**Protocol II: BCA**

**Leverancier:[SigmaAldrich](https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-quantitation/protein-determination-by-the-bicinchoninic-acid-bca-method?srsltid=AfmBOorjgel4g2TPyZc3wTjgxtXBdL0EyqNxrIpazMMBVOgYwONSVUFp) & [ThermoFischer](https://documents.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf)**

**Doel:** Het doel van dit protocol is om de totale eiwitconcentratie van de monsters te bepalen met behulp van de bicinchoninezuur (BCA) methode.

**Sub-doel:** Een sub-doel binnenin dit protocol is te achterhalen wat het verschil in totale eiwitconentratie is in de CLAR vs UNC samples (gecentrifugeerd vs ongecentrifugeerd; en om te achterhalen of dit overeenkomt met de hoeveelheid eiwit in de pellet.

**Sub-doel hypothese:** De verwachting is dat na centrifugatie de totale eiwitconcentratie verlaagd en dat dit verlies overeenkomt met de hoeveelheid concentratie eiwit in de pellet.

**Principe:** Eiwitten reduceren alkalisch Cu2+ tot Cu1+ door eiwit in een alkalische medium met een gevoelige en selectieve detectie van Cu1+ met behulp van een reagens dat BCA bevat.   
De paarskleuring wordt gevormd door 2 BCA moleculen met 1 koper-ion en vertonen een sterke absorptie bij 562 nm die overeenkomt met een eiwitconcentratie over een werkt breed van 20-200 µg/mL.   
Met de totale eiwitconcentraties kan voor de vervolg experimenten berekent worden hoeveel materiaal nodig is. Verder kan de totale eiwit concentratie gebruikt worden om verschillen tussen donor te normaliseren.

**Materialen**

* BCA Reagens A
* BCA Reagens B
* Eiwit standaardoplossing; 1 mg/mL BSA
* PBS pH 7.0
* Speeksel aliquots
* Spectrofotometer
* 8 epjes + epjeshouder
* Pipetten en steriele filtertips
* 96 wells plaat
* Spectrofotometrische plate reader 562 nm

**Veiligheid**

BCA reagent B

A close-up of a sign

AI-generated content may be incorrect.  
H318 - Veroorzaakt ernstig oogletsel  
H400 - Zeer giftig voor in het water levende organismen  
H411 - Giftig voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen

P280 - Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen  
P273 - Voorkom lozing in het milieu

P305 + P351 + P338 - BIJ CONTACT MET DE OGEN: voorzichtig afspoelen met water gedurende eenaantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen  
P391 - Gelekte/gemorste stof opruimen  
P310 - Onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen

P501 - Inhoud/verpakking afvoeren naar een erkende afvalverwerkingsinstallatie

***Contact***

* Inademing: Frisse lucht inhaleren
* Huid: Overvloedig water wassen
* **Ogen**: voorzichtig afspoelen met water gedurende eenaantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen
* Inslikken: Bij onwel gevoel, arts raadplegen en antigifcentrum

***Afvalverwerking:*** Hoort bij anorganisch basisch afval (koperhoudend afval). Wordt gemixt met reagent A en andere samples, afvalvat blijft hetzelfde en resten in ziekenhuisafvalvat. **NIET** door de riolering.

***Maatregelen:*** Reagent B met handschoenen

**Methode***Reageerbuis methode: 0.1 ml van eiwitmonster 🡪 verhouding monster : reagens (1:20)  
Microtiterplalat methode: 10-25 ul eiwitmonster 🡪 verhouding monster : reagens (1:8)  
Verdunningsschema voor de BCA standaard = 1000 ug/ml*

1. Laat de remmercocktail en speeksel aliquots alvast ontdooien in een bak met ijs
2. Zet 8 epjes klaar voor de verdunningsreeks van de BSA stock oplossing, pipeteer volgens tabel 1.  
   **LET OP:** Meng goed door op en neer te pipetteren voordat je een deel van het volume overzet  
     
     
    *Tabel 1. Pipetteerschema BSA standaardoplossingen*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Concentratie BSA** | **1000 µg/mL** | **500 µg/mL** | **250 µg/mL** | **125 µg/mL** | **62.5 µg/mL** | **31.25 µg/mL** | **15.6 µg/mL** | **7.8 µg/mL** |
| BSA stockoplossing 1mg/mL | 240 µL |  |  |  |  |  |  |  |
| Seriële verdunning vòòr |  | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 120 µL |
| PBS pH 7.0 |  | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 120 µL |
| Volume | 240 µL | 240 µL | 240 µL | 240 µL | 240 µL | 240 µL | 240 µL | 240 µL |
| Volume na doorverdunnen | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 120 µL | 240 µL |

1. Maak werkreagens (WR), bepaal daarvoor eerst totaalvolume en darna de verhouding reagens A: reagsn B staat op 50:1 toepassen   
   Voor een microtiterplaat is 200 µL werkreagens nodig voor elk monster.:   
   *(8 standaarden + 18 speeksel samples + 1 blanco + 1 rem blanco) \* (3 replicaten) \* 200 µL= 16.8 mL WR.*   
   Maak extra tot 20.4 mL WR waarvan  
   ~20,000 µL Reagens A (50 delen van 51)   
   ~400 µL Reagens B (1 deel van 51)
2. 96 wells plaat verhouding van monster:WR is 1:8   
   *Dit betekent dat er 25 µL sample gepipeteerd moet worden per well*
3. Pipetteer 25 ul van elke monster in een well volgens de layout in figuur 1.  
   **LET OP:** Ontdooid materiaal eerst goed mengen door voorzichtig op en neer te pipetteren  
   **LET OP:** Voorkom luchtbelvorming met reverse pipetting techniek (druk door tot 2e stop, inpipetteren, uitpipetteren tot 1e stop)  
     
   A chart of different colors

   AI-generated content may be incorrect.  
   *Figuur 1. Layout van de 96-well plate voor de BCA assay*
4. Pipetteer 200 ul werkreagens toe aan elke wel en meng door op en neer te pipeteren  
   *Gebruik multichannel pipet***LET OP:** Voorkom luchtbelvorming met reverse pipetting techniek (druk door tot 2e stop, inpipetteren, uitpipetteren tot 1e stop)hg
5. Bedek de plaat met het deksel en incubeer voor 30 minuten bij 37 °C.
6. Breng de plaat op kamertemperatuur (2-5 min).
7. Stel de spectrofotometer bij een absorptie van 562 nm.
8. Meet de 96 wells plaat in de reader en sla de ruwe data op.

***Analyse***

1. Trek de gemiddelde meting van de blanco af van alle andere monsters.
2. Maakt in excel een standaardcurve door de gemiddelde blanco gecorrigeerd voor elke BCA standaard uit te zetten tegen de concentratie in µg/mL.
3. Gebruikt de standaardcurve om de eiwitconcentratie te bepalen in elke onbekende monster.
4. Vergelijk de triplo condities met elkaar voor spreiding