

# BCA 蛋白浓度测定试剂盒

## 一、规格：

编号	组分	产品编号/规格			储存
		500T	2500T	5000T	
BCA-A	BCA 试剂 A	100mL	500mL	2×500mL	4℃
BCA-B	BCA 试剂 B	3mL	15mL	2×15mL	4℃
BCA-C	蛋白标准品 (BSA)	2×1mL (5mg/mL)	10×1mL (5mg/mL)	10×1mL (5mg/mL)	-20℃
BCA-D	PBS 溶液	10mL	50mL	100mL	4℃

## 二、储存/运输：

冰袋运输。试剂盒中 A、B 液室温或 4℃ 保存；蛋白标准品 (BSA) 置于 -20℃ 保存，有效期 12 个月。

## 三、产品描述：

BCA (Bicinchoninic acid) 法是目前应用比较广泛的蛋白质浓度测定方法。基于双缩脲反应，即在碱性环境下蛋白质将  $\text{Cu}^{2+}$  还原成  $\text{Cu}^{+}$ ，产生一种紫蓝色复合物，在 562nm 处有高的吸光值，该反应产物的量与蛋白质浓度成正比。BCA 蛋白浓度测定法实现了蛋白质浓度测定的简便、灵敏、快速和稳定性。试剂盒中提供的蛋白标准品为用户制作标准曲线提供了便利。该 BCA 蛋白浓度测定试剂盒可用于比色皿法检测，也可用于微孔板法检测。前者虽需较大量 (100  $\mu\text{L}$ ) 的蛋白样品，但由于其在检测中使用蛋白样品与 BCA 工作液的比率为 1:20 (v/v)，从而降低干扰物质带来的影响。后者操作简单方便，仅需少量 (10-25  $\mu\text{L}$ ) 的蛋白样品。不过，由于其在检测中使用蛋白样品与 BCA 工作液的比率为 1:8 (v/v)，某种程度上限制于干扰物质的承受浓度以及降低最低检测水平。

## 四、产品特点

- 1) 灵敏度高，最小检测蛋白量可达 0.2  $\mu\text{g}$ ，检测浓度下限达到 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (在 20~1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内有较好的线性关系)。
- 2) 速度快，比一般的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒显色所用时间短。比传统的 Lowry 法检测速度约快 4 倍。
- 3) 线性范围广，20-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内有较好的线性范围。
- 4) 不受大部分样品中的化学物质的影响，BCA 法测定蛋白浓度的最大优点是蛋白浓度的测定可以耐受高浓度的去垢剂，可以兼容样品中高达 5% 的 SDS；5% 的 Triton X-100；5% 的 Tween 20, 60, 80。但受整合剂和略高浓度的还原剂的影响，需确保 EDTA 低于 10mM，无 EGTA，二硫苏糖醇低于 1mM； $\beta$ -巯基乙醇低于 0.01%。详情见 7 的附表 1。
- 5) Bradford 法与 BCA 法的对比

方法	Bradford 法	BCA 法
灵敏度	1~5 $\mu\text{g}$	0.5~20 $\mu\text{g}$
时间	5~15 min	40~60 min
波长	595 nm	562 nm
检测不同类别蛋白质	变异系数较高	变异系数较低
吸光稳定性	1 h 内稳定	随时间变化

## 五、操作说明

**BCA 工作液配置：**

将试剂 A 和试剂 B 按照体积比 50:1 比例混合配成 BCA 工作液。取 50mL 试剂 A 与 1mL 试剂 B 混合，配成 51mL BCA 工作液。两者混合时会有沉淀形成，彻底混匀后沉淀消失。

**微孔板测定程序：（工作范围 20-2000  $\mu\text{g/ml}$ ）**

1. 蛋白标准品配制：室温完全溶解蛋白标准品，取 20 $\mu\text{l}$  5mg/ml BSA 蛋白标准溶液用 PBS 溶液稀释至 100 $\mu\text{l}$  使其终浓度为 1.0 mg/ml。
2. 按照下表配制 BSA 标准测定溶液：

编号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
	1 mg/ml BSA 标准溶液 $\mu\text{L}$							5 mg/ml BSA 标准溶液 $\mu\text{L}$	
BSA 标准溶液 $\mu\text{l}$	0	0.5	2.5	5.0	10	15	20	6	8
PBS 溶液 $\mu\text{l}$	20	19.5	17.5	15	10	5	0	14	12
BSA 终浓度 $\mu\text{g/ml}$	0	25	125	250	500	750	1000	1500	2000
总体积 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$								

3. 将适当体积的待测样品加入到微孔板中，并用 PBS 补足到 20  $\mu\text{l}$
4. 向微孔板中加入 200  $\mu\text{L}$  BCA 工作液混匀，37  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 分钟；注：也可以室温放置 2 小时，或 60  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 分钟。BCA 法测定蛋白浓度时，颜色会随着时间的延长不断加深，并且显色反应会因温度升高而加快。如果浓度较低，适合在较高温度孵育，或适当延长孵育时间。
5. 测定 562 nm 处的吸光值，并记录读数；以不含 BSA 的样品的光吸收值作为空白对照。
6. 以 A562 为纵坐标，BSA 含量为横坐标，绘制标准曲线，计算样品中的蛋白浓度。如果蛋白浓度不在标准曲线范围内，请稀释样品后重新测定。

**试管测定程序：（工作范围 20-1000  $\mu\text{g/ml}$ ）**

1. 蛋白标准品配制：  
室温完全溶解蛋白标准品，取 150 $\mu\text{L}$  5mg/ml BSA 蛋白标准溶液，加入 600  $\mu\text{L}$  PBS 溶液稀释至 750 $\mu\text{l}$ ，使其终浓度为 1.0 mg/ml。
2. 按照下表配制 BSA 标准测定溶液：

编号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
	1 mg/ml BSA 标准溶液 $\mu\text{l}$							5 mg/ml BSA 标准溶液 $\mu\text{l}$	
BSA 标准溶液 $\mu\text{l}$	0	2.5	12.5	25	50	75	100	30	40
PBS 溶液 $\mu\text{l}$	100	97.5	87.5	75	50	25	0	70	60
BSA 终浓度 $\mu\text{g/ml}$	0	25	125	250	500	750	1000	1500	2000
总体积 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$								

3. 将适当体积的待测样品加入到试管中，并用 PBS 补足到 100  $\mu\text{l}$ ；
4. 向试管中加入 2ml BCA 工作液，混匀，37  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 分钟；
- 5、6 步骤同上。

**六、注意事项**

- 1) BCA 蛋白测定法测定时颜色会随着时间的延长不断加深，显色反应的速度和温度有关，需注意保持定时和定温，以确保精确定量。
- 2) 长期保存，若发现 BCA 试剂 A 或者试剂 B 有沉淀发生。请 37°C 温育并伴随搅拌促使其充分溶解。如发现细菌污染，则应丢弃。
- 3) 实验操作规范，提高上样量的精确度。
- 4) 每次测定都需做相应的标准曲线，因为显色反应与温度和时间的变化有关，精准蛋白定量宜每次都做标准曲线。
- 5) 本公司所有产品仅限用于研发，必须专业人员操作同时佩戴口罩/手套/实验服并遵守生物实验室安全操作规程！

### 七、样本数据：BCA 蛋白浓度测定的兼容性（附表 1）

名称及耐受浓度	名称及耐受浓度	名称及耐受浓度
Sodium bicarbonate 100mM	Acetonitrile 10%	Imidazole, pH7.0 50mM
Sodium phosphate 25mM	Ammonium sulfate 1.5mM	MES, pH6.1, 100mM
2-Mercaptoethanol 0.01%	Aprotinin 10mg/L	Methanol, 10%
Glycerol (pure) 10%	Bicine, pH8.4 20mM	MOPS, pH7.2, 100mM
Glycine-HCl, pH2.8; 100mM	Bis-Tris, pH6.5 33mM	N-Acetylglucosamine (in PBS, pH7.2) 10mM
HEPES 100mM	Borate, pH8.5 50mM	Octyl $\beta$ -thioglucopyranoside 5%
Hydrochloric acid 100mM	Brij-35 5%	PIPES, pH6.8, 100mM
Leupeptin 10mg/L	Brij-52 1%	PMSF 1mM
Nickel chloride (in TBS, pH8.0) 10mM	Brij-56, Brij-58 1%	PopCulture Reagent No interference (undiluted)
Nonidet P-40 (NP-40) 5% (w/v)	BugBuster protein Extraction Reagent No interference undiluted	Reportasol Extraction Buffer No interference (undiluted)
Octyl $\beta$ -glucoside 5% (w/v)	Calcium chloride(in TBS, pH8.0) 10mM	Sodium chloride 1M
Potassium thiocyanate 3.0M	Cellytic B Reagent No interference undiluted	Sodium citrate(pH4.8 or pH6.4) 200mM
SDS 5%	Cesium bicarbonate 100mM	Sodium ortho-vanadate in PBS 1mM pH7.2
Sodium acetate, pH4.8 200mM	CHAPS 5%	Span 20, 1%
Sodium azide 0.20%	Cobalt chloride (in TBS, pH8.0) 0.8mM	TBS (0.15M NaCl, 0.1M Tris-HCl, pH8.0, No interference
Sodium hydroxide 100mM	CytoBuster Protein Extraction Reagent No interference	Thimerosal, 0.01%
Sucrose 40%	Deoxycholic acid 5%	TLCK, 0.1mg/L
Triton X-100 5%	Dithioerythritol (DTE) 1mM	TPCK, 0.1mg/L

1%的 Triton X-114, X-305, X-405	Dithiothreitol (DTT) 1mM	Tricine, pH8.0 , 25mM
5%的 Tween-20, 60, 80	DMF 10%	Triethanolamine, pH7.8, 25mM
Zwittergent 1%	DMSO 10%	Tris, 250mM
ACES, pH7.8 25mM	EDTA 10mM	Tris(hydroxypropyl)phosphine, 1mM
Acetone 10%	EPPS, pH8.0, 100mM	Urea, 3M
Zinc chloride(in TBS, pH8.0) 10mM	Guanidine-HCl, 4M	