

BCA 蛋白定量试剂盒说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

目前世界上最常用的蛋白浓度检测方法是：BCA 蛋白定量试剂盒(BCA Protein Assay Kit)和 Bradford 蛋白定量试剂盒(Bradford Protein Assay Kit)。BCA 法与传统方法相比更简单、更稳定、更灵敏度。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 SDS、Triton X-100、Tween 20、Tween 80 具有很好的兼容性,但 BCA 法测定蛋白浓度易受螯合剂、高浓度的还原剂等的影响，在 BCA 法测定蛋白浓度前应尽量使：EDTA 浓度 $\leq$ 10mM，DTT 浓度 $\leq$ 1mM，2-ME $\leq$ 0.01%。

BCA Protein Assay Kit 在 50~1000 μ g/ml 浓度范围内有较好的线性关系，其最小检出量为 25 μ g/ml。本试剂盒仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

产品名称	规格	保存条件	说明书	有效期
BCA 蛋白定量试剂盒	250T/500T/2500T	-20℃	1 份	1 年
试剂(A): BCA 试剂 A	50ml/100ml/500ml	RT 避光	1 份	1 年
试剂(B): BCA 试剂 B	1.5ml/3ml/15ml	RT	1 份	1 年
试剂(C): 蛋白标准(BSA)	20mg/20mg/20mg	RT	1 份	1 年
试剂(D): 蛋白标准配制液	5ml/10ml/10ml	RT	1 份	1 年

自备材料：

- 1、酶标仪或分光光度计
- 2、96 孔板或 EP 管
- 3、恒温箱或水浴锅

操作步骤(仅供参考)：

- 1、取 1ml 蛋白标准配制液完全加入到含有 20mg 的蛋白标准(BSA)中，充分溶解后配制成 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℃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 或所需浓度。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什么样的稀释液中，一般可用 0.9%NaCl 或 PBS 作为溶解 BSA 稀释液，稀释后的 500 μ g/ml 蛋白标准溶液也应-20℃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 5ml BCA 试剂 A 和 0.1ml BCA 试剂 B, 配制成 5.1ml BCA 工作液, BCA 工作液室温 24 小时内稳定。

4、将 500 $\mu\text{g/ml}$ 蛋白标准溶液按 0、1、2、4、8、12、16、20 μl 加到 96 孔板或 EP 管中, 加稀释液补足至 20 μl , 其蛋白标准浓度依次为 0、25、50、100、200、300、400、500 $\mu\text{g/ml}$ 。

5、加 20 μl 待测蛋白到 96 孔板或 EP 管中, 如果样本不足 20 μl , 用稀释液补足至 20 μl 。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 μl 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 μl 稀释液, 以减少不同溶液的差异。

6、向各孔或 EP 管加入 200 μl 配制好的 BCA 工作液, 37°C 孵育 20~30min。

7、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 管吸光度减去未加 500 $\mu\text{g/ml}$ 蛋白标准溶液的吸光度, 以求得的差值为纵坐标: 以标准孔或 EP 管中蛋白浓度($\mu\text{g/ml}$)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°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什么样的稀释液中, 否则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°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、BCA 法检测时, 待测样本中不应含有 EGTA, 否则影响检测结果。

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。

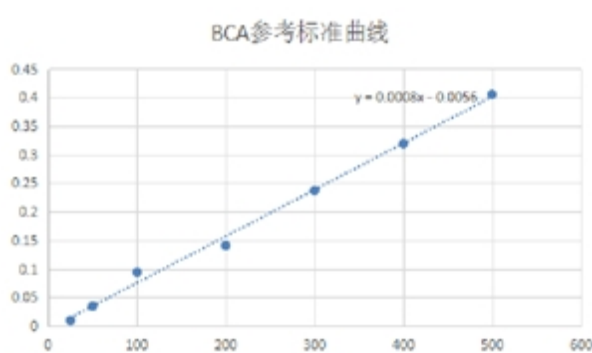
7、如果没酶标仪, 也可用普通分光光度计测定, 但应考虑根据比色皿的最小测定体积, 应按比例适当加大 BCA 工作液的用量使总体积不小于最小检测体积, 样品和标准品的用量亦相应按比例放大; 使用分光光度计测定蛋白浓度时, 可以测定的样品数量可能会显著减少, 建议把系列标准品用量增加至 100 μl , BCA 工作液用量增加至 1ml。

8、为了加快 BCA 法测定蛋白浓度的速度可以适当加热, 但是切勿过热, 否则易失效。

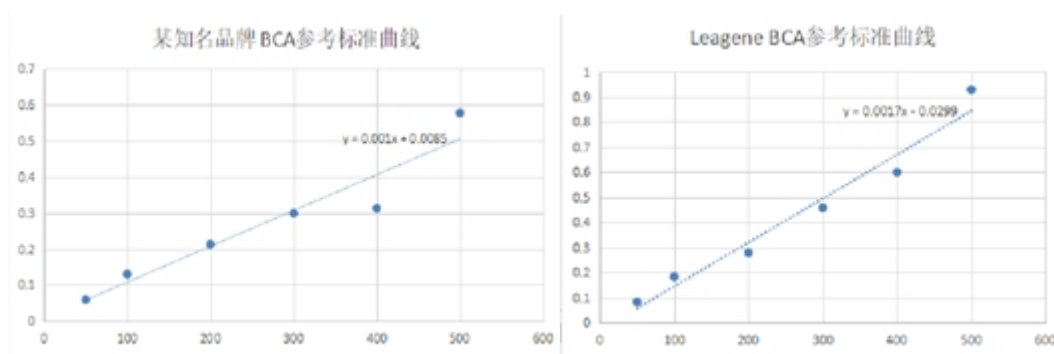
附录 1: 标准曲线制作: 在室温条件下按说明书操作, 对系列标准进行吸光度的测定, 其数值及标准曲线如下(仅供参考), 我们建议采用 50、100、200、300、400、500 $\mu\text{g/ml}$ 的蛋白标准绘制标准曲线(标准品浓度过高或过低都有可能影响标准曲线的准确性):

蛋白标准(μg/ml)	25	50	100	200	300	400	500
吸光度	0.010	0.035	0.094	0.141	0.237	0.319	0.405

注意：对于 10-50 μg/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 PT0006。



附录 2：与国内知名品牌产品进行对比实验，在室温相同条件下按说明书操作，对系列标准进行吸光度的测定，采用 50、100、200、300、400、500 μg/ml 的蛋白标准绘制标准曲线，结果显示 BCA 试剂盒斜率优于某知名品牌 BCA 试剂盒，其数值及标准曲线如下(仅供参考)：



相关产品：

溴酚蓝水溶液 (2%)

一步法凝胶制备试剂盒 (10%)

一步法凝胶制备试剂盒 (12%)

一步法凝胶制备试剂盒 (15%)

