



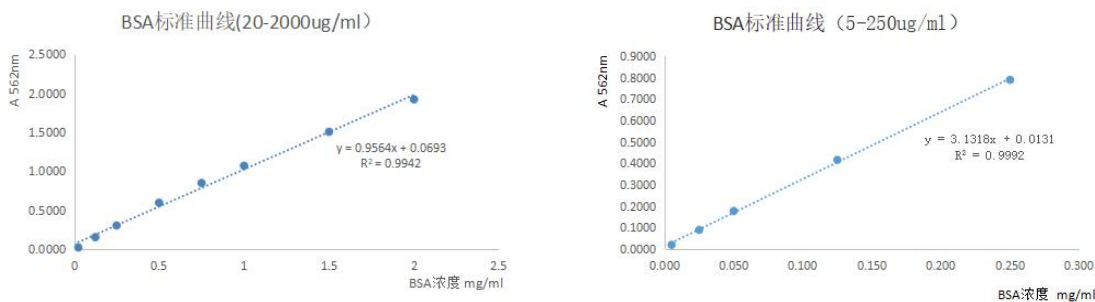
BCA Protein Assay Kit

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 操作步骤.....	1
3. 常见问题及解决方法.....	2
4. 订购信息及相关产品.....	3

1. 产品介绍

BCA Protein Assay Kit 是目前世界上最常用的两种蛋白浓度检测方法之一。BCA 蛋白质定量包括两步反应：首先，二价铜离子(Cu²⁺)在碱性条件下被蛋白质的肽键还原成一价铜离子(Cu⁺)；其次，两个分子的 BCA 络合一个一价铜离子(Cu⁺)，形成一种在 562nm 处有强吸收值的紫色复合物，而复合物的吸收值与蛋白的浓度在一定范围内呈线性相关（如图）。



使用 BCA 法进行蛋白质定量有以下特点：1. 不受蛋白种类的影响，在 20-2000 µg/ml 浓度范围内有较好的线性。2. 表面活性剂对浓度检测的干扰较小。但由于还原剂和螯合剂对反应有阻碍，因此本制品不适用于含有还原剂或者螯合剂的蛋白质样品的定量。

表 1 是试剂盒的基本组成，我们提供两种检测方案：试管和微孔板。试管方案所需样品量较大（0.1 ml），但样品和工作液的稀释比例为 1:20 (V/V)，所以干扰物的影响比较小；微孔板方案所需的工作液较少（200 µl），样品体积小（25 µl），但样品和工作液的稀释比例为 1:8 (V/V)，对干扰物的耐受较差。

表 1. BCA Protein Assay Kit 组成

试剂名称	250 次	1250 次
BCA Protein Assay Kit Reagent A	50 ml	250 ml
BCA Protein Assay Kit Reagent B	1 ml	5 ml
Bovine Serum Albumin	1 ml	5*1 ml
说明书	1 份	1 份

2. 操作步骤

2.1 BSA 标准品稀释梯度

按照表 2 制备一组蛋白质标准品。最好使用与待测样品相同的稀释液，每个稀释浓度的标准品的体积足够用于三次重复检测。

表 2. 稀释 Bovine Serum Albumin (BSA) 标准品

用于标准方案的稀释方法（检测范围=20-2000 µg/ml）			
编号	稀释液的体积 (µl)	BSA 的体积和来源 (µl)	BSA 终浓度 (µg/ml)
A	0	300 µl 原液	2000
B	125	375 µl 原液	1500
C	325	325 µl 原液	1000
D	175	175 µl B 稀释液	750
E	325	325 µl C 稀释液	500
F	325	325 µl E 稀释液	250
G	325	325 µl F 稀释液	125
H	400	100 µl G 稀释液	25
I	400	0	0=空白


用于试管增强方案的稀释方法 (检测范围=5-250 µg/ml)

编号	稀释液的体积 (µl)	BSA 的体积和来源 (µl)	BSA 终浓度 (µg/ml)
A	700	100 µl 原液	250
B	400	400 µl A 稀释液	125
C	450	300 µl B 稀释液	50
D	400	400 µl C 稀释液	25
E	400	100 µl D 稀释液	5
F	400	0	0

2.2 制备 BCA 工作液

2.2.1 使用下述公式来确定所需的工作液的总体积：

(标准品的个数+待测蛋白质样品的个数) × (实验重复次数) × (用于每个样品的工作液的体积) = 所需工作液总体积

2.2.2 将 50 份 BCA Protein Assay Kit Reagent A 与 1 份 BCA Protein Assay Kit Reagent B 混合 (A: B =50: 1)，制备工作液。

2.3 试管方案 (样品与工作液的比例=1: 20)

2.3.1 取各个稀释浓度的蛋白质标准品和待测蛋白质样品各 0.1 ml，加入到做好标记的试管中。

2.3.2 在每个试管中加入 2.0 ml 工作液，充分混合。

2.3.3 将试管密封，根据不同实验方案，选择相应的温度和时间进行孵育：

标准方案：37℃，30 min

增强方案：60℃，30 min

2.3.4 将所有试管冷却至室温。

2.3.5 将分光光度计波长设定在 562 nm，用 I 管空白标准品对仪器进行调零 (增强方案用 F 管空白标准品对仪器进行调零)，然后在 10 分钟内依次检测所有样品的吸光值。

2.3.6 将 BSA 标准品在 562 nm 处经过空白校正的吸光值对其浓度 (µg/ml) 作图，绘制标准曲线。使用该标准曲线来确定每个待测蛋白质样品的浓度。

2.4 微孔板方案 (样品与工作液比例=1: 8)

2.4.1 取各个稀释浓度的蛋白质标准品和待测蛋白质样品各 25 µl，加入到微孔板中。

2.4.2 在每一个孔中加入 200 µl 工作液，并在振荡器上震荡 30 秒，使其充分混合。

2.4.3 将微孔板密封，在 37℃ 孵育 30 分钟。

2.4.4 将微孔板冷却至室温，使用酶标仪测量样品在 562nm 处的吸光值。

2.4.5 将各个标准品和待测蛋白质样品在 562 nm 处的吸光值减去空白标准品在 562 nm 处的平均吸光值。

2.4.6 将 BSA 标准品在 562 nm 处经过空白校正的平均吸光值对其浓度 (µg/ml) 作图，绘制标准曲线。使用该标准曲线来确定每个待测蛋白质样品的浓度。

2.5 注意事项

2.5.1 当 B 溶液加入到 A 溶液中时，开始可观察到浑浊产生，搅拌后浑浊迅速消失，得到果绿色的澄清工作液。请根据所要检测的样品数量，配制足够体积的工作液。配制好的工作液在室温密闭容器中可稳定保存 24 小时。

2.5.2 该方法不是终点法，孵育完成后，工作液和待测样品混合液仍会继续显色，但室温的显色速率较慢，请在 10 分钟内完成所有样品检测，就不会产生明显误差。

2.5.3 标准方案检测时，如实验条件限制无法进行 37℃ 孵育，也可选择室温孵育 2 小时。

2.5.4 延长孵育时间或者升高温度会使工作液与待测样品反应颜色变深，在 562 nm 处吸收值变高，影响读数的准确性，降低试剂的检测灵敏度。

2.5.5 增强方案操作不建议在微孔板中进行，因微孔板中样品量较少，加热过程中易挥发，影响检测准确度。

2.5.6 BCA 试剂盒对各试剂的耐受浓度，请查询我们的网站信息。

2.5.7 不同蛋白用 BCA 试剂盒检测，都会有独特的吸光度反应。通常使用 BSA 作为标准定量未知蛋白的浓度，但如果需要精确定量，请使用高纯度目的蛋白做标准品。其他蛋白相对 BSA 的吸光度系数，请查询我们的网站信息。

3. 常见问题及解决方案

问题	原因分析	解决方案
工作液与样品混合后未显色	样品中含有铜离子螯合试剂	对样品进行透析、脱盐或者稀释处理。
样品显色比预计颜色深	样品浓度过高	将样品稀释。



空白标准品吸光值正常, 标准品和待测样品显示的颜色比预计值低	检测波长不正确	在 562 nm 处检测吸收值。
	缓冲液为强酸或强碱, 工作液 pH 被改变	对样品进行透析, 脱盐或者稀释。
所有试管 (包括空白试管) 都呈现暗紫色	缓冲液中含有还原剂	对样品进行透析或者稀释。
	缓冲液中含有巯基	
	缓冲液中含有生物胺 (儿茶酚胺)	
分光光度计或酶标仪不具备 562 nm 滤光片	采用 540 nm-590 nm 读数	样品在 540 nm-590 nm 之间的任意波长都可能检测到颜色变化, 但灵敏度会降低。

4. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
BCA Protein Assay Kit	SLR01201	250 次
	SLR01202	1250 次
Bradford Protein Assay Kit	SLR01101	200 次
	SLR01102	1000 次