

Jan 27, 2025

Dosagem de proteínas por BCA V.1

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ewov1dxw2vr2/v1>

Isis Paiva Trajano¹

¹University of Sao Paulo



Isis Paiva Trajano

University of Sao Paulo

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ewov1dxw2vr2/v1>

Protocol Citation: Isis Paiva Trajano 2025. Dosagem de proteínas por BCA. **protocols.io**

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ewov1dxw2vr2/v1>

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Protocol status: Working

We use this protocol and it's working.

Created: January 27, 2025



Last Modified: January 27, 2025

Protocol Integer ID: 119121

Keywords: protein quantification by bca, proteínas por bca, protein quantification, protein concentration, bicinchoninic acid, bca, proteína, proteína entre, biochemical method, protein, método bioquímico que determina as concentração, absorbance value, método bioquímico que determina, absorbance value of the sample

Abstract

O ensaio de ácido bicinonínico (BCA) é um método bioquímico que determina as concentrações de proteína entre 20 e 2.000 µg/mL numa solução. A dosagem de proteínas por BCA é feita através da mudança de cor da solução, que passa de azul para roxo. O valor de absorbância da amostra é comparado a uma curva padrão para determinar a concentração de proteína.

Protein Quantification by BCA

The bicinchoninic acid (BCA) assay is a biochemical method that determines protein concentrations ranging from 20 to 2,000 µg/mL in a solution. Protein quantification by BCA is performed through a color change in the solution, which shifts from blue to purple. The absorbance value of the sample is compared to a standard curve to determine the protein concentration.

Materials

- Luvas
- Microtubo Eppendorf 0,5 mL (1 por amostra)
- 6 tubos Eppendorf 1 mL
- 1 placa de ELISA de 96 poços
- Becker com H₂O mQ
- Isopor com gelo
- Agitador vórtex
- Solução padrão
- Solução A
- Solução B
- Pipeta 0.5 - 10 µL
- Pipeta 10 - 100 µL
- Pipeta 0,1 - 1 mL
- Pipeta 1 - 5 mL
- Ponteira 20 µL
- Ponteira 200 µL
- Ponteira 1 mL
- Ponteira 5 mL

Before start

Preparar bancada com papel pardo e separar materiais.

Planejamento do ensaio

1 Planejar e desenhar o layout das placas.

	PROTEÍNAS			DATA			RESPONSÁVEL					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	BLK	31,25	31,25	62,5	62,5	125	125	250	250	500	500
B	1000	1000	2000	2000	EXP N.º Amostra Diluição	EXP N.º Amostra Diluição	EXP N.º 1 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 1 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 2 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 2 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 3 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 3 Hipotálamo 1:20
C	EXP N.º 4 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 4 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 5 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 5 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 6 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 6 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 7 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 7 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 8 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 8 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 9 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 9 Hipotálamo 1:20
D	EXP N.º 10 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 10 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 11 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 11 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 12 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 12 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 13 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 13 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 14 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 14 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 15 Hipotálamo 1:20	EXP N.º 15 Hipotálamo 1:20
E	EXP N.º 1 Baco 1:50	EXP N.º 1 Baco 1:50	EXP N.º 2 Baco 1:50	EXP N.º 2 Baco 1:50	EXP N.º 3 Baco 1:50	EXP N.º 3 Baco 1:50	EXP N.º 4 Baco 1:50	EXP N.º 4 Baco 1:50	EXP N.º 5 Baco 1:50	EXP N.º 5 Baco 1:50	EXP N.º 6 Baco 1:50	EXP N.º 6 Baco 1:50
F	EXP N.º 7 Baco 1:50	EXP N.º 7 Baco 1:50	EXP N.º 8 Baco 1:50	EXP N.º 8 Baco 1:50	EXP N.º 9 Baco 1:50	EXP N.º 9 Baco 1:50	EXP N.º 10 Baco 1:50	EXP N.º 10 Baco 1:50	EXP N.º 11 Baco 1:50	EXP N.º 11 Baco 1:50	EXP N.º 12 Baco 1:50	EXP N.º 12 Baco 1:50
G	EXP N.º 13 Baco 1:50	EXP N.º 13 Baco 1:50	EXP N.º 14 Baco 1:50	EXP N.º 14 Baco 1:50	EXP N.º 15 Baco 1:50	EXP N.º 15 Baco 1:50	EXP N.º 1 Intestino 1:20	EXP N.º 1 Intestino 1:20	EXP N.º 2 Intestino 1:20	EXP N.º 2 Intestino 1:20	EXP N.º 3 Intestino 1:20	EXP N.º 3 Intestino 1:20
H	EXP N.º 4 Baco 1:20	EXP N.º 4 Baco 1:20	EXP N.º 5 Baco 1:20	EXP N.º 5 Baco 1:20	EXP N.º 6 Baco 1:20	EXP N.º 6 Baco 1:20	EXP N.º 7 Intestino 1:20	EXP N.º 7 Intestino 1:20	EXP N.º 8 Intestino 1:20	EXP N.º 8 Intestino 1:20	EXP N.º 9 Intestino 1:20	EXP N.º 9 Intestino 1:20

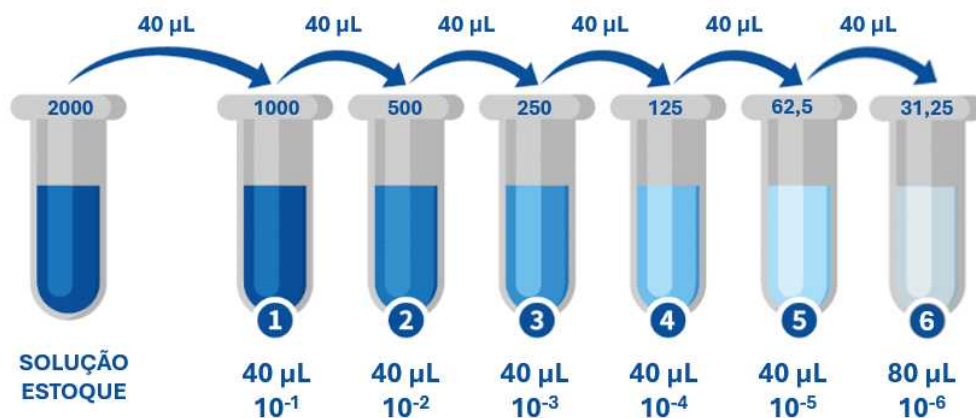
Exemplo de layout.

Preparo das amostras

- Deixar as amostras descongelando no isopor com gelo
- Separar e identificar 1 eppendorf 0,5 mL para cada amostra
- Adicionar água miliQ aos tubos, de acordo com a concentração. O volume total deve ser de 50 µL.
Ex. Para uma amostra diluída a 1:50, adicionar 49 µL de H₂O mQ + 1 µL de amostra cocncetrada.
- Assim que as amostras descongelarem descongelarem, agitar o tubo no vórtex e pipetar a quantidade de amostra no Eppendorf 0,5 mL com H₂O mQ correspondente (de acordo com a sua concentração). Finalizar com agitação do tubo com a amostra diluída.
- Deixar os tubos de amostras diluídas no gelo durante a preparação da curva.

Preparo da curva

- 7 Identificar os tubos Eppendorf de 1 mL de acordo com cada ponto da curva, exceto 2000.
- 8 Adicionar 40 μL de H_2O mQ nos tubos de 1 mL.
- 9 Fazer diluição seriada da solução estoque de acordo com a imagem. O ponto mais alto da curva é a própria solução estoque.



Agitar o tubo antes de pipetar e trocar de ponteira a cada diluição.

Preparo da placa

- 10 Pipetar 10 μL de cada ponto da curva e das amostras em duplicata nos poços de acordo com layout pré-desenhado. No BLK pipetar 10 μL de H_2O mQ.
- 11 Preparar solução de trabalho.
Diluição 1:50 (1 Reagente B/ 49 Reagente A)
Ex. Para uma placa de 96 poços completa, será necessário 19,2 mL de solução de trabalho. Preparar um pouco a mais de solução, por exemplo 19,5 mL, o que corresponde a 384 μL de Reagente B + 18,816 mL de Reagente A (18 mL + 816 μL).
Agitar solução de trabalho antes de adicionar à placa.
- 12 Pipetar 200 μL da solução de trabalho em cada poço.



Leitura da placa

- 13 Incubar a placa a 37 °C durante 30 minutos.
Obs. A leitora pode ser ligada e aquecida um pouco antes para que ao colocar a placa na leitora ela já esteja na temperatura certa.
- 14 Ler a placa a 562 nm.