

BCA 蛋白定量试剂盒

产品简介

目前世界上最常用的蛋白浓度检测方法是：BCA 法和 Bradford 法。

BCA 法测蛋白的原理是在碱性环境下蛋白质与 Cu^{2+} 络合并将 Cu^{2+} 还原成 Cu^{1+} 。BCA 与 Cu^{1+} 结合形成稳定的紫蓝色复合物，在 562nm 处有最大的光吸收值并与蛋白质浓度成正比，据此可测定蛋白质浓度。BCA 法与传统方法相比，操作更简单、试剂及其形成的颜色复合物更稳定、灵敏度更高。BCA 法测定蛋白浓度兼容性亦很好，不受大部分样本中其他成分的影响，对于 5% 以内的去垢剂如 SDS、TritonX-100、Tween20、Tween80、NP-40 具有很好的兼容性，但易受螯合剂、还原剂等的影 响，在测定蛋白浓度前应尽量使样本满足如下要求：EDTA 浓度 $\leq 10\text{mM}$ 、DTT 浓度 $\leq 1\text{mM}$ 、2-ME $\leq 0.01\%$ 、无 EGTA。

BCA Protein Assay Kit 在 $50 \sim 2000\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内有较好的线性关系。本试剂盒适用于微量蛋白质浓度的测定，其最小检出量为 $25\mu\text{g/ml}$ 。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成

名称 \ 编号	ADS001T0	ADS001T1	ADS001T2	Storage
	250T	500T	2500T	
试剂(A):BCA 试剂 A	50ml	100ml	500ml	RT
试剂(B):BCA 试剂 B	1.5ml	3ml	15ml	RT
试剂(C):蛋白标准(BSA)	20mg	20mg	20mg	RT
试剂(D):蛋白标准配制液	5ml	10ml	10ml	RT
使用说明书	1 份			

自备材料

- 1、蒸馏水、生理盐水或 PBS
- 2、酶标仪或分光光度计、EP 管、96 孔板或比色皿、恒温箱或水浴锅

操作步骤(仅供参考)

- 1、取 1ml 蛋白标准配制液加入到含有 20mg 的蛋白标准(BSA)中，充分溶解后配制成为 20mg/ml 的蛋白标准溶液，配制后可立即使用，配制的蛋白标准溶液应 -20°C 保存。

- 2、取适量的 20mg/ml 蛋白标准溶液，稀释至终浓度为 500 μ g/ml，如取 25 μ l 蛋白标准 (20mg/ml)，加入 975 μ l 稀释液，充分混匀即配制成 500 μ g/ml 蛋白标准溶液。注意：待测蛋白溶解于什么样的稀释液中，蛋白标准也宜溶解于同样的溶液中，一般可用 0.9%NaCl 或 PBS 作为 BSA 的稀释液，稀释后的 500 μ g/ml 蛋白标准溶液也应-20 $^{\circ}$ C 长期保存。
- 3、根据样品数量，按试剂(A):试剂(B)=50:1 的比例配制 BCA 工作液，即取 50 份 BCA 试剂 A 和 1 份 BCA 试剂 B，充分混匀，即获得 BCA 工作液(注意：正常 BCA 工作液应为苹果绿或墨绿色，如变为紫色或其他颜色应弃用)；例如取 5mlBCA 试剂 A 和 0.1mlBCA 试剂 B，配制成 5.1mlBCA 工作液，BCA 工作液室温 24 小时内稳定。
- 4、将 500 μ g/ml 蛋白标准溶液按 0、1、2、4、8、12、16、20 μ l 加到 96 孔板或 EP 管中，加稀释液补足至 20 μ l，其蛋白标准浓度依次为 0、25、50、100、200、300、400、500 μ g/ml。
- 5、加 20 μ l 待测蛋白到 96 孔板或 EP 管中，如果样本不足 20 μ l，用稀释液补足至 20 μ l。注意：如果标准品稀释液与溶解待测蛋白的溶液不同，应在待测蛋白中加入 20 μ l 稀释液；如果标准品稀释液与溶解待测蛋白的溶液相同，无需在待测蛋白孔中加入 20 μ l 稀释液，以减少不同溶液的差异。
- 6、向各孔或 EP 管加入 200 μ l 配制好的 BCA 工作液，迅速混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 30~60min。
- 7、冷却至室温，立即用酶标仪或分光光度计测定 562nm 波长处吸光度(如无 562nm，540~595nm 之间的波长也可)，各孔或 EP 管吸光度减去蛋白浓度为 0 μ g/ml 的标准管的吸光度，以求得的差值为纵坐标：以标准孔或 EP 管中蛋白浓度(μ g/ml)为横坐标，得出标准曲线及回归方程，根据标准曲线计算出待测样品的蛋白浓度。

注意事项

- 1、蛋白标准(BSA)粉末溶解于蛋白标准配制液后，即获得蛋白标准原液(即 20mg/ml 的蛋白标准)，该原液中含有防腐剂，不影响后续检测，该蛋白标准原液-20 $^{\circ}$ C 长期保存。
- 2、待测蛋白溶解于什么样的稀释液中，蛋白标准也宜溶解于同样的溶液中，否者待测蛋白与蛋白标准中所含非蛋白成分不一致，有可能导致测定不准确。
- 3、如果检测效果不佳，可以室温放置 2h 或 60 $^{\circ}$ C 放置 30min，颜色会随着时间的延长不断加深，显色反应也会随温度升高而加快；如果浓度较低，可以适当延长孵育时间或在较高温度下孵育。
- 4、测定标准曲线时发现随着标准品浓度的增加，吸光度或颜色没有明显变化，可能的原因是样品中含有严重干扰 BCA 法测定蛋白浓度的物质。
- 5、如检测样本中含有较多螯合剂、还原剂等影响因素时可考虑 Bradford 法测定。
- 6、因 BCA 法测定时颜色会随着时间的延长不断加深，建议每次测定时都作标准曲线，且显

色反应的速度和温度有关，所以除非精确控制显色反应的时间和温度，否则每次都做标准曲线。

- 7、如果没有酶标仪也可以用普通的分光光度计测定，但应考虑比色皿的最小测定体积，按比例适当加大 BCA 工作液的用量使总体积不小于最小检测体积，样品和标准品的用量亦相应按比例放大；使用分光光度计测定蛋白浓度时，可以测定的样品数量会显著减少。
- 8、为了加快 BCA 法测定蛋白浓度的速度可以适当加热，但切勿过热，否则易失效。

有效期： 12个月，蛋白标准配制成溶液后应-20℃冻存。

附录 1： 标准曲线制作：在室温条件下按说明书操作，对系列标准用酶标仪测定 570nm 时的吸光度，其数值及标准曲线如下(仅供参考)：

蛋白标准(μg/ml)	0	25	50	100	200	300	400	500
吸光度	0.205	0.211	0.266	0.364	0.547	0.72	0.87	1.009

注意：对于 10~50μg/ml 范围内的蛋白样品，要充分考虑如 EDTA、2-ME、DTT 等干扰因素，其检测结果波动较大，标准品亦有波动，请注意小心精细操作，建议采购微量 BCA 蛋白定量试剂盒。

