

BCA Protein Quantification Kit

BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)

产品简介

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 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ ，产生一种紫蓝色复合物，在 562 nm 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 μL) 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 μL) 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)，某种程度上限制干扰物质的承受浓度以及降低最低检测水平。我司提供三种规格的 BCA 蛋白浓度检测试剂盒，比色皿法分别可做 50 次，250 次，500 次。酶标法分别可做 500 次，2500 次，以及 5000 次。

产品特点

1. 灵敏度高，最小检测蛋白量可达 0.2 μg ，检测浓度下限达到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
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，20-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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，详情见附表 1。

产品信息

货号	20201ES56/20201ES76/20201ES86/20201ES90
规格	60T(12ml)/ 500T(100ml)/ 2500T(500ml)/ 5000T(1000ml)

组分信息信息

类别	组分编号	组分名称	20201ES56 (60 T)	20201ES76 (500 T)	20201ES86 (2500 T)	20201ES90 (5000 T)
Part I	20201-A	BCA 试剂 A	12 mL	100 mL	500 mL	2×500 mL
	20201-B	BCA 试剂 B	360 μL	3 mL	15 mL	2×15 mL
Part II	20201-C	蛋白标准品 (BSA)	600 μL (2 mg/mL)	5×1 mL (2 mg/mL)	10×1 mL (2 mg/mL)	10×2 mL (2mg/mL)

储存条件

Part I 中的 BCA 试剂 A、BCA 试剂 B 室温保存；Part II 中的蛋白标准品 (BSA) 长时间不用，可置于 -25~-15°C 保存，有效期 1 年。

使用说明

1. 配制标准品和工作液

1.1 配制 BSA 标准品体系

标准品稀释液为蛋白样品的溶解液，原则上蛋白样品在什么溶液中，标准品也宜用什么溶液稀释。但也可用 0.9% 的 NaCl 或 1×PBS 进行稀释。BSA 标准品体系配制可参考表 1 和表 2。

表 1 BSA 标准品体系配制（比色皿检测，线性范围 20-2000 μg/mL）*

Vial	稀释液体积 (μL)	2mg/mL BSA 体积 (μL)	BSA 终浓度 (μg/mL)
A	0	100	2000
B	25	75	1500
C	50	50	1000
D	125	75	750
E	150	50	500
F	350	50	250
G	375	25	125
H	395	5	25
I	400	0	0=Blank

*如用比色皿检测，每管需加 100 μL 标准品，按 3 个重复计算，每个浓度至少需配制 300 μL。

表 2 BSA 标准品体系配制（微孔板检测，线性范围 20-2000 μg/mL）*

Vial	稀释液体积 (μL)	2mg/mL BSA 体积 (μL)	BSA 终浓度 (μg/mL)
A	0	30	2000
B	9	21	1400
C	12	18	1200
D	15	15	1000
E	21	9	600
F	24	6	400
G	27	3	200
H	29	1	40
I	30	0	0=Blank

1.2 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

【注】：比色皿检测时每个样品加 2.0 mL BCA 工作液，微孔板检测每个样品加 200 μL BCA 工作液。

2) 配制 BCA 工作液：50 体积的 BCA 试剂 A 中加入 1 体积的 BCA 试剂 B (A:B=50:1)，充分混匀。

【注】：BCA 试剂 B 加入 BCA 试剂 A 中后，迅速浑浊，通过混匀后立即变澄清。BCA 工作液装入密封容器内，室温条件 24 h 稳定。

2. 检测方法

2.1 比色皿检测方法（样品：BCA 工作液=1:20）

1) 各取 100 μL 标准品和待测样品加入到反应管中。

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

【注】：也可室温孵育 2 h，或者 60°C 孵育 30 min。BCA 检测蛋白浓度，延长孵育时间会加深颜色反应。升高温度会加快显色反应。但是温度升高和时间延长会降低检测下限，以及降低工作线性范围。若蛋白浓度很低，可在较高温度孵育或者

适当延长孵育时间。

3) 冷却到室温。分光光度计检测，设定波长为 562 nm。用装满水的比色皿对仪器校零。在 10 min 内对所有样品读数。

【注】：由于 BCA 反应达不到真正的反应终点，即使温度降低至室温显色反应也会继续。但是，由于室温下显色比率相当低，因此若是 10 min 内能对所有样本进行 562 nm 吸光度的测试，不会导致明显错误。

4) 根据 BSA 标准品的吸光度（减去标准品中空白孔的 OD 值即最终的读数），绘制标准曲线（X-蛋白浓度 ug/mL；Y-最终的 OD_{562nm}）。依据标准曲线和样品的稀释倍数计算样品蛋白浓度。

2.2 微孔板检测方法（样品：BCA 工作液=1:8）

1) 各取 25 μL 标准品和待测样品加入到微孔板中。

【注】：样品与工作液比例为 1:8，若样品有限，可使用 10 μL 标准品和待检测样品进行检测（即 1:20），这时试剂盒的检测范围为 125-2000μg/mL。

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

3) 冷却到室温，在酶标仪上的 540-595 nm 波长范围处检测吸光度，其中 562 nm 波长为最佳。

【注】：a) 由于酶标板的光径比比色皿短，使得酶标板检测需要更好的样品：BCA 工作比率来获得相同的检测灵敏度。若使用高于 562nm 的检测波长，建议延长孵育时间到 2 h。b) 延长孵育时间或者提高样品：BCA 工作比会增高每个孔的 OD_{562nm} 净值，并且降低检测下限和工作线性范围。

4) 根据 BSA 标准品的吸光度（减去标准品中空白孔的 OD 值即最终的读数），绘制标准曲线（X-蛋白浓度 ug/mL；Y-最终的 OD_{562nm}）。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

1. 使用 BCA 蛋白测定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，因此需注意保持定时和定温，以确保精确定量。
2. 低温或长期保存，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，避免对实验结果造成影响。
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，精准的蛋白定量宜每次都做标准曲线。
5. 本产品仅作科研用途！
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

附表：BCA 蛋白浓度测定的兼容性

名称	耐受浓度
Sodium bicarbonate	100 mM
Sodium phosphate	25 mM
2-Mercaptoethanol	0.01%
Glycercol (pure)	10%
Glycine-HCl, pH2.8	100 mM
HEPES	100 mM
Hydrochloric acid	100 mM
Leupeptin	10 mg/L
Nickel chloride (in TBS, pH8.0)	10 mM
Nonidet P-40 (NP-40)	5% (w/v)

Octyl β -glucoside	5% (w/v)
Potassium thiocyanate	3.0 M
SDS	5%
Sodium acetate, pH4.8	200 mM
Sodium azide	0.20%
Sodium hydroxide	100 mM
Sucrose	40%
Triton X-100	5%
Triton X-114, X-305,X-405	1%
Tween-20, Tween-60, Tween-80	5%
Zwittergent	1%
ACES, pH7.8	25 mM
Acetone	10%
Acetonitrile	10%
Ammonium sulfate	1.5 mM
Aprotinin	10 mg/L
Bicine, pH8.4	20 mM
Bis-Tris, pH6.5	33 mM
Borate, pH8.5	50 mM
Brij-35	5%
Brij-52	1%
Brij-56, Brij-58	1%
BugBuster protein Extraction Reagent (Cat. No. 70584)	nointerference (undiluted)
Calcium chloride (in TBS, pH8.0)	10 mM
CellLytic B Reagent	nointerference (undiluted)
Cesium bicarbonate	100 mM
CHAPS	5%
Cobalt chloride (in TBS, pH8.0)	0.8 mM
CytoBuster Protein Extraction Reagent (Cat. No. 71009)	nointerference (undiluted)
Deoxycholic acid	5%
Dithioerythritol (DTE)	1 mM
Dithiothreitol (DTT)	1 mM
DMF	10%
DMSO	10%
EDTA	10 mM
EPPS, pH8.0	100 mM
Ethanol	10%
Ferric chloride (in TBS, pH8.0)	10 mM
Glucose	10 mM

Glycerol	10%
Guanidine-HCl	4 M
Imidazole, pH7.0	50 mM
MES, PH6.1	100 mM
Methanol	10%
MOPS, pH7.2	100 mM
N-Acetylglucosamine (10mM) in PBS, pH7.2	10 mM
Octyl β -thioglucopyranoside	5%
PIPES, pH6.8	100 mM
PMSF	1 mM
PopCulture Reagent (Cat. No. 71092)	nointerference (undiluted)
Reportasol Extraction Buffer (Cat. No. 70909)	nointerference (undiluted)
Sodium chloride	1 M
Sodium citrate, pH4.8 or pH6.4	200 mM
Sodium ortho-vanadate in PBS, pH7.2	1 mM
Span 20	1%
TBS (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH8.0)	nointerference (undiluted)
Thimerosal	0.01%
TLCK	0.1 mg/L
TPCK	0.1 mg/L
Tricine, pH8.0	25 mM
Triethanolamine, pH7.8	25 mM
Tris	250 mM
Tris (hydroxypropyl) phosphine (THP)	1 mM
Urea	3 M
Zinc chloride (in TBS, pH8.0)	10 mM