

Product Information

Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit

製品番号 BCA1、B9643

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

同義語: BCA

製品概要

タンパク質定量は生化学研究においてもっともよく行われる操作の1つです。ビシンコニン酸 (BCA) アッセイの原理は、Lowry 法と同様で¹、アルカリ条件下で Cu²⁺-タンパク質複合体を形成し、続いて Cu²⁺から Cu¹⁺に還元されます。還元量は存在するタンパク質の量に比例します。システイン、システン、トリプトファン、チロシン、ペプチド結合²が Cu²⁺を Cu¹⁺に還元することが確認されています。BCA はアルカリ環境下で Cu¹⁺と青紫色の複合体を形成するので、この原理を利用してタンパク質によるアルカリ性 Cu²⁺の還元を測定します³。

BCA アッセイは biuret 法や Lowry 法よりも感度が高く、応用可能なアッセイです。さらに、ブランドフォード法よりも数値の変動が小さくなります。BCA アッセイには他のタンパク質アッセイを上回る多くの利点があります。

- 使いやすさに優れています。
- 発色複合体が安定しています。
- 界面活性剤の影響をあまり受けません。
- 幅広いタンパク質濃度に適用可能です。

溶液中のタンパク質定量に加え、BCA タンパク質アッセイはアガロース担体に共有結合するタンパク質やマルチウェルプレートに吸着するタンパク質アッセイなど他の用途にも使えます。

タンパク質アッセイを行う方法は2つあります。タンパク質アッセイは未知のタンパク質サンプルの濃度 (mg/mL) を測定することもできますし、未知のタンパク質サンプル中の総タンパク質量 (mg) を決定することもできます。BCA アッセイの検量線濃度範囲は 200~1,000 µg タンパク質/mL です。

標準的なアッセイでは、使用するタンパク質サンプルはわずか 0.1 mL なので、総タンパク質量の検量線範囲は 20~100 µg になります。

付属する試薬

Bicinchoninic Acid Solution (B9643)

Reagent A は 1,000 mL 溶液で、ビシンコニン酸、炭酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムが 0.1 N NaOH に溶解しています。(最終 pH 11.25)

Copper(II) Sulfate Pentahydrate 4% Solution (C2284)

Reagent B は 25 mL 溶液で、4% (w/v) 硫酸銅 (II) 五水和物が含まれています。

Protein Standard (Bovine Serum Albumin - BSA)
Solution (P0914)

本製品はフレームシールしたガラス製アンプル 5 本で、各アンプルには 1.0 mg/mL ウシ血清アルブミン 1.0 mL (保存剤として 0.05% アジ化ナトリウムを含む 0.15 M NaCl 溶液に溶解) が含まれています。

付属していないがアッセイ形式によっては必要な器具

- 560 nm 領域の吸光度の正確なアッセイが可能な分光光度計
- 96 ウエルプレート、製品番号 M0156
- 96 ウエルプレート用シール、製品番号 Z369667
- 試験管、13 x 100 mM、製品番号 Z144371
- 1 mL ディスポーザブルのプラスチック製キュベット 製品番号 C5416

ご使用前の注意と免責事項

弊社の製品は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート (MSDS) をご覧ください。

使用前の準備

BCA Working Reagent は Reagent A と Reagent B を 50:1 の割合で混和して調製します。

BCA Working Reagent が薄緑色になるまで混和します。

保存/安定性

Reagent A と B は室温で保存して下さい。Reagent B を添加していない Reagent A は、密閉容器、室温保存で 1 年間は安定です。BCA Working Reagent (Reagent A を Reagent B と混和) はその日のうちに使い切って下さい。

タンパク質スタンダード品は 2–8 °C で保存して下さい。

手順

標準的なアッセイでは、BCA Working Reagent とタンパク質サンプルを 20:1 で混和します。96 ウエルプレートアッセイでは、BCA Working Reagent とタンパク質サンプルを 8:1 で混和します。サンプルにはブランク、BSA スタンダードタンパク質、未知のサンプルを用います。ブランクは、タンパク質を含まないバッファーです。BSA スタンダードタンパク質は、既知濃度のウシ血清アルブミンで、未知のサンプルは測定する溶液です。

BCA アッセイは通常 37 °C で行います。

発色は直ちに始まり、高温でインキュベートすることにより促進されます。温度を高くしたり、インキュベーション時間を長くすることで感度を高くすることができます。低温でのインキュベーションは発色速度を低下させます (手順 A、B を参照して下さい)。562 nm の吸光度を記録して、検量線と比較することによりタンパク質濃度が決まります。

A. 2.1 mL の標準的なアッセイプロトコール

(検量線濃度範囲は 200~1,000 µg/mL、または総タンパク質量 20~100 µg です。)

本法は試験管で行える標準的なアッセイです。本法では 0.1 mL のタンパク質サンプルと 2 mL の調製済み BCA Working Reagent を用います。標準的なアッセイについての手順の説明です。非標準的なアッセイ (96 ウエルプレート) を行う場合は、サンプル量を適宜調節して下さい。
注: 用いる形式にかかわらずアッセイ毎に検量線の作成が必要です。

- アッセイに必要な BCA Working Reagent の必要量を調製します。アッセイに用いる最終量は使用可能な用途および器具によって決まります。表 1 は、測定するブランク、BSA スタンダードタンパク質、未知のサンプルの本数によって BCA Working Reagent の調製量を決定するのに役立ちます。表に指定されている量の試薬 A と B を合わせます。BCA Working Reagent が均一な薄緑色になるまで混和します。

表 1.

調製する BCA Working Reagent 量測定するブランク、BSA スタンダードタンパク質、未知のサンプルの本数によって決まります。

測定本数		使用する各試薬量		
2.1 mL の標準的な試験管アッセイにおけるサンプル数	96 ウエルプレートアッセイにおけるウェル数	試薬 A (mL)	試薬 B (mL)	BCA Working Reagent の総量 (mL)
4	40	8	0.16	8.16
8	80	16	0.32	16.32
9	96	19	0.38	19.38
12	127	25	0.5	25.5

- 異なる濃度のスタンダードタンパク質の調製 BSA スタンダードタンパク質の使用可能範囲は、200~1,000 µg/mL (総タンパク質量 20~100 µg) です。
1 mg/mL のタンパク質スタンダード品から連続希釈して、アッセイに各希釈スタンダード液 0.1 mL を用いるとスタンダードタンパク質が調製できます。未知のサンプルと同じバッファーで希釈するのが最適です (表 2)。バッファーの代わりに脱イオン水も使用できますが、BSA スタンダードタンパク質におけるバッファーによる干渉は補正されません。

表 2

標準的なアッセイ例(一覧表)

未知の濃度のタンパク質サンプルについては、検量線の200~1,000 µg/mL の範囲に濃度が入っているかを確かめるために希釈系列を作る必要がある場合があります。2つの異なる未知のサンプル(チューブ 7、8)が表 2 に示されています。チューブ 7 は 5 倍希釈の未知のサンプルで、チューブ 8 は 10 倍希釈の異なる未知のサンプルです。研究者が各未知のサンプルの濃度の推定に基づき希釈系列を決定する必要があります。

チューブ番号	サンプル (mL)	[BSA]スタンダードタンパク質 (µg/mL)	BCA Working Reagent (mL)
1	0.1	0	2
2	0.1	200	2
3	0.1	400	2
4	0.1	600	2
5	0.1	800	2
6	0.1	1,000	2
7	0.1	(未知 1)	2
8	0.1	(未知 2)	2

- 0.1 mL の各 BSA スタンダードタンパク質、ブランク、未知のサンプルに 2 mL の BCA Working Reagent を加えます。完全に混和されるように穏やかにボルテックスします。試験管中の総液体量は 2.1 mL です。
- インキュベーション条件は次の通りです:
 - 60 °C で 15 分間または
 - 37 °C で 30 分間または
 - 25 °C (室温) で 2 時間~オーバーナイト
- 必要に応じて、室温まで温度を低下させます。
- 反応溶液をキュベットに移します。
- 溶液の 562 nm での吸光度を測定します。発色は室温に低下後もゆっくりと続きますが、全チューブの測定を 10 分以内に行えば有意な誤差は認められません。必要に応じたアッセイ表と、BSA スタンダードタンパク質濃度、または BSA スタンダードタンパク質中に存在するタンパク質量に基づいた検量線を作成します(例を下記の結果で示します)。

- 未知のサンプルの吸光度と BSA スタンダードタンパク質を用いて作成した検量線とを比較してタンパク質濃度を決定します。

標準的アッセイに基づく結果

アッセイから得られた吸光度の結果を用いて表を作成します。実施したアッセイ毎に別々の検量線を作成する必要があります。チューブ 1~6 のタンパク質量は添加した既知量の BSA スタンダードタンパク質から得ました。

注: 下に示したデータを検量線の代わりには使用しないで下さい。各アッセイにおける BSA スタンダードタンパク質(チューブ 1~6)の吸光度は、ここに示した数値とは異なります。チューブ 7 と 8 に記されたタンパク質量は検量線から得ました。

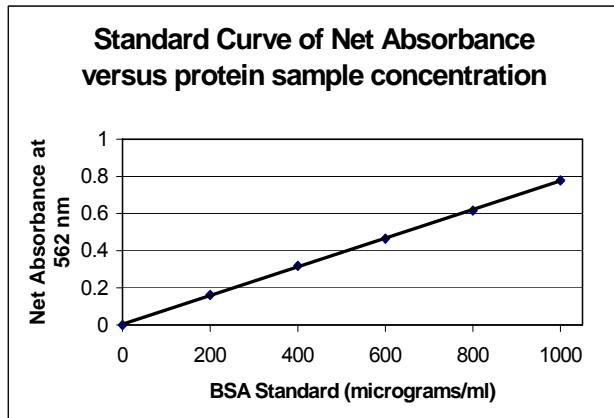
表 3.
アッセイデータ例(表)

チューブ番号	A ₅₆₂	Net A ₅₆₂	サンプル中のタンパク質量 (µg)	タンパク質サンプル中の[タンパク質] (µg/mL)	希釈度
1	0.045	0	0	0	-
2	0.207	0.162	20	200	-
3	0.364	0.319	40	400	-
4	0.510	0.465	60	600	-
5	0.661	0.616	80	800	-
6	0.823	0.778	100	1,000	-
7	0.587	0.542	70	700	5
8	0.743	0.698	90	900	10

結果が得られたら、未知のサンプルのタンパク質濃度を決めるために検量線を作成します。BSA スタンダードタンパク質濃度 (µg/mL、チューブ 1~6) に対して Net A₅₆₂ nm の値をプロットします。

図 1. アッセイデータから作成した検量線

検量線から、チューブ 7 中の未知のタンパク質サンプル (Net A_{562} = 0.542) は 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質を含むことが示されています。



未知のサンプル中に存在する実際のタンパク質濃度は次のように計算します：

$$(\text{未知のタンパク質サンプル } \mu\text{g}/\text{mL}) \times (\text{希釈度}) \\ (700 \mu\text{g}/\text{mL}) \times (5) = 3,500 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ タンパク質}$$

B. 96 ウェルプレートアッセイ

(検量線濃度範囲は 200~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または総タンパク質量 5~25 μg です。)

BCA アッセイは 96 ウェルプレートでの使用が可能です。プレートは主要な 5 点を変えなければ使用できます。

1. 562 nm で吸光度を測定します。プレートリーダーは、厳密な波長のフィルターではなく、540~590 nm の範囲でフィルターが交換できるものを使用して下さい。
2. BCA working reagent とタンパク質サンプルとの比は、標準的なアッセイとの比と変える必要があります。
例：
標準的なアッセイ (試験管) : 0.10 mL のタンパク質サンプルに対して 2 mL のBCA Working Reagent (1:20)
96 ウェルプレート : 25 μL のタンパク質サンプルに対して 200 μL のBCA Working Reagent (1:8)。マルチウェルプレートを用いる場合には、混和を容易にするために、BCA Working Reagent添加前に未知のサンプル、ブランク、スタンダードタンパク質がウェルに入っていることを確認して下さい。
3. タンパク質測定容器がシールされていることを確認して (プレートをフィルムでカバーする)、サンプルを次の条件でインキュベートします:
60 °C で 15 分間または

37 °C で 30 分間または
25 °C (室温) で 2 時間~オーバーナイト

4. タンパク質サンプルの濃度を 200~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (総タンパク質量 5~25 μg) にして下さい。
5. 各アッセイプロトコールに対して各々の検量線を作成する必要があります。各アッセイにおける光路は、アッセイで使う容器 (キュベットまたはマルチウェルプレート) や、反応容量により変化します。これらの変化や BCA Working Reagent のタンパク質サンプルに対する比率などその他の変化は、吸光度の値に影響します。

C. TCA 濃縮-BCA アッセイプロトコール

この方法を用いると、適合性チャートに記載された干渉物質のいくつかを除去することができます。また、この方法を用いて未知のサンプルの濃度を高くすることができます。

1. 未知のサンプルおよび BSA スタンダードタンパク質を別々のマイクロ遠心チューブに入れ、脱イオン水で最終容量を 1 mL に調整します。大きな容量でも次の容量に適宜調整することにより用いることができます。
2. 脱イオン水で調製した 0.15% (w/v) デオキシコール酸ナトリウム溶液 (製品番号 D5670) を 0.1 mL 添加します。
3. 混和後、室温で 10 分間静置します。氷上で 10 分間静置することもできます。
4. 0.1 mL の 6.1 N (約 100% w/v) トリクロロ酢酸溶液 (TCA、製品番号 T0699) を添加します。
5. 各サンプルにキャップをして、ボルテックスします。
6. 室温で 5 分間インキュベートします。氷上で 5 分間静置することもできます。
7. マイクロ遠心機を用いて最大速度で、サンプルを室温で 15 分間遠心分離します。
8. 注意深く各サンプルの上清をデカントまたはピペットで捨てます。ペレットを乱さないようにします。
9. 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 (製品番号 72076) で調製した 5% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム溶液 (SDS、製品番号 L6026) を各ペレットに 0.04 mL 添加して可溶化します。ペレットが完全に溶けるまでよく混和します。

- チューブに 0.06 mL の脱イオン水をピペットで加えてサンプル容量を 0.10 mL とし、2.1 mL の標準的なアッセイ法で使用します。少ない容量でアッセイを行う場合は、添加する水を少なくできます。
- 各サンプルをボルテックスして、2.1 mL の標準的なアッセイプロトコールまたは常用のアッセイに進んで下さい。

適合性チャート

記載された量は、タンパク質サンプル中で著しい干渉を招かない許容最大量です。

非適合物質	適合量
バッファー系	
N-アセチルグルコサミン (10 mM) (PBS に溶解, pH 7.2)	10 mM
ACES (pH 7.8)	25 mM
ビシン (pH 8.4)	20 mM
Bis-Tris (pH 6.5)	33 mM
CelLytic™ B 試薬	未希釈 干渉なし
塩化カルシウム (TBS に溶解, pH 7.2)	10 mM
CHES (pH 9.0)	100 mM
塩化コバルト (TBS に溶解, pH 7.2)	0.8M
EPPS (pH 8.0)	100 mM
塩化第二鉄 (TBS に溶解, pH 7.2)	10 mM
HEPES	100 mM
MOPS (pH 7.2)	100 mM
塩化ニッケル (TBS に溶解)	10 mM
PBS; リン酸 (0.1 M), NaCl (0.15 M) (pH 7.2)	未希釈 干渉なし
PIPES (pH 6.8)	100 mM
酢酸ナトリウム (pH 4.8)	200 mM
クエン酸ナトリウム (pH 4.8 または pH 6.4)	200 mM
トリシン (pH 8.0)	25 mM
トリエタノールアミン (pH 7.8)	25 mM
Tris	250 mM
TBS; Tris (25 mM), NaCl (0.15 M) (pH 7.6) (製品番号 T 5030)	未希釈 干渉なし
Tris (25 mM), グリシン (1.92 M), SDS (0.1%) (pH 8.3) (製品番号 T 4904)	未希釈 干渉なし
塩化亜鉛 (10 mM) (TBS に溶解) pH 7.2	10 mM

バッファー添加物	
硫酸アンモニウム	1.5 mM
アプロチニン	10 mg/L
炭酸水素セシウム	100 mM
グルコース	10 mM
グリセロール	10%
グアニジン塩酸塩	4 M
塩酸	100 mM
イミダゾール	50 mM
ロイペプチド	10 mg/L
PMSF	1 mM
アジ化ナトリウム	0.20%
炭酸水素ナトリウム	100 mM
塩化ナトリウム	1 M
水酸化ナトリウム	100 mM
リン酸ナトリウム	25 mM
スクロース	40%
TLCK	0.1 mg/L
TPCK	0.1 mg/L
オルトバナジン酸ナトリウム (PBS に溶解) pH 7.2	1 mM
チメロサール	0.01%
尿素	3 M
キレート剤	
EDTA	10 mM
EGTA	適合しない
クエン酸ナトリウム	200 mM
界面活性剤	
BRIJ® 35	5%
BRIJ 52	1%
CHAPS	5%
CHAPSO	5%
デオキシコール酸	5%
Nonidet P-40 (IGEPAL® CA-630)	5%

非適合物質 (続き)	適合量
界面活性剤 (続き)	
オクチルβ-グルコシド	5%
オクチルβ-チオグルコピラノシド	5%
SDS	5%
SPAN® 20	1%
TRITON™ X-100	5%
TRITON X-114	1%
TRITON X-305	1%
TRITON X-405	1%
TWEEN® 20	5%
ツイーン 60	5%
ツイーン 80	5%
Zwittergent®	1%
還元剤およびチオール含有化合物	
ジオエリスリトール (DTE)	1 mM
ジオスレイトール (DTT)	1 mM
2-メルカプトエタノール	1 mM
トリブチルホスフィン	0.01%
溶媒	
アセトン	10%
アセトニトリル	10%
DMF	10%
DMSO	10%
エタノール	10%
メタノール	10%

注: これは完全な適合性チャートではありません。多くの物質が様々なタンパク質に異なる方法で影響を与えます。脱イオン化水のみで目的のタンパク質を測定した後、干渉の可能性のある物質を含むバッファーで測定して下さい。吸光度の比較から干渉物質が存在するかどうかがわかります。干渉物質に関する追加情報については以下の参考文献を参照して下さい。¹⁻⁴

注: 金属イオンのキレート、アッセイのpHの変化、銅を還元する試薬はBCAアッセイに影響を及ぼします。以下に例を示します:

1. EDTA (>10 mM) や EGTA (あらゆる濃度) などの金属キレート剤

2. システイン (あらゆる濃度)、DTT (>1 mM)、ジチオエリスリトール (>1 mM) および 2-メルカプトエタノール (>0.01%) などのチオール含有試薬
3. 硫酸アンモニウム (>1.5 M)、Tris (>0.25 M) およびリン酸ナトリウム (>0.1 M) などの高濃度の塩やバッファー

トラブルシューティングガイド

タンパク質サンプルに非適合試薬品または物質が含まれる

1. タンパク質の初期濃度が高い場合は、サンプルを希釈して干渉物質が影響しないようにして下さい。
2. TCA 濃縮-BCA 法を用いて、ペレットの遠心分離後、不適合物質液を捨てて下さい。
3. キレート試薬による干渉は、調製した BCA Working Reagent 中の硫酸銅 (II) 溶液の相対量が増えると低下します。標準的な調製では、ビシンコニン酸溶液に対する硫酸銅 (II) 溶液の割合は 50:1 です。硫酸銅 (II) 溶液の割合を 3 まで増やして下さい。

テクニカルチップ

1. 使用するガラス器具は十分に洗浄されているか確認して下さい。
2. 別のタンパク質アッセイ法を検討して下さい。アッセイから非適合物質を除去できない場合は、Bradford 試薬用 (製品番号 B6916) で行うことを検討して下さい。
3. タンパク質濃度が低すぎる場合は、QuantiPro BCA Kit (製品番号 QPBCA) を試して下さい。

参考文献

1. Lowry, O.H. et al, J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).
2. Wiechelman, K. et al, Anal. Biochem., **175**, 231-237 (1988).
3. Smith, P.K. et al, Anal. Biochem., **150**, 76-85 (1985).
4. Brown, R.E. et al, Anal. Biochem., **180**, 136-139 (1989).

TRITON は Union Carbide Corporation の商標です。BRIJ、TWEEN、SPAN は ICI Americas の登録商標です。IGEPAL は Rhone-Poulenc AG Co.の登録商標です。Zwittergent は Calbiochem-Novabiochem Corp.の登録商標です。

MAM,JDS 09/05-1

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc.は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。収載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。