

## BCA Protein Assay Kit

### BCA 蛋白定量/浓度测定试剂盒

产品编号: MA0082 规格: 200T 500T 5000T

#### 产品内容:

产品组成	MA0082-1	MA0082-2	MA0082-3
	200T	500T	5000T
BCA 试剂 A	40 ml	100 ml	500 ml×2
BCA 试剂 B	1.2 ml	3 ml	30 ml
蛋白标准(BSA)	20 mg	50 mg	100 mg×5
蛋白标准配制液	1.0 ml	1.0 ml	5.0 ml

#### 保存方法:

BCA 试剂 A、试剂 B 和蛋白标准配制液常温保存。蛋白标准(BSA)请于 2-8℃ 保存，配制成溶液后-20℃ 保存。

#### 产品简介:

Bicinchoninic acid (BCA)法是近来广为应用的蛋白定量方法。其原理与 Lowery 法蛋白定量相似，即在碱性环境下蛋白质与  $\text{Cu}^{2+}$  络合并将  $\text{Cu}^{2+}$  还原成  $\text{Cu}^{1+}$ 。BCA 与  $\text{Cu}^{1+}$  结合形成稳定的紫蓝色复合物，在 562 nm 处有高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。与 Lowery 法相比，BCA 蛋白测定方法灵敏度高，操作简单，试剂及其形成的颜色复合物稳定性俱佳，并且受干扰物质影响小。与 Bradford 法相比，BCA 法的显著优点是不受去垢剂的影响。

BCA 法在 50~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  浓度范围内有较好的线性关系，其最小检出量为 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

## 使用说明:

## 1. 蛋白标准溶液制备

- a) 取出试剂盒中标签名为蛋白标准配制液和蛋白标准 (BSA) 的 1.5ml 可立式离心管, 从蛋白标准配制液内取出 1ml 液体, 加入到标签名为蛋白标准 (BSA) 的 1.5ml 可立式离心管中, 充分溶解。**注意: 不同规格产品中蛋白标准 (BSA) 试管内的 BSA 质量不同, 200T, 500T 和 5000T 三种规格产品的 BSA 质量分别是 20mg, 50mg 和 100mg, 同理配制成溶液后, 各规格产品的 BSA 浓度分别是 20mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 溶解后的蛋白标准溶液应在-20℃保存。**
- b) 将蛋白标准 BSA 溶液稀释成浓度为 2mg/ml 的蛋白标准 (BSA) 母液, 可参考下表进行稀释。注意在稀释时尽量保证蛋白标准溶液的稀释液与待检测蛋白样品的溶剂相同。

产品规格	稀释液体积 (μl)	蛋白标准液体积 (μl)	最终浓度 (mg/ml)
200T	900	100	2
500T	960	40	2
5000T	980	20	2

- c) 将上步骤制备的浓度为 2mg/ml 的蛋白标准 BSA 母液稀释到试管中, 同样注意稀释液尽量与待测蛋白样品的溶剂相同。可按照下表来稀释蛋白标准曲线, 稀释范围为 0.025mg/ml-2mg/ml, 表格内体积适用于 96 孔酶标板测定, 如使用分光光度计测定, 请按照实际需要按比例扩大溶液体积。

编号	稀释液体积 (μl)	蛋白标准溶液体积 (μl)	最终高浓度 (mg/ml)
A	0	从母液取 150	2
B	50	从母液取 150	1.5
C	150	从母液取 150	1
D	50	从 B 管取 50	0.75
E	150	从 C 管取 150	0.5
F	150	从 E 管取 150	0.25
G	150	从 F 管取 150	0.125
H	200	从 G 管取 50	0.025
I	200	0	0

## BCA 工作液配制

- a) 计算实验所需工作液浓度，使用酶标仪检测时，每个检测孔所需工作液体积为 200 $\mu$ l，统计蛋白标准样品和待检测蛋白样品的数量（注意平行检测所需孔数量），然后总数量乘以 200，就是所需工作液的总体积（单位： $\mu$ l）。
- b) BCA 工作液配制是按照试剂（A）和试剂（B）体积比 50:1 的比例，即取 50 份试剂（A）和 1 份试剂（B）。两种试剂混合充分混匀，BCA 工作液室温 24 小时内稳定。例如：如果计划要配制 5.1ml BCA 工作液，需要取 5ml BCA 试剂（A）和 0.1ml BCA 试剂（B）。

## 2. 蛋白标准和蛋白样品浓度测定

- a) 取 20 $\mu$ l 上一步骤已稀释好的不同浓度蛋白标准溶液和待测蛋白样品依次加入到 96 孔酶标板中。注意如果蛋白样品浓度过大，需用同蛋白标准稀释液相同的溶液稀释蛋白样品。
- b) 每孔再加入 200 $\mu$ l BCA 工作液，使用酶标仪震板功能震荡 30s，也可用手轻弹酶标板使溶液混匀。在 37 $^{\circ}$ C 放置 30min。
- c) 使用酶标仪测定 562nm 的吸光值。以蛋白标准的浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，注意吸光值应减去空白对照的吸光值，绘制标准曲线，得出线性公式及  $R^2$  值。
- d) 按照上一步骤所得公式，根据所测得的待测蛋白样品吸光值，计算对应蛋白样品浓度。
- e) 如使用分光光度计测定，可根据实际需要扩大溶液体积。因为 BCA 检测结果是动态的，吸光值一直在增加，分光光度计测定需要时间较长，注意将检测时间控制在 10 分钟以内。

## 注意事项：

1. BCA 蛋白定量试剂盒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 都具有非常好的兼容性。但 BCA 法测定蛋白浓度易受金属螯合剂、高浓度的还原剂影响。在 BCA 法测定蛋白浓度前，请保证 EDTA 浓度 $\leq$ 10mM；DTT 浓度 $\leq$ 1mM，2-ME $\leq$ 0.01%。
2. 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，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。
3. 建议每次测定时都做标准曲线。因为 BCA 法测定时颜色会随着时间的延长不断加深，并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，否则如需精确测定宜每次都做标准曲线。

4. 试剂在低温条件或长期保存出现沉淀时，可搅拌或 37°C 温育使其溶解，如发现细菌污染则应丢弃。
5. 当溶液 A、B 混合时可能会有浑浊，但混匀后就会消失，BCA 工作液建议现配现用。
6. 样品检测后的 A562 值应在标准曲线范围之内，若超过此范围则需将样品酌情稀释后重新测定。
7. 如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定，但测定时，需根据比色皿考虑最小检测体积。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，每个试剂盒可以测定的样品数量可能会显著减少。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
9. 考虑损耗我们蛋白标准配制液会多给一些，配置时请按说明书操作。