



qPROTEIN (BCA)

Kit para cuantificar proteínas totales



PB-L
Productos
Bio-Lógicos

<http://www.pb-l.com.ar>



qPROTEIN – (BCA)

Cat. no. RA03

CONTENIDO

Componentes	RA0301	RA0302
Buffer A	250 ml	500 ml
Buffer B	5 ml	10 ml
Proteína Patrón	5 ml	20 ml
Solución diluyente	5 ml	20 ml
Handbook	1	1

v.1

Equipamiento y reactivos adicionales requeridos

Placa multiwell
Espectrofotómetro o lector de placas
Vortex
Pipetas

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Se recomienda almacenar a temperatura ambiente protegido de la luz.

DESCRIPCIÓN

Este kit está diseñado para la detección y cuantificación de proteínas totales. Está basado en el método de ácido bicinconíico (BCA), el cual genera una reacción colorimétrica detectable a 562 nm. A diferencia de otros métodos, qProtein (BCA) presenta linealidad en un amplio rango de concentraciones (0- 1,5 mg/ml) y es compatible con detergentes y otros compuestos que comúnmente interfieren con otros sistemas de cuantificación. El kit permite realizar 2500 ensayos en multiplacas de 96 wells, para la

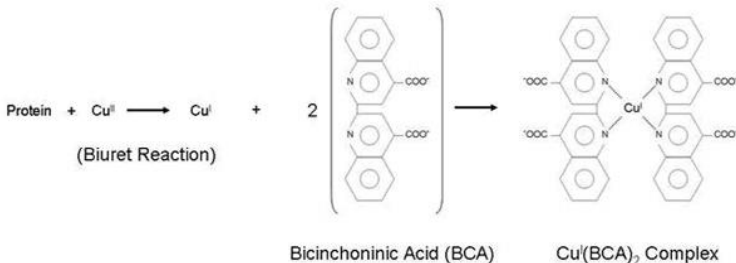
presentación de 500 ml y 1250 ensayos, para la presentación de 250 ml de reactivo.

VENTAJAS

- Limite de detección menor que Bradford y Lowry
- Linealidad en un amplio rango de concentraciones: 20 -2000 µg/ml
- Menor susceptibilidad a detergentes
- Estabilidad del color del complejo.

FUNDAMENTO

Está kit está basado en el ácido biconónico (BCA) para la detección y cuantificación colorimétrica de proteínas totales. Este método combina la reducción del Cu²⁺ a Cu⁺ en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección selectiva del catión Cu⁺ utilizando el ácido biconónico. El producto de la reacción tiene un color púrpura formado por el complejo de BCA con un ion Cu⁺. El complejo hidrosoluble absorbe a 562 nm de manera lineal con el incremento de proteína en un rango de 20-2000 µg/ml.



Se ha reportado que la estructura macromolecular, el número de enlaces peptídicos y la presencia de aminoácidos particulares (cisteína, cistina, triptófano y tirosina), son los responsables de la dar inicio a la reacción. La concentración de proteínas se determina a partir de una curva de calibración construida con una proteína de referencia de concentración conocida (ej. albúmina de suero bovino). A partir de esta curva se determina la concentración de la muestra de proteína incógnita.



PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES Y REACTIVO DE TRABAJO

A. Preparación de soluciones patrón

1. Adicionar al stock patrón 2,5 ml del diluyente, y resuspender.

Nota: utilizar el mismo diluyente que en las muestras incógnitas.

2. Preparar los patrones, diluyendo según indica la tabla. Conservar a -20°C.

Stock	BSA (µg/ml)	Volumen y Fuente de BSA (µl)	Volumen de Diluyente (µl)
A	1500	450 de stock	150
B	1000	300 de stock	300
C	750	300 de A	300
D	500	300 de B	300
E	250	300 de D	300
F	125	300 de E	300
G	25	100 de F	400
H	0	0	300

B. Preparación del Reactivo de Trabajo (se prepara al momento de ser usado)

1. Determinar el volumen de trabajo necesario con la siguiente fórmula:

$$(n^\circ \text{ de patrones} + n^\circ \text{ de muestras}) (n^\circ \text{ de réplicas}) \times 200 \mu\text{l} = V \text{ total}$$

2. Preparar el reactivo de trabajo, mezclando 50 partes del reactivo A con 1 parte del reactivo B. Se obtendrá una solución verde.

Nota: Al agregar primero el Reactivo B, se observa una turbidez que luego de agitar desaparece. Prepare suficiente volumen de reactivo de trabajo basado en el número de muestras a ensayar. El reactivo de trabajo es estable por algunos días, si se lo almacena en oscuridad a temperatura ambiente, aunque siempre se recomienda prepararlo en el momento de ser utilizado.

C. Procedimiento para determinación de la concentración proteica

1. Adicionar 25 µl por well de cada muestra a analizar o stock de patrón de la curva de calibración en una placa de 96 wells.



2. Adicionar 200 μ l del reactivo de trabajo por well.
3. Incubar a 37°C por 30 minutos. Se observará un viraje de verde a violeta según la concentración de proteínas.
Nota: el ensayo se puede realizar a temperatura ambiente, sin embargo puede haber mayor variabilidad entre las réplicas. Verificar que no hayan quedado burbujas en los wells, ya que interfieren en la medición.
4. Enfriar la placa hasta temperatura ambiente. Determinar la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro de placa.
Nota: Si no se cuenta con el equipamiento adecuado, la reacción puede leerse entre 540 y 590 nm.
5. Graficar la absorbancia a 562 nm de los patrones en función de su concentración y obtener, por regresión lineal, la ecuación de la curva. Usar la ecuación obtenida para determinar la concentración de proteínas totales en las muestras.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible Causa	Solución
-No hay color en ningún pocillo	-La muestra contiene agentes quelantes de cobre	-Dializar, desalar o diluir la muestra. -Incrementar la concertación del reactivo A en la sol de trabajo, p.ej. usar 50:2 de reactivo A:B
-El blanco esta OK, pero los estándares y muestras dan menos color que lo esperado	-Ácidos fuertes o buffers alcalinos pueden alterar el pH del reactivo de trabajo -Se está midiendo en una longitud de onda errónea	-Dializar, desalar o diluir la muestra- Medir la absorbancia a 562 nm
-El color de las muestras aparecen más oscuras de lo esperado	-La concentración de proteínas es demasiado alta -La muestra contiene lípidos o lipoproteínas	-Diluir la muestra -Agregar 2% de SDS a la muestra para eliminar los lípidos
-Todos los tubos	-El buffer contiene	-Dializar o diluir la



(incluyendo el blanco) dan violeta oscuro	agentes reductores -El buffer contiene Tiol -El buffer contiene aminas biogénicas (catecolaminas)	muestra
---	---	---------

SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

Ciertas sustancias interfieren con el ensayo de BCA, incluyendo aquellos que reducen su potencial, agentes quelantes, ácidos y bases fuertes. Se sugiere evitar las siguientes sustancias en el buffer de las muestras:

• Acido ascórbico	• Acido úrico
• Catecolaminas	• Creatinina
• Cisteína	• EGTA
• Glicerol impuro	• Hidracinas
• Hierro	• Lípidos
• Melibiosa	• Peróxido de hidrogeno
• Rojo Fenol	• Sacarosa impura
• Triptófano	• Tirosina

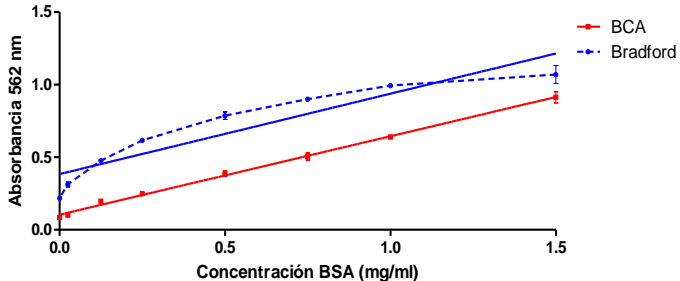
ESTRATEGIAS PARA ELIMINAR INTERFERENCIAS

- Remover la sustancia de interferencia por diálisis o filtración.
- Diluir la muestra hasta que la sustancia no interfiera. Esta estrategia es efectiva si se comienza con una concertación suficiente de proteína como para que pueda quedar dentro del rango de trabajo luego de la dilución.
- Precipitar las proteínas en la muestra con acetona o ácido tricloroacético (TCA). El líquido que contiene la sustancia que interfiere se descarta y el pellet con las proteínas se resuspende en agua pura o directamente en el reactivo de trabajo del kit.
- Incrementar el contenido de del reactivo A en la solución de trabajo (preparar el reactivo de trabajo como 50:2 ó 50:3, reactivo A:B). Puede eliminar interferencias de agentes quelantes de cobre.



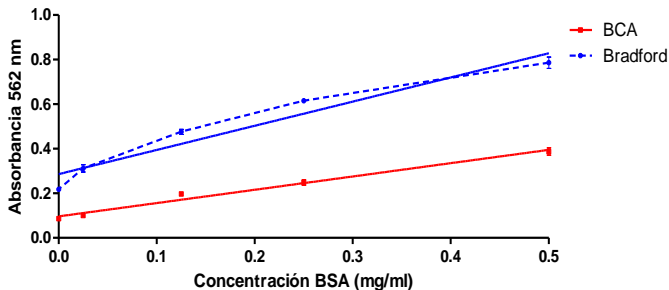
LINEALIDAD DEL SISTEMA

La siguiente figura representa las curvas de cuantificación de una proteína patrón (BSA) en un rango de 0,0 – 1,5 mg/ml. Como referencia se utilizó el método de Bradford.



	Bradford	BCA
Equation	$Y = 0.5539 * X + 0.3838$	$Y = 0.5404 * X + 0.1043$
R square	0.8636	0.9951

A continuación se indica la linealidad obtenida en un rango de concentración de 0,0 – 0,5 mg/ml.



	Bradford	BCA
r ²	0.9366	0.9803

Nota:

Este producto fue desarrollado y optimizado por la Universidad Nacional de Quilmes.