

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

| 类别 | 组分编号 | 组分名称 | 20201ES76 (500 T) | 20201ES86 (2500 T) | 20201ES90 (5000 T) | 储存 |
|---------|---------|-------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| Part I | 20201-A | BCA 试剂 A | 100 mL | 500 mL | 2×500 mL | 室温 |
| | 20201-B | BCA 试剂 B | 3 mL | 15 mL | 2×15 mL | 室温 |
| Part II | 20201-C | 蛋白标准品 (BSA) | 5×1 mL (2 mg/mL) | 10×1 mL (2 mg/mL) | 10×2 mL (2mg/mL) | -25~-15°C |

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) *

| Vial | 稀释液体积 (μL) | 2mg/mL BSA 体积 (μL) | BSA 终浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
|------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|

| | | | |
|---|-----|-----|---------|
| 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）*

| Vial | 稀释液体积 (μL) | 2mg/mL BSA 体积 (μL) | BSA 终浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| 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 | 49 | 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) \times 重复数 \times 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 内能对所有的样本进行 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；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 |