید تا کاملا حل شود.
- سپس به پنج میکروتیوب ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه مطابق شکل زیر اضافه کنید. سپس از ویال استاندارد ۵۰ میکرولیتر به اولی اضافه کرده و رقت سازی سریالی انجام دهید.



نحوه انجام آزمایش

۱.در هر چاهک 20 µl از نمونه ها و یا استانداردها را بصورت مجزا اضافه کنید.

* نمونه ها با پروتئین با غلظت بالا مانند سرم و یا لیزات های بافتی غنی از پروتئین می بایستی به اندازه ای رقیق شوند تا اینکه در محدوده جذب منحنی استاندارد قرار بگیرند و قابلیت سنجش در روش کنونی را داشته باشند.

** در صورتیکه نمونه شما حاوی پروتئین کم می باشد مقدار نمونه را تا ۵۰ میکرولیتر افزایش دهید.

۲.در چاهک دیگری 20 µl از بافر لیزات به عنوان بلانک اضافه کنید.

۳. سپس 50 µL محلول کاری را به هر یک از چاهک ها اضافه نموده و به خوبی مخلوط نمایید.

۴. پلیت را به مدت 25 دقیقه در دمای 55°C انکوبه نمایید. در پایان پلیت را در دمای اتاق خنک نمایید.

۵. عدد جذب را با استفاده از دستگاه Plate Reader در طول موج 520-570 nm قرائت نمایید.

نحوه محاسبه

۱. ابتدا از چاهک های دوتایی میانگین بگیرید.

۲. سپس با استفاده از یک نرم افزار مناسب مانند اکسل نمودار منحنی استاندارد را رسم کنید (غلظت های استاندارد در محور X و جذب خوانده شده استاندارد در محور Y قرار می گیرد). توسط فرمول منحنی، مقادیر نمونه ها را بر اساس µg/mL بدست آورید.

۳. در ادامه از فرمول زیر اقدام کنید:

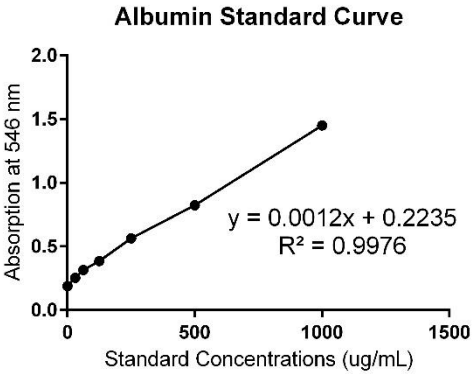
$$\text{Protein } (\mu g/mL) = \frac{\text{مقدار محاسبه شده از منحنی}}{\text{حجم نمونه ریخته شده در چاهک}} \times 20 \times \text{ضریب رقت}$$

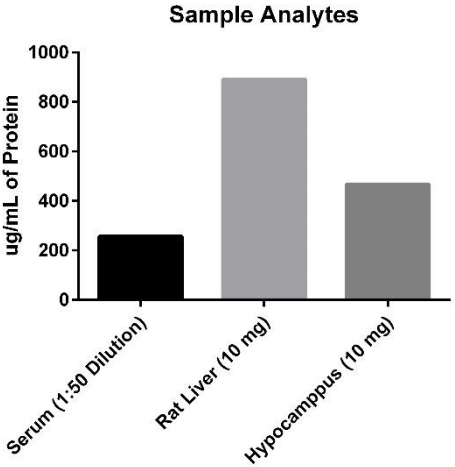
در صورتیکه منحنی شما به صورت خطی در نیامد، از نوع معادله درجه ۲ بوده و می توانید از منحنی نوع Polynomial درجه دوم استفاده کنید.

برای محاسبه خودکار از نرم افزار Curve expert نسخه Basic نیز می توانید محاسبه را انجام دهید

https://www.curveexpert.net/

نمونه منحنی استاندارد و تست





مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
عدم کارکرد تست	سرد بودن بافرها و مواد	همه مواد را به دمای اتاق برسانید
	طول موج اشتباهی	سعی کنید طول موج 570nm را انتخاب کنید
نمونه با خوانش غیر عادی	عدم هموژن شدن کامل نمونه	از هموژنازیر یا سونیکاتور استفاده کنید
	نمونه چند بار فریز-دفریز شده است	اگر نیاز به چندین بار استفاده از نمونه دارید قبل از فریز کردن آن را تقسیم بندی کنید.
	نمونه های کهنه استفاده شده است	نمونه های با ذخیره بلند مدت حتما در نیتروژن ذخیره شود
	وجود عوامل مداخله گر مانند چربی و یا بافر استخراج نامناسب	عوامل مداخله گر حذف شوند و بافر مناسب استخراج استفاده شود
جذب خیلی بالای نمونه	نمونه غلیظ	نمونه را در آب دیونیزه رقیق کنید
جذب خیلی پایین نمونه	نمونه رقیق	مقدار بافت اولیه را افزایش داده و از بافر استخراج مناسب استفاده کنید

www.kiazist.com

KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com