

製品コード T9300A

研究用

TaKaRa

TaKaRa BCA Protein Assay Kit

説明書

v201906Da

TaKaRa BCA Protein Assay Kit は、高感度にタンパク質溶液の比色定量を行う試薬であり、界面活性剤によって可溶化されたタンパク質溶液の定量も可能です。BCA によるタンパク質定量の原理は、2 段階の反応に基づいています。第 1 段階では、タンパク質溶液中のペプチド結合によって、キットに含まれる二価銅イオン (Cu^{2+}) が一価銅イオン (Cu^+) に還元されます。還元される Cu^{2+} の量は、溶液に含まれるタンパク質の量に比例します。第 2 段階では、2 分子の bicinchoninic acid (BCA) が Cu^+ に配位して、562 nm に強い吸収を示す青紫色の錯体を形成します。これを分光光度計で測定して比色定量を行います。BCA によるタンパク質定量は、タンパク質の種類の違いによる変化が比較的少なく、0.02 ~ 2 mg/ml の広い範囲で直線性を示し、界面活性剤による影響を受けにくいという特長を持っています。一方で、還元剤やキレート剤は反応を阻害するので、これらが含まれる溶液の定量には向いていません。詳しくは、9 ページの表 1 をご参照ください。

サンプルの定量は、キットに添付される BSA 標準タンパク質溶液の反応結果から検量線を作成して、サンプルと比較することで行います。本製品は、標準的な 1 ml 反応系において 500 回、マイクロタイタープレートを用いた 200 μl 反応系において 2,500 回の測定を行うことができます。

I. 内容

- | | |
|-------------------------------------|------------|
| 1. BCA Reagent A | 250 ml × 2 |
| 2. BCA Reagent B | 20 ml |
| 3. BSA Standard Solution (2 mg/ml)* | 1 ml × 10 |

* : BSA Standard Solution は、安定剤として 0.9% NaCl、0.05% NaN_3 を含みます。

II. 保存

BCA Reagent A、BCA Reagent B : 室温
BSA Standard Solution : 4°C

※ 本製品は 4°C で出荷されます。受取後、BCA Reagent A、BCA Reagent B は室温で保存してください。

III. キット以外に必要なもの

- 1 ml のキュベット (1 ml 反応系の場合)
- 0.2 ml のマイクロキュベットまたはマイクロタイタープレート (200 μl 反応系の場合)
- マイクロチューブ (2 ml または 1.5 ml)
- インキュベーター (37°C)
- インキュベーター (60°C) (低濃度測定プロトコールの場合)
- 分光光度計またはマイクロプレートリーダー

IV. 操作上の注意

本製品を使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

- BSA Standard Solution は、使用前に室温に戻すか、20～50℃の水浴中で完全に溶解します。溶解後、軽くタッピングして、卓上遠心機などで軽く遠心しておきます。
- 測定するサンプルと標準品を希釈する溶媒は、脱イオン水、0.9% NaCl または PBS が使用できます。
- BCA Reagent A と BCA Reagent B は低温下で沈殿が生じることがあります。この場合は、20～37℃に戻し、軽く攪拌して、沈殿が溶解したことを確認してから使用してください。
- 562 nm のフィルターがない場合は、540～570 nm のフィルターを使用して測定可能です。この場合も定量に影響はありません。
- 高濃度のサンプルを測定した場合は、キュベットを水でよく洗浄してください。色素がキュベットに残留した場合、低濃度サンプルの測定に影響があります。

V. 操作

本製品では5種類のプロトコルを用意しています。サンプル等にあわせて選択してください。

- V-a. 標準プロトコル (定量範囲：50～2,000 μg/ml) 【1 ml 反応系】
- V-b. 標準プロトコル (定量範囲：50～2,000 μg/ml) 【0.2 ml 反応系】
- V-c. 低濃度測定プロトコル (定量範囲：0～50 μg/ml) 【1 ml 反応系】
- V-d. 低濃度測定プロトコル (定量範囲：0～50 μg/ml) 【0.2 ml 反応系・マイクロチューブ使用】
- V-e. 低濃度測定プロトコル (定量範囲：0～200 μg/ml) 【0.2 ml 反応系・マイクロタイタープレート使用】

【Working Solution の調製】

測定の前に、BCA Reagent A : BCA Reagent B = 100 : 1 の比率で混合した Working Solution を調製する。例えば、30 ml の Working Solution を調製する場合、BCA Reagent A を 30 ml 取り、BCA Reagent B を 0.3 ml 加え、よく攪拌、混合する。

Working Solution は、調製後 4℃ で 3 日間安定である。

< Working Solution の必要量 >

測定に必要な Working Solution の量は、以下の通り計算できる。

必要な Working Solution の総量 (ml) = [(BSA 標準溶液 8 本または 7 本 + サンプル数) × サンプル並行測定数 (n) + 1] × 1 本あたりの Working Solution 量

例) 標準プロトコル 【1 ml 反応系】において、サンプル数が 12 本、2 連 (n=2) で測定する場合

$$[(8 + 12) \times 2 + 1] \times 1 \text{ ml} = 41 \text{ ml}$$

例) 標準プロトコル 【200 μl 反応系】において、サンプル数が 20 本、2 連 (n=2) で測定する場合

$$[(8 + 20) \times 2 + 1] \times 0.2 \text{ ml} = 11.4 \text{ ml}$$

例) 低濃度測定プロトコル 【1 ml 反応系】において、サンプル数が 12 本、2 連 (n=2) で測定する場合

$$[(7 + 12) \times 2 + 1] \times 0.5 \text{ ml} = 19.5 \text{ ml}$$

V-a. 標準プロトコール (定量範囲：50～2,000 $\mu\text{g/ml}$) [1 ml 反応系]

- 1) 表の通り、BSA 標準溶液の希釈系列を作製する。BSA 標準溶液とサンプルの希釈には、脱イオン水、0.9% NaCl または PBS が使用できる。

2 mg/ml BSA Standard (μl)	希釈液 (μl)	BSA の終濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
120	0	2,000
90	30	1,500
60	60	1,000
45	75	750
30	90	500
15	105	250
10	150	125
0	120	0 (Blank)

- 2) BSA 標準溶液の測定
 1. 1.5 ml のマイクロチューブに 1) で作製した BSA 標準溶液の各希釈液をそれぞれ 50 μl 分注する。各濃度について、2 連 ($n=2$) 以上並行で測定する。
 2. 1 ml の Working Solution を加え、直ちに混合する。
 3. 37°C の水浴中で 30 分間反応する。反応後は室温に戻す。
 4. 分光光度計を用いて、562 nm の吸光度を測定する。測定には、1 ml のキュベットを使用する。ゼロ点校正は水を用いる。
 5. 各濃度の標準液の吸光度から Blank 値を差し引いた値を平均して、標準曲線を作成する。

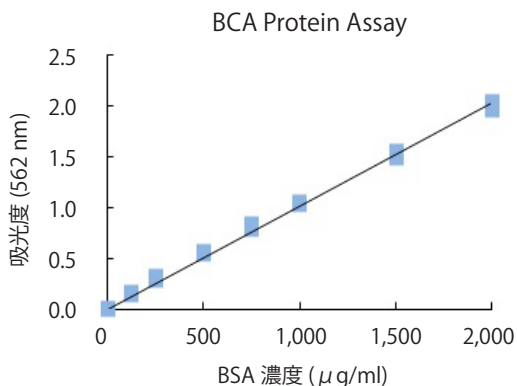


図 1. 0～2,000 $\mu\text{g/ml}$ の BSA 標準曲線の例

- 3) サンプルの測定
サンプルの測定は、BSA 標準溶液の測定と同時にを行うことを推奨する。
 1. 1.5 ml のマイクロチューブにサンプルを各 50 μl 分注する。同じサンプルを $n=2$ 以上並行で測定する。標準溶液と同様にサンプルの希釈系列を作製し、測定してもよい。
 2. 1 ml の Working Solution を加え、直ちに混合する。
 3. 37°C の水浴中で 30 分間反応する。反応後は室温に戻す。
 4. 分光光度計を用いて、562 nm の吸光度を測定する。測定には、1 ml のキュベットを使用する。ゼロ点校正は水を用いる。
 5. 吸光度から Blank 値を差し引いた値の平均値を用いて、BSA 標準溶液の標準曲線に照らしてサンプルの濃度を求める。

V-b. 標準プロトコール (定量範囲：50～2,000 µg/ml) 【0.2 ml 反応系】

- 1) V-a-1) と同様に BSA 標準溶液の希釈系列を作製する。BSA 標準溶液とサンプルの希釈には、脱イオン水、0.9% NaCl または PBS が使用できる。
- 2) BSA 標準溶液の測定
 1. マイクロチューブもしくはマイクロタイタープレートの各ウェルに、1) で作製した BSA 標準溶液の各希釈液を分注する。分注量は、マイクロキュベットで測定する場合は各 10 µl、マイクロタイタープレートで測定する場合は各 25 µl である。それぞれの濃度について、2 連 (n=2) 以上並行で測定する。
 2. 200 µl の Working Solution を加え、直ちに混合する。
 3. 37°C で 30 分間反応する。反応後は室温に戻す。
 4. 分光光度計を用いて、562 nm の吸光度を測定する。測定には、光路長 1 cm、容量 0.2 ml のマイクロキュベットを使用する。マイクロタイタープレートの場合は、プレートリーダーを使用して 562 nm の吸光度を測定する。ゼロ点校正は水を用いる。
 5. 各濃度の標準液の吸光度から Blank 値を差し引いた値を平均して、標準曲線を作成する。
- 3) サンプルの測定

サンプルの測定は、BSA 標準溶液の測定と同時に行うことを推奨する。

 1. マイクロチューブもしくはマイクロタイタープレートの各ウェルに、サンプルを分注する。分注量は、マイクロキュベットで測定する場合は各 10 µl、マイクロタイタープレートで測定する場合は各 25 µl である。同じサンプルを n=2 以上並行で測定する。標準溶液と同様にサンプルの希釈系列を作製し、測定してもよい。
 2. 200 µl の Working Solution を加え、直ちに混合する。
 3. 37°C で 30 分間反応する。反応後は室温に戻す。
 4. 分光光度計を用いて、562 nm の吸光度を測定する。測定には、光路長 1 cm、容量 0.2 ml のマイクロキュベットを使用する。マイクロタイタープレートの場合は、プレートリーダーを使用して 562 nm の吸光度を測定する。ゼロ点校正は水を用いる。
 5. 吸光度から Blank 値を差し引いた値の平均値を用いて、BSA 標準溶液の標準曲線に照らしてサンプルの濃度を求める。

V-c. 低濃度測定プロトコール (定量範囲：0～50 µg/ml) 【1 ml 反応系】

1) BSA 標準溶液の調製

1. BSA Standard Solution (2 mg/ml) を 100 µl 取り、900 µl の希釈液を加えてよく混合し、0.2 mg/ml の BSA 標準溶液を作製する。
2. 1.5 ml のマイクロチューブに、表の通り、BSA 標準溶液の希釈系列を各 2 セットずつ作製する (7 種類×2 セット (14 本))。BSA 標準溶液とサンプルの希釈には、脱イオン水、0.9% NaCl または PBS が使用できる。

0.2 mg/ml BSA 標準溶液 (µl)	希釈液 (µl)	BSA の終濃度 (µg/ml)	Final Volume (µl)
125	375	50	500
100	400	40	500
75	425	30	500
50	450	20	500
25	475	10	500
12.5	487.5	5	500
0	500	0 (Blank)	500

2) BSA 標準溶液の測定

1. 1) で作製した BSA 標準溶液の希釈系列に、直接 500 µl の Working Solution を加え、直ちに混合する。
2. 60℃で 60 分間反応する。反応後は室温に戻す。
3. 分光光度計を用いて、562 nm の吸光度を測定する。測定には、1 ml のキュベットを使用する。ゼロ点校正は水を用いる。
4. 各濃度の標準液の吸光度から Blank 値を差し引いた値を平均して、標準曲線を作成する。

3) サンプルの測定

サンプルの測定は、BSA 標準溶液の測定と同時に行うことを推奨する。

1. 1.5 ml のマイクロチューブにサンプルを各 500 µl 分注する。同じサンプルを n=2 以上並行で測定する。標準溶液と同様にサンプルの希釈系列を作製し、測定してもよい。
2. 500 µl の Working Solution を加え、直ちに混合する。
3. 60℃で 60 分間反応する。反応後は室温に戻す。
4. 分光光度計を用いて、562 nm の吸光度を測定する。測定には、1 ml のキュベットを使用する。ゼロ点校正は水を用いる。
5. 吸光度から Blank 値を差し引いた値の平均値を用いて、BSA 標準溶液の標準曲線に照らしてサンプルの濃度を求める。

V-d. 低濃度測定プロトコール (定量範囲：0 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$) 【0.2 ml 反応系・マイクロチューブ使用】

1) BSA 標準溶液の調製

1. BSA Standard Solution (2 mg/ml) を 100 μl 取り、900 μl の希釈液を加えてよく混合し、0.2 mg/ml の BSA 標準溶液を作製する。
2. 表の通り、BSA 標準溶液の希釈系列を作製する。BSA 標準溶液とサンプルの希釈には、脱イオン水、0.9% NaCl または PBS が使用できる。

0.2 mg/ml BSA 標準溶液 (μl)	希釈液 (μl)	BSA の終濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
125	375	50
100	400	40
75	425	30
50	450	20
25	475	10
12.5	487.5	5
0	500	0 (Blank)

2) BSA 標準溶液の測定

1. マイクロチューブに、1) で作製した BSA 標準溶液の各希釈液をそれぞれ 100 μl 分注する。各濃度について、2 連 ($n=2$) 以上並行で測定する。
2. 100 μl の Working Solution を加え、直ちに混合する。
3. 60°C で 60 分間反応する。反応後は室温に戻す。
4. 分光光度計を用いて、562 nm の吸光度を測定する。測定には、光路長 1 cm、容量 0.2 ml のマイクロキュベットを使用する。ゼロ点校正は水を用いる。
5. 各濃度の標準液の吸光度から Blank 値を差し引いた値を平均して、標準曲線を作成する。

3) サンプルの測定

サンプルの測定は、BSA 標準溶液の測定と同時に行うことを推奨する。

1. マイクロチューブに、サンプルを各 100 μl 分注する。同じサンプルを $n=2$ 以上並行で測定する。標準溶液と同様にサンプルの希釈系列を作製し、測定してもよい。
2. 100 μl の Working Solution を加え、直ちに混合する。
3. 60°C で 60 分間反応する。反応後は室温に戻す。
4. 分光光度計を用いて、562 nm の吸光度を測定する。測定には、光路長 1 cm、容量 0.2 ml のマイクロキュベットを使用する。ゼロ点校正は水を用いる。
5. 吸光度から Blank 値を差し引いた値の平均値を用いて、BSA 標準溶液の標準曲線に照らし、サンプルの濃度を求める。

V-e. 低濃度測定プロトコル (定量範囲：0～200 µg/ml) 【0.2 ml 反応系・マイクロタイタープレート使用】

1) BSA 標準溶液の調製

1. BSASandard Solution (2 mg/ml) を 120 µl 取り、1,080 µl の希釈液を加えてよく混合し、0.2 mg/ml の BSA 標準溶液を作製する。
2. 表の通り、BSA 標準溶液の希釈系列を作製する。BSA 標準溶液とサンプルの希釈には、脱イオン水、0.9% NaCl または PBS が使用できる。

0.2 mg/ml BSA 標準液 (µl)	希釈液 (µl)	BSA の終濃度 (µg/ml)
400	0	200
300	100	150
200	200	100
100	300	50
40	360	20
20	380	10
10	390	5
0	400	0 (Blank)

2) BSA 標準溶液の測定

1. マイクロタイタープレートの各ウェルに、1) で作製した BSA 標準溶液の各希釈液をそれぞれ 100 µl 分注する。各濃度について、2 連 (n=2) 以上並行で測定する。
2. 100 µl の Working Solution を加え、直ちに混合する。
3. 37°C で 60 分間反応する。反応後は室温に戻す。
4. プレートリーダーを使用して 562 nm の吸光度を測定する。ゼロ点校正は水を用いる。
5. 各濃度の標準液の吸光度から Blank 値を差し引いた値を平均して、標準曲線を作成する。

3) サンプルの測定

サンプルの測定は、BSA 標準溶液の測定と同時に行うことを推奨する。

1. マイクロタイタープレートの各ウェルに、サンプルを各 100 µl 分注する。同じサンプルを n=2 以上並行で測定する。標準溶液と同様にサンプルの希釈系列を作製し、測定してもよい。
2. 100 µl の Working Solution を加え、直ちに混合する。
3. 37°C で 60 分間反応する。反応後は室温に戻す。
4. プレートリーダーを使用して 562 nm の吸光度を測定する。ゼロ点校正は水を用いる。
5. 吸光度から Blank 値を差し引いた値の平均値を用いて、BSA 標準溶液の標準曲線に照らしてサンプルの濃度を求める。

VI. Appendix

共存物質の影響

BCA 法は、界面活性剤や各種 Buffer 等の影響を比較的受けないという特長を持っていますが、各種成分の濃度が高い場合は、測定に影響を受けます。本キットでの測定に影響がない濃度を表 1 に示します。

表 1. 標準プロトコールにおける各種試薬の許容濃度

物質名	共存物質 許容濃度
Salts / Buffers	
Ammonium sulfate	0.15 M
Borate pH9.5	50 mM
Calcium chloride	10 mM
Glycine	100 mM
Guanidine-HCl	4 M
HEPES, pH7.5	100 mM
Imidazole, pH7.0	50 mM
KPB, pH7.0	100 mM
Magnesium chloride	10 mM
MES, pH6.1	100 mM
MOPS, pH7.2	100 mM
NaPB, pH7.0	100 mM
Nickel chloride	10 mM
PIPES, pH6.8	100 mM
Sodium acetate, pH5.0	200 mM
Sodium azide	0.20%
Sodium chloride	1 M
Sodium citrate, pH6.4	100 mM
Tricine, pH8.0	25 mM
Tris-HCl, pH8.0	50 mM
Zinc chloride	10 mM
Detergents	
Brij-35	5%
CHAPS	5%
NP-40	5%
Triton X-100	5%
Tween-20	5%
SDS	5%

物質名	共存物質 許容濃度
Chelating agents	
EDTA	10 mM
EGTA	1 mM
Reducing agents	
Cysteine	1 mM
Dithiothreitol	1 mM
Glucose	10 mM
2-Mercaptoethanol	0.01%
Organic solvents	
Acetone	10%
DMSO	10%
Ethanol	10%
Methanol	10%
Misc. Reagents	
Glycerol	50%
Hydrochloric Acid	100 mM
PMSF	1 mM
Sodium Hydroxide	100 mM
Urea	3 M

タンパク質の種類による影響

BCA 法は、タンパク質の種類による測定値の変動が比較的少ないという特長があります。図 2 は、一般的に標準物質として用いられる BSA および BGG の希釈系列を測定して作成した標準曲線です。表 2 には、代表的な 15 種類のタンパク質の BSA に対する発色率を示します。

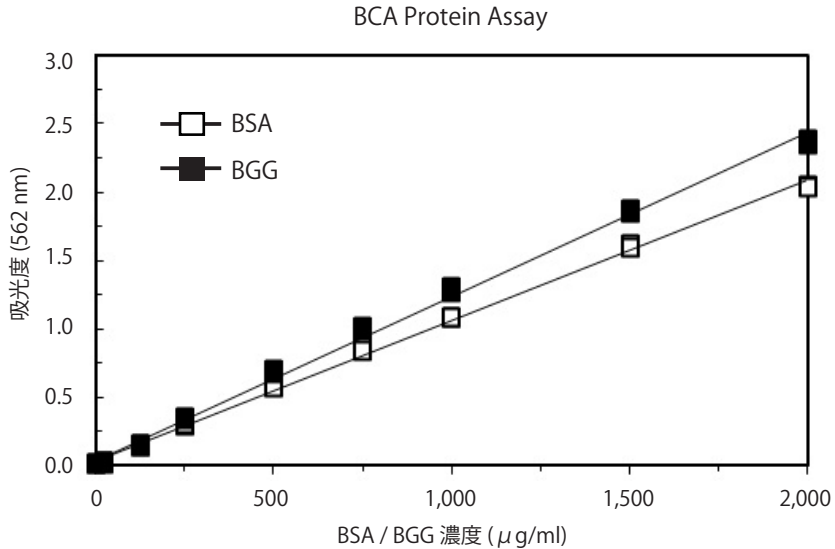


図 2. 0 ~ 2,000 μg/ml 濃度範囲における BSA と BGG の標準曲線

表 2. 標準プロトコールにおける BSA に対する各種タンパク質の発色率

Protein	Ratio*
Albumin, bovine serum (BSA)	1.00
Alcohol Dehydrogenase, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.54
Aldolase from rabbit muscle	0.89
Carbonic Anhydrase, bovine erythrocytes	0.77
α-Chymotrypsin, bovine pancreas	1.06
Cytochrome C, bovine heart	0.90
Gamma globulin, bovine (BGG)	1.16
Hemoglobin, bovine	0.66
IgG, rabbit	1.29
IgG, mouse	1.15
Insulin, human	1.28
Lysozyme, chicken egg white	1.19
Ovalbumin, chicken egg white	0.95
Transferrin	0.85
Trypsin	0.98

* : Ratio = (各種タンパク質の吸光度の平均値) / (BSA の吸光度の平均値)

VII. 関連製品

TaKaRa Bradford Protein Assay Kit (製品コード T9310A)

VIII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社