



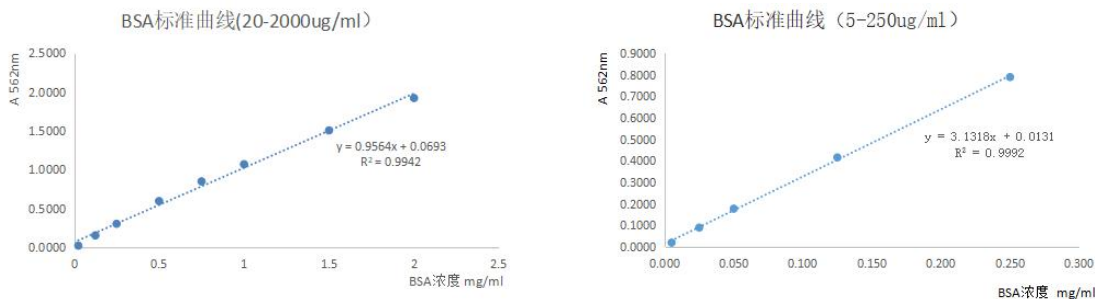
BCA Protein Assay Kit

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:

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

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°C, 30 min

增强方案: 60°C, 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°C 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°C 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

