

## ИНСТРУКЦИЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

Набор для количественного определения белка с бицинхониновой кислотой (БХК-реагент)

### О наборе

Набор «БХК-реагент» - это реактив на основе бицинхониновой кислоты (БХК) для колориметрического определения концентрации общего белка. Метод основан на биуретовой реакции и выявляет наличие пептидных связей. В щелочной среде белок восстанавливает ионы меди  $Cu^{2+}$  до  $Cu^+$ . Восстановление ионов меди сопровождается образованием комплекса с двумя молекулами бицинхониновой кислоты, окрашенного в пурпурный цвет [1]. Этот водорастворимый комплекс имеет сильное поглощение при длине волны 562 нм, которое практически линейно увеличивается с возрастающей концентрацией белка в широком диапазоне от 20 до 1000 мкг/мл. Окраска продолжает развиваться и после инкубации проб, но скорость окрашивания довольно медленная, что позволяет одновременно измерять большое количество образцов.

Восстановление ионов меди происходит как под действием пептидных связей, так и под действием окисляемых аминокислотных остатков, таких как остатки тирозина, триптофана, цистина и цистеина [2]. В общих случаях концентрация белка определяется относительно какого-то стандартного белка, чаще всего это бычий сывороточный альбумин (БСА). Оптическую плотность в серии разведений с известной концентрацией, приготовленных из БСА, измеряют вместе с оптической плотностью образца, концентрация которого неизвестна. После построения калибровочной кривой определяют концентрацию анализируемого белка. Если необходимо более точное определение концентрации, лучше использовать сходные по строению белки, например, для измерения концентрации иммуноглобулинов можно строить кривую на основе бычьего гамма-глобулина.

### Оборудование, необходимое для измерения

1. Спектрофотометр, настраиваемый на длину волны 562 нм. Точность измерения поглощения спектрофотометром должна быть  $\leq 0,001$ . Данное требование особенно критично в области концентраций  $<100$  мкг/мл.
2. Кюветы для спектрофотометра.
3. Дозаторы на 1000 и 200 мкл.
4. Водяная баня или твердотельный термостат на  $+37^{\circ}C$ .

### Состав набора:

Раствор А 500 мл

Раствор Б 15 мл

Инструкция пользователя

**Содержимого набора достаточно для проведения не менее 250 измерений.**

### Приготовление стандартов и рабочего реагента

#### Приготовление стандартных разведений БСА

Используйте таблицу 1 как инструкцию для приготовления стандартных разведений БСА из стока с концентрацией 10 мг/мл. В качестве растворителя предпочтительно использовать тот же буфер, в котором находятся измеряемые образцы. Полученного объема будет достаточно для измерения каждого разведения с повтором.

Таблица 1. Приготовление стандартных разведений

Пробирка	Объем растворителя, мкл	Объем и источник БСА, мкл	Конечная концентрация БСА, мкг/мл
1	450	50 из стока	1000
2	250	250 из пробирки 1	500
3	250	250 из пробирки 2	250
4	300	300 из пробирки 3	125
5	400	100 из пробирки 4	25
6 (бланк)	500	0	0

#### Приготовление рабочего реагента

**NB! Рабочий реагент готовится в день измерения.**

Используйте приведенную ниже таблицу 2 для приготовления необходимого объема рабочего реагента. Рабочий реагент готовится смешиванием 50 частей реагента А и 1 части реагента Б. Для точности измерения каждую пробу (и стандартные образцы, и образцы с неизвестной концентрацией) нужно готовить в повторе. См. примечания 1 и 2.

Таблица 2.

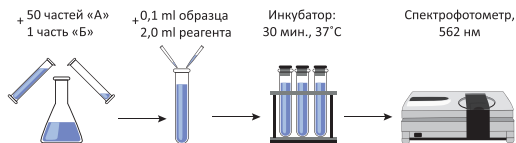
	На одну реакцию	На 20 реакций
Раствор А	2 мл	40 мл
Раствор Б	40 мкл	800 мкл

Пример: для измерения двух образцов с неизвестной концентрацией нужно приготовить 12 пробирок со стандартными разведениями (в повторе) и 4 пробирки с образцами неизвестной концентрации (также в повторе). Таким образом, при приготовлении рабочего реагента нужно смешать 32 мл реагента А и 640 мкл реагента Б.

**Примечание 1:** объем рабочего реагента – 2 мл на реакцию. Этого объема достаточно для измерения в стандартной кювете. При необходимости можно уменьшить или увеличить объем рабочего реагента с условием сохранения соотношения реагентов А:Б = 50:1 с пропорциональным изменением количества вносимой пробы.

**Примечание 2:** при добавлении реагента Б наблюдается помутнение раствора, которое исчезает сразу при перемешивании, получается прозрачный рабочий реагент зеленого цвета.

### Обобщенная схема протокола



1. Перенесите по 100 мкл каждого стандартного образца и образца с неизвестной концентрацией в пробирку с соответствующей пометкой.
2. Добавьте 2 мл рабочего реагента в каждую пробирку и перемешайте.
3. Закройте пробирки и инкубируйте 30 минут в термостате при +37°C.

**Примечание:** увеличение времени инкубации или температуры увеличивает поглощение на 562 нм и уменьшает как минимальный предел детекции, так и рабочий диапазон метода.

Используйте водяную баню или твердотельный термостат для нагрева пробирок. Использование воздушного термостата может внести значительную ошибку в развитие окрашивания из-за неравномерного распределения тепла.

4. Охладите все пробирки до комнатной температуры.
5. Обнулите значение поглощения спектрофотометра с установленной длиной волны 562 нм по кювете с водой. Далее измерьте поглощение  $OD_{562}$  всех образцов в течение 10 минут.

**Примечание:** поскольку реакция не достигает конечной точки, окрашивание будет продолжаться и после охлаждения до комнатной температуры. Тем не менее, скорость окрашивания при комнатной температуре невысока, и в измерениях, сделанных в течение 10 минут, не будет значимой ошибки.

Измерение неизвестных и стандартных образцов против кюветы с водой, а не против бланк-образца, особенно критично для сильно поглощающих буферов.

6. Вычитите среднее значение  $OD_{562}$  образца без белка (только буфер) от среднего значения каждого неизвестного и калибровочного образца.

7. Постройте стандартную калибровочную кривую, используя полученные в пункте 6 значения  $OD_{562}$  стандартных образцов (ось Y) и их концентрации (ось X).

**Примечание:** при использовании компьютерных программ для построения калибровочного графика лучше использовать полиномиальную аппроксимацию.

### Устранение возможных проблем

Проблема	Возможная причина	Решение
Нет окрашивания ни в одной пробирке.	Буфер, в котором проводится измерение, содержит вещество, хелатирующее медь.	Проведите диализ, обессаливание или разбавьте образец. Увеличьте концентрацию меди в рабочем реагенте (например, используйте соотношение реагента А:Б 50:2).
Все образцы, включая бланк, темно-фиолетовые.	Буфер, в котором проводится измерение, содержит восстанавливающий агент.	Диализуйте или разведите образцы.
Поглощение исследуемых образцов слишком высоко.	Концентрация белка слишком высока.	Разведите измеряемые образцы.
$OD_{562}$ бланк-образца в норме, а стандартные разведения и пробы поглощают очень слабо.	Поглощение измеряется не на 562 нм.	Измерьте поглощение на длине волны 562 нм. Поглощение может быть измерено в диапазоне 540-590 нм, но при этом чувствительность метода снижается.

### Вещества, мешающие проведению измерения

Вещества, которые хелатируют ионы металлов (ЭДТА >10 mM), изменяют pH (сульфат аммония >1,5M; Трис >0,25 M), восстанавливают медь (цистеин в любом количестве; DTT >1mM; 2-меркаптоэтанол >0,01%). Более подробно в статье Smith et al [1].

### Хранение

Реагент А и реагент Б сохраняют стабильность в течение года. Храните реагент А и реагент Б в закрытой емкости при комнатной температуре. Рабочий реагент (смесь реагента А и Б) хранится в течение дня.

### Использованная литература:

- 1) Smith, P.K., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85
- 2) Wiechelman, K., et al. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 175:231-7.