



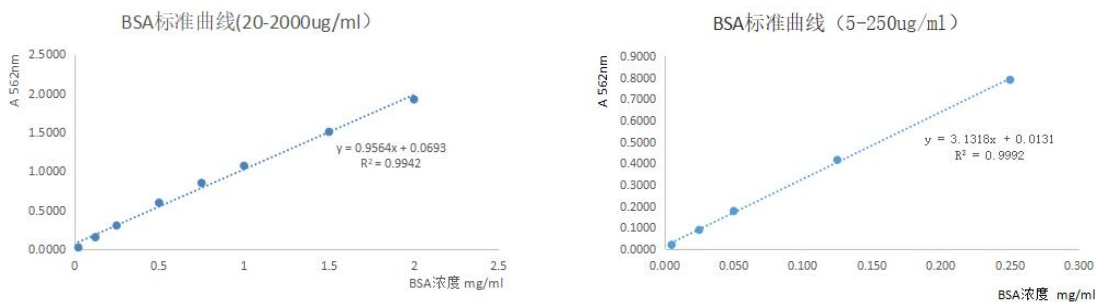
BCA Protein Assay Kit

目录

| | |
|-------------------|---|
| 1. 产品介绍..... | 1 |
| 2. 操作步骤..... | 1 |
| 3. 常见问题及解决方法..... | 2 |
| 4. 订购信息及相关产品..... | 3 |

1. 产品介绍

BCA Protein Assay Kit 是目前世界上最常用的两种蛋白浓度检测方法之一。BCA 蛋白质定量包括两步反应：首先，二价铜离子(Cu²⁺)在碱性条件下被蛋白质的肽键还原成一价铜离子(Cu⁺)；其次，两个分子的 BCA 络合一个一价铜离子(Cu⁺)，形成一种在 562nm 处有强吸收值的紫色复合物，而复合物的吸收值与蛋白的浓度在一定范围内呈线性相关（如图）。



使用 BCA 法进行蛋白质定量有以下特点：1. 不受蛋白种类的影响，在 20-2000 µg/ml 浓度范围内有较好的线性。2. 表面活性剂对浓度检测的干扰较小。但由于还原剂和螯合剂对反应有阻碍，因此本制品不适用于含有还原剂或者螯合剂的蛋白质样品的定量。

表 1 是试剂盒的基本组成，我们提供两种检测方案：试管和微孔板。试管方案所需样品量较大（0.1 ml），但样品和工作液的稀释比例为 1:20 (V/V)，所以干扰物的影响比较小；微孔板方案所需的工作液较少（200 µl），样品体积小（25 µl），但样品和工作液的稀释比例为 1:8 (V/V)，对干扰物的耐受较差。

表 1. BCA Protein Assay Kit 组成

| 试剂名称 | 250 次 | 1250 次 |
|---------------------------------|-------|--------|
| BCA Protein Assay Kit Reagent A | 50 ml | 250 ml |
| BCA Protein Assay Kit Reagent B | 1 ml | 5 ml |
| Bovine Serum Albumin | 1 ml | 5*1 ml |
| 说明书 | 1 份 | 1 份 |

2. 操作步骤

2.1 BSA 标准品稀释梯度

按照表 2 制备一组蛋白质标准品。最好使用与待测样品相同的稀释液，每个稀释浓度的标准品的体积足够用于三次重复检测。

表 2. 稀释 Bovine Serum Albumin (BSA) 标准品

| 用于标准方案的稀释方法（检测范围=20-2000 µg/ml） | | | |
|---------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| 编号 | 稀释液的体积 (µl) | BSA 的体积和来源 (µl) | BSA 终浓度 (µg/ml) |
| A | 0 | 300 µl 原液 | 2000 |
| B | 125 | 375 µl 原液 | 1500 |
| C | 325 | 325 µl 原液 | 1000 |
| D | 175 | 175 µl B 稀释液 | 750 |
| E | 325 | 325 µl C 稀释液 | 500 |
| F | 325 | 325 µl E 稀释液 | 250 |
| G | 325 | 325 µl F 稀释液 | 125 |
| H | 400 | 100 µl G 稀释液 | 25 |
| I | 400 | 0 | 0=空白 |



用于试管增强方案的稀释方法 (检测范围=5-250 µg/ml)

| 编号 | 稀释液的体积 (µl) | BSA 的体积和来源 (µl) | BSA 终浓度 (µg/ml) |
|----|-------------|-----------------|-----------------|
| A | 700 | 100 µl 原液 | 250 |
| B | 400 | 400 µl A 稀释液 | 125 |
| C | 450 | 300 µl B 稀释液 | 50 |
| D | 400 | 400 µl C 稀释液 | 25 |
| E | 400 | 100 µl D 稀释液 | 5 |
| F | 400 | 0 | 0 |

2.2 制备 BCA 工作液

2.2.1 使用下述公式来确定所需的工作液的总体积：

(标准品的个数+待测蛋白质样品的个数) × (实验重复次数) × (用于每个样品的工作液的体积) = 所需工作液总体积

2.2.2 将 50 份 BCA Protein Assay Kit Reagent A 与 1 份 BCA Protein Assay Kit Reagent B 混合 (A: B =50: 1)，制备工作液。

2.3 试管方案 (样品与工作液的比例=1: 20)

2.3.1 取各个稀释浓度的蛋白质标准品和待测蛋白质样品各 0.1 ml，加入到做好标记的试管中。

2.3.2 在每个试管中加入 2.0 ml 工作液，充分混合。

2.3.3 将试管密封，根据不同实验方案，选择相应的温度和时间进行孵育：

标准方案：37℃，30 min

增强方案：60℃，30 min

2.3.4 将所有试管冷却至室温。

2.3.5 将分光光度计波长设定在 562 nm，用 I 管空白标准品对仪器进行调零 (增强方案用 F 管空白标准品对仪器进行调零)，然后在 10 分钟内依次检测所有样品的吸光值。

2.3.6 将 BSA 标准品在 562 nm 处经过空白校正的吸光值对其浓度 (µg/ml) 作图，绘制标准曲线。使用该标准曲线来确定每个待测蛋白质样品的浓度。

2.4 微孔板方案 (样品与工作液比例=1: 8)

2.4.1 取各个稀释浓度的蛋白质标准品和待测蛋白质样品各 25 µl，加入到微孔板中。

2.4.2 在每一个孔中加入 200 µl 工作液，并在振荡器上震荡 30 秒，使其充分混合。

2.4.3 将微孔板密封，在 37℃ 孵育 30 分钟。

2.4.4 将微孔板冷却至室温，使用酶标仪测量样品在 562 nm 处的吸光值。

2.4.5 将各个标准品和待测蛋白质样品在 562 nm 处的吸光值减去空白标准品在 562 nm 处的平均吸光值。

2.4.6 将 BSA 标准品在 562 nm 处经过空白校正的平均吸光值对其浓度 (µg/ml) 作图，绘制标准曲线。使用该标准曲线来确定每个待测蛋白质样品的浓度。

2.5 注意事项

2.5.1 当 B 溶液加入到 A 溶液中时，开始可观察到浑浊产生，搅拌后浑浊迅速消失，得到果绿色的澄清工作液。请根据所要检测的样品数量，配制足够体积的工作液。配制好的工作液在室温密闭容器中可稳定保存 24 小时。

2.5.2 该方法不是终点法，孵育完成后，工作液和待测样品混合液仍会继续显色，但室温条件下的显色速率较慢，请在 10 分钟内完成所有样品检测，就不会产生明显误差。

2.5.3 标准方案检测时，如实验条件限制无法进行 37℃ 孵育，也可选择室温孵育 2 小时。

2.5.4 延长孵育时间或者升高温度会使工作液与待测样品反应颜色变深，在 562 nm 处吸收值变高，影响读数的准确性，降低试剂的检测灵敏度。

2.5.5 增强方案操作不建议在微孔板中进行，因微孔板中样品量较少，加热过程中易挥发，影响检测准确度。

2.5.6 BCA 试剂盒对各试剂的耐受浓度，请查询我们的网站信息。

2.5.7 不同蛋白用 BCA 试剂盒检测，都会有独特的吸光度反应。通常使用 BSA 作为标准定量未知蛋白的浓度，但如果需要精确定量，请使用高纯度目的蛋白做标准品。

3. 常见问题及解决方案

| 问题 | 原因分析 | 解决方案 |
|--------------|--------------|-------------------|
| 工作液与样品混合后未显色 | 样品中含有铜离子螯合试剂 | 对样品进行透析、脱盐或者稀释处理。 |
| 样品显色比预计颜色深 | 样品浓度过高 | 将样品稀释。 |



| | | |
|--------------------------------|-----------------------|---|
| 空白标准品吸光值正常, 标准品和待测样品显示的颜色比预计值低 | 检测波长不正确 | 在 562 nm 处检测吸收值。 |
| | 缓冲液为强酸或强碱, 工作液 pH 被改变 | 对样品进行透析, 脱盐或者稀释。 |
| 所有试管 (包括空白试管) 都呈现暗紫色 | 缓冲液中含有还原剂 | 对样品进行透析或者稀释。 |
| | 缓冲液中含有巯基 | |
| | 缓冲液中含有生物胺 (儿茶酚胺) | |
| 分光光度计或酶标仪不具备 562 nm 滤光片 | 采用 540 nm-590 nm 读数 | 样品在 540 nm-590 nm 之间的任意波长都可能检测到颜色变化, 但灵敏度会降低。 |

4. 订购信息及相关产品

| 名称 | 货号 | 规格 |
|-----------------------|----------|--------|
| BCA Protein Assay Kit | SLR01201 | 250 次 |
| | SLR01202 | 1250 次 |