



## BCA 蛋白浓度测定试剂盒

**产品货号:** AR1189

**产品名称:** BCA 蛋白浓度测定试剂盒

**产品批号:** 见外包装标签

**产品组份:**

A 液	50ml
B 液	2.5ml
蛋白标准品	10ml (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 25 管, 微孔板法可以测量 250 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。
- 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

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



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。

#### 三.试管法（样品：BCA 工作液=1:20）

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



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	100mM



Sodium phosphate	25mM
2-Mercaptoethanol	0.01%
Glycercol (pure)	10%
Glycine-HCl, pH 2.8	100mM
HEPES	100mM
Hydrochloric acid	100mM
Leupeptin	10mg/L
Nickel chloride (in TBS, pH8.0)	10mM
Nonidet P-40 (NP-40)	5% (w/v)
Octyl $\beta$ -glucoside	5% (w/v)
Potassium thiocyanate	3.0M
SDS	5%
Sodium acetate, pH 4.8	200mM
Sodium azide	0.20%
Sodium hydroxide	100mM
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	1.5mM
Aprotinin	10mg/L
Bicine, pH 8.4	20Mm
Bis-Tris, pH 6.5	33mM



Borate, pH 8.5	50mM
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)	10mM
CelLytic B Reagent	no interference (undiluted)
Cesium bicarbonate	100mM
CHAPS	5%
Cobalt chloride (in TBS, pH 8.0)	0.8mM
CytoBuster Protein Extraction Reagent	no interference (undiluted)
Deoxycholic acid	5%
Dithioerythritol (DTE)	1mM
Dithiothreitol (DTT)	1mM
DMF	10%
DMSO	10%
EDTA	10mM
EPPS, pH 8.0	100mM
Ethanol	10%
Ferric chloride (in TBS, pH 8.0)	10mM
Glucose	10mM
Glycerol	10%
Guanidine-HCl	4 M
Imidazole, pH 7.0	50mM
MES, PH6.1	100mM
Methanol	10%
MOPS, pH7.2	100mM



N-Acetylglucosamine(10mM)in PBS, pH7.2	10mM
Octyl β-thioglucopyranoside	5%
PIPES, pH6.8	100mM
PMSF	1mM
PopCulture Reagent	no interference (undiluted)
Reportasol Extraction Buffer	no interference (undiluted)
Sodium chloride	1M
Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4	200mM
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	25mM
Triethanolamine, pH 7.8	25mM
Tris	250mM
Tris(hydroxypropyl)phosphine (THP)	1mM
Urea	3M
Zinc chloride (in TBS, pH 8.0)	10mM