



## BCA 蛋白浓度测定试剂盒

**产品货号:** AR0146

**产品名称:** BCA 蛋白浓度测定试剂盒

**产品批号:** 见外包装标签

**产品组成:**

A 液	100ml
B 液	5ml
蛋白标准品	20ml (2mg/ml)

**产品保存:** 室温保存, 一年有效。

**产品描述:** 应用试管法可以测量 50 管, 微孔板法可以测量 500 孔。

### 产品说明:

碱性条件下, 蛋白将  $\text{Cu}^{2+}$  还原为  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^+$  与 BCA 试剂形成紫颜色的络合物, 吸光度强度与蛋白浓度成正比。测定其在 562nm 处的吸收值, 并与标准曲线对比, 即可计算待测蛋白的浓度。

- 1.准确灵敏, 线性范围广, BCA 试剂的蛋白质测定范围是 20—2000ug/ml。
- 2.快速: 45 分钟内完成测定。
- 3.经济实用: 在微孔板中进行测定, 可大大节约样品和试剂用量。
- 4.不受样品中离子型和非离子型去污剂影响。
- 5.检测不同蛋白质分子的变异系数远小于考马斯亮蓝法蛋白定量。

### 注意事项:

- 1.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。
- 2.不受大部分样品中的化学物质的影响, 可以兼容样品中 5%的 SDS, 5%的 Triton X-100, 5%的 Tween 20, 60, 80 等。(详情见附录)
- 3.每次测量蛋白浓度均应做标准曲线。
- 4.当试剂 A 和 B 混合时会有浑浊, 混匀后就会消失。
- 5.需准备 37°C水浴或温箱、酶标仪或普通分光光度计, 测定波长为 540-595nm 之间, 562nm 最佳。酶标仪需与 96 孔酶标板配套使用。使用分光光度计测定蛋白浓度时, 试剂盒测定的样品数量会因此而减少。使用温箱孵育时, 应注意防止因水分蒸发影响检测结果。

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR DIAGNOSTIC AND CLINICAL USE.



6.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。

7.实验操作规范，提高上样量的精确度。

### 使用方法：

#### 一.配制 BSA 标准品

注：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 标准品配制可参照下表（微孔板检测，线性范围 20-2000 $\mu\text{g/ml}$ ）

管号	稀释液体积( $\mu\text{l}$ )	2mg/ml BSA 体积( $\mu\text{l}$ )	BSA 终浓度( $\mu\text{g/ml}$ )
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 (空白孔)

如用试管法检测，每管需加 100 $\mu\text{l}$  标准品，按 3 个重复计算，每个浓度至少需配制 300 $\mu\text{l}$ 。

#### 二.配制 BCA 工作液

A.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

**注意：**试管法检测时每个样品加 2.0ml BCA 工作液，微孔板检测每个样品加 200 $\mu\text{l}$  BCA 工作液。

B.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。

**注意：**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 24h 稳定。

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR DIAGNOSTIC AND CLINICAL USE.



### 三.试管法（样品：BCA 工作液=1:20）

1.各取 100 $\mu$ l 标准品和待测样品加入到反应管中。

2.每管加入 2.0ml BCA 工作液，混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

**注意：**也可室温孵育 2h，或者 60 $^{\circ}$ C 孵育 30min。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。

3.冷却到室温。在分光光度计上进行检测，设定波长为 562nm。用装满水的比色皿对仪器校零。然后在 10 分钟内对所有样品读数。

**注意：**由于 BCA 反应达不到真正的反应终点，即使温度降低至室温生色反应液会继续。但是，由于室温下生色比率相当低，因此若是 10min 内能对所有的样本进行 562nm 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<sub>562nm</sub>）。依据标准曲线和样品的稀释倍数计算样品蛋白浓度。

### 四.微孔板法（样品：BCA 工作液=1:8）

1.各取 25 $\mu$ l 标准品和待测样品加入到微孔板中。

**注意：**样品与工作液比例为 1:8，若样品有限，可使用 10 $\mu$ l 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 125-2000 $\mu$ g/ml。

2.每孔加入 200 $\mu$ l BCA 工作液，振荡 30s 充分混匀。盖上微孔板，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

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

**注意：**延长孵育时间或者提高（样品：BCA 工作液比）会增高每个孔的 OD<sub>562nm</sub> 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<sub>562nm</sub>）。依据标准曲线和样品的稀释倍数计算样品蛋白浓度。



附录：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, pH 2.8	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 $\beta$ -glucoside	5% (w/v)
Potassium thiocyanate	3.0 M
SDS	5%
Sodium acetate, pH 4.8	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, pH 7.8	25 mM
Acetone	10%
Acetonitrile	10%



Ammonium sulfate	1.5 mM
Aprotinin	10 mg/L
Bicine, pH 8.4	20 Mm
Bis-Tris, pH 6.5	33 mM
Borate, pH 8.5	50 mM
Brij-35	5%
Brij-52	1%
Brij-56, Brij-58	1%
BugBuster protein Extraction Reagent	no interference (undiluted)
Calcium chloride (in TBS, pH 8.0)	10 mM
CellLytic B Reagent	no interference (undiluted)
Cesium bicarbonate	100 mM
CHAPS	5%
Cobalt chloride (in TBS, pH 8.0)	0.8 mM
CytoBuster Protein Extraction Reagent	no interference (undiluted)
Deoxycholic acid	5%
Dithioerythritol (DTE)	1 mM
Dithiothreitol (DTT)	1 mM
DMF	10%
DMSO	10%
EDTA	10 mM
EPPS, pH 8.0	100 mM
Ethanol	10%
Ferric chloride (in TBS, pH 8.0)	10 mM
Glucose	10 mM
Glycerol	10%
Guanidine-HCl	4 M

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR DIAGNOSTIC AND CLINICAL USE.



Imidazole, pH 7.0	50 mM
MES, PH6.1	100mM
Methanol	10%
MOPS, pH7.2	100mM
N-Acetylglucosamine(10mM)in PBS, pH7.2	10mM
Octyl $\beta$ -thioglucopyranoside	5%
PIPES, pH6.8	100mM
PMSF	1 mM
PopCulture Reagent	no interference (undiluted)
Reportasol Extraction Buffer	no interference (undiluted)
Sodium chloride	1 M
Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4	200 mM
Sodium orthovanadate in PBS, pH7.2	1mM
Span 20	1%
TBS (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0)	no interference (undiluted)
Thimerosal	0.01%
TLCK	0.1mg/L
TPCK	0.1mg/L
Tricine, pH 8.0	25 mM
Triethanolamine, pH 7.8	25 mM
Tris	250 mM
Tris(hydroxypropyl)phosphine (THP)	1 mM
Urea	3M
Zinc chloride (in TBS, pH 8.0)	10 mM