



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ **BCA**蛋白定量试剂盒
 - ◆ 目录号 **PP01**
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

BCA 蛋白定量试剂盒

目录号: **PP01**

目录编号	包装单位
PP0101	200次
PP0102	500次
PP0103	2500次

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	200 次	500 次	2500 次
蛋白标准 (5mg/mlBSA)	-20℃	0.5ml	0.5ml	1ml×3
Solution A	室温	40ml	50ml×2	250ml×2
Solution B	室温	1ml	2ml	5ml×2

本产品收到后按照上面指示温度存放各成份, 至少一年内有效。

蛋白标准长期保存-20℃放置, 常温运输。

❖ 产品介绍:

BCA(bicinchoninic acid)法蛋白浓度定量试剂盒是在世界上常用的蛋白浓度检测方法之一 BCA 法基础上改进而成。众所周知, 二价铜离子在碱性的条件下, 可以被蛋白质还原成一价铜离子 (biuret reaction), 一价铜离子和独特的 BCA Solution A (含有 BCA) 相互作用产生敏感的颜色反应。两分子的 BCA 螯合一个铜离子, 形成紫色的反应复合物。该水溶性的复合物在 562nm 处显示强烈的吸光性, 吸光度和蛋白浓度在广泛范围内有良好的线性关系, 因此根据吸光值可以推算出蛋白浓度。



❖ 产品特点：

1. 步骤简单，45 分钟内完成测定，比经典 Lowry 法快 4 倍而且更加方便。
2. 灵敏度高，检测浓度下限达到 25 $\mu\text{g/ml}$ ，最小检测蛋白量达到 0.5 μg ，待测样品体积为 1-20 μl 。
3. BCA 法测定蛋白浓度不受绝大部分样品中的去污剂等化学物质的影响，可以兼容样品中高达 5% 的 SDS，5% 的 Triton X-100，5% 的 Tween 20，60，80。
4. 在 20-2000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内有良好的线性关系。
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. 蛋白标准请在**全部溶解后先混匀，再稀释**成一系列不同浓度的蛋白标准。标准品曲线配制时，如果吸量不准确或者加样枪不精确会造成标准曲线相关系数减小，可以根据需要使用倍比梯度稀释的方法来配制，或者使用精确度高的加样枪。
2. Solution A 和 Solution B 混合成工作液时可能会有浑浊，但充分振荡混匀后就会消失，成为淡绿色的透明溶液。
3. 需酶标仪一台，测定波长为 540-590nm 之间，562nm 最佳；需 96 孔板。如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定，但是测定蛋白浓度时，需根据测定吸光度的杯子的体积，按比例调整 A 液，B 液和样品的体积。使用分光光度计测定蛋白浓度时，每个试剂盒可以测定的样品数量可能会显著减少。
4. BCA 蛋白定量试剂盒受螯合剂和略高浓度的还原剂的影响，需确保无 EGTA，EDTA 低于 10mM，二硫苏糖醇低于 1mM， β -巯基乙醇低于 1mM。不适用 BCA 法时建议使用 Bradford 法蛋白定量试剂盒。还可以考虑用超纯水稀释，透析/除盐，ACETONE/TCA 沉淀蛋白后重溶于超纯水等方法来消除干扰物质的影响。



-
5. 为了加快 BCA 法测定蛋白浓度的速度可以适当用微波炉加热，但是切勿过热。
6. 如发现样品稀释液或裂解液本身就有较高背景，请试用 Bradford 法蛋白定量试剂盒。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

1. 使用时将 Solution A 摇晃混匀，根据样品数量，按 50 体积 Solution A 加 1 体积 Solution B (50:1) 配制适量 BCA 工作液，充分混匀。BCA 工作液室温 24 小时内稳定。
2. 完全溶解蛋白标准品(5mg/mlBSA)，取 **10 μ l**稀释至 **100 μ l**，使终浓度为 0.5mg/ml。蛋白样品在什么溶液中，蛋白标准品也宜用什么溶液稀释。但是为了简便起见，也可以用 0.9%NaCl 或 PBS 稀释蛋白标准品。
3. 步骤 3：将**稀释后标准品（0.5mg/mlBSA）**按 0，1，2，4，8，12，16，20 μ l 分别加到 96 孔板中，加标准品稀释液**补足到 20 μ l**。
4. 加适当体积样品到 96 孔板的样品孔中，加标准品稀释液补足到 **20 μ l**。
5. 各孔加入 **200 μ l** BCA 工作液，用加样枪轻轻吹打混匀（注意不要弄出气泡影响读数）37 $^{\circ}$ C 放置 30-60 分钟。

注：也可以根据需要在室温放置 2 小时，或 60 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟。BCA 法测定蛋白浓度时，吸光度会随着时间的延长不断加深。并且显色反应会因温度升高而加快。如果浓度较低，适合在较高温度孵育，或延长孵育时间。

6. 冷却到室温后，用酶标仪测定 A562，或 540-590nm 之间的其它波长的吸光度。
7. 根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度。