

BCA 蛋白定量试剂盒说明书

产品包装

产品编号	盒内编号	产品名称	包装
YK2237	YK2237-1	BCA 蛋白定量试剂 A 液	100mL×1
	YK2237-2	BCA 蛋白定量试剂 B 液	3mL×1
	YK2237-3	BSA Standard Solution (2mg/mL)	2mL×1
—		说明书	1 份

产品简介

BCA 蛋白定量即 Bicinchoninic Acid Assay，是目前世界上最常用的两种蛋白浓度检测方法之一。这个方法通过检测不同浓度样品的颜色变化来判断蛋白的浓度。在碱性条件下，蛋白将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ， Cu^+ 与 BCA 试剂形成紫颜色的络合物，该络合物的产量与蛋白浓度成正相关，可检测该水溶性复合物在波长 562nm 处的吸收值，并与标准回归曲线对比，根据线性回归方程即可计算出待测蛋白的浓度。本试剂盒根据 BCA 法配制而成，检测浓度下限可达到 $25 \mu\text{g/mL}$ 。检测样本浓度在 $50\text{--}2000 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内有较好的线性关系。

保存条件:

BCA 蛋白定量试剂 A 液和 B 液室温保存；蛋白标准品在 $2\text{--}8^\circ\text{C}$ 保存，蛋白标准品长期不用可储存于 -20°C 冰箱。

操作方法

一. 配制 BSA 标准样本

标准品稀释液为蛋白样品的溶解液，标准品稀释液最好和溶解蛋白的溶液相同。也可用 0.9% 的 NaCl 或 $1\times\text{PBS}$ 进行稀释。可根据下表配制所需的标准样本，也可根据实验需要配制标准曲线，除空白对照外最少配制六个标准样本。

表一标准溶液配制

标准品名称	稀释液体积 (μL)	2mg/mLBSA 体积 (μL)	BSA 终浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
标准品 1	0	100	2
标准品 2	25	75	1.5
标准品 3	50	50	1
标准品 4	62.5	37.5	0.750
标准品 5	75	25	0.500
标准品 6	87.5	12.5	0.250
标准品 7	93.75	6.25	0.125
标准品 8	50	50 μL 标准品 7	0.0625
空白对照	100	0	0



二. 配制 BCA 工作液

1) 计算所需要的总 BCA 工作液体积。

总 BCA 工作液体积= (标准品+待测样品) × 重复数 × 每个样品所需要的 BCA 工作液, 比色皿检测时每个样品需要加 2.0mL BCA 工作液, 微孔板检测每个样品加 200 μ L BCA 工作液。

2) 配制 BCA 工作液

BCA 工作液配制比例为 BCA 试剂 A: BCA 试剂 B = 50: 1; 即每 50 μ L 的试剂 A 中加入 1 μ L 的试剂 B, 充分混匀即为 BCA 工作液。

BCA 试剂 B 液加入 A 液中后会出现浑浊, 为正常现象, 混匀后立即变澄清。

BCA 工作液装入密封容器内, 室温条件仅能稳定约 3h, 尽快进行检测。

三、检测方法

1. 比色皿检测法

1) 取 100 μ L 标准品和待测样品取加入到反应管中。

2) 每管加入 2.0mL BCA 工作液, 混匀。37°C 孵育 30min。

3) 冷却到室温。使用分光光度计检测 562nm 波长出吸光度, 以装满水的比色皿对仪器校零。在 10 分钟内对所有样品读数 (常温下 BCA 反应仍在进行, 尽快检测以减少误差)。

4) 根据 BSA 标准品的吸光度, 绘制标准曲线 (X-最终的 OD562nm; Y-蛋白浓度 μ g/ μ L)。依据标准曲线和样品的稀释倍数计算样品蛋白浓度。

2. 微孔板检测方法

1) 取 25 μ L 标准品和待测样品加入到微孔板中。

2) 每孔加入 200 μ L BCA 工作液, 可振荡 30s 充分混匀。盖上微孔板, 37°C 孵育 30min。

3) 在酶标仪上的 540-595nm 波长范围内检测吸光度, 其中 562nm 波长为最佳。

4) 根据 BSA 标准品的吸光度, 绘制标准曲线 (X-最终的 OD562nm; Y-蛋白浓度 μ g/ μ L)。依据标准曲线和样品的稀释倍数计算样品蛋白浓度。

注意事项

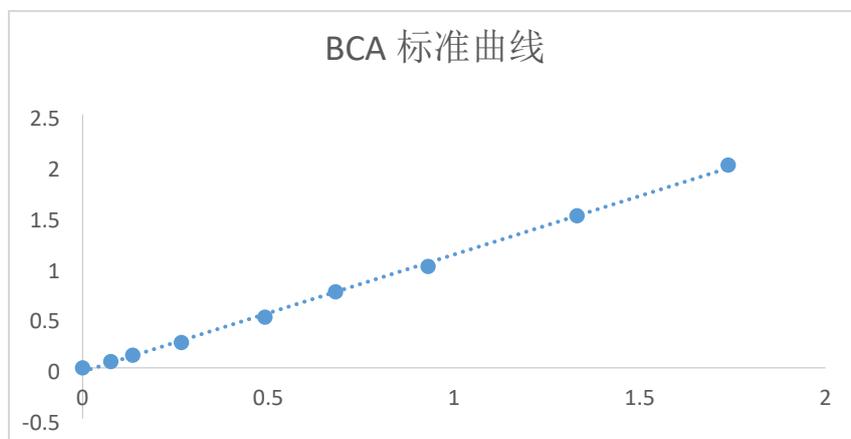
- 本实验需可测定波长为 540-595nm 之间的分光光度计一台或酶标仪一台, 可检测 562nm 波长的最佳。
- BCA 法测定蛋白浓度时, OD 值会随着时间的延长不断加深。因此所有样品测定需在 10 分钟内完成, 否则会影响蛋白定量的准确度。
- 绘制标准曲线建议使用去除背景值后的吸光值读数。
- 由于操作误差导致标准品读数严重偏离线性曲线的个别读数可舍去。
- 未知样品浓度可以从标准曲线方程中计算得出, 实际浓度需要乘以样品的稀释倍数。
- 如果得到的蛋白浓度超过检测最大值, 应当重新稀释样品后再次测定。

标准曲线示例

标准样本浓度 (μ g/ μ L)	检测吸光度	矫正吸光度
2	1.899	1.738
1.5	1.492	1.331
1.0	1.091	0.930
0.75	0.842	0.681
0.5	0.652	0.491
0.25	0.427	0.266
0.125	0.296	0.135



0.0625	0.237	0.076
0	0.161	0



附表：干扰物

化合物	耐受浓度	化合物	耐受浓度
缓冲液		去垢剂和变性剂	
乙酸盐	0.2M	吐温-20	2%
甘氨酸	1M	NP-40	2%
HEPES	0.1M	SDS	4%
MES	50mM	Triton X-100	2%
PIPES	50mM	糖类	
Tris	0.1M	葡萄糖	10mM
盐类		蔗糖	1M
NaCl	1M	螯合剂	
尿素	3M	EDTA	10mM
极性化合物		还原剂	
DMSO	5%	DTT	1mM

