



BCA 法蛋白定量试剂盒

I. 产品信息

货号: RW0201
规格: 250T/500T
效期: 一年
保存: 见“IV. 试剂盒组分”

II. 产品简介

BCA(bicinchoninic acid)蛋白定量检测法具有灵敏度高、结果稳定、操作简捷等特点, 被广泛应用于总蛋白的定量检测。BCA 检测法的原理是 Cu^{2+} 在碱性的条件下, 被蛋白质还原成 Cu^+ , Cu^+ 和 BCA 相互作用形成紫色的反应复合物, 可在 562 nm 处显示强烈的吸光值, 并与蛋白浓度在一定范围内呈现良好的线性关系。

BCA 检测法对 SDS、Triton X-100、Tween 20、Tween 80 等化学干扰物有很好的兼容性, 但易受螯合剂、还原剂、脂类物质及强酸、强碱条件的影响, 因此使用时应注意待测样品的溶液条件, 如果不适合 BCA 法检测, 推荐使用瑞帕特生产的抗干扰 Lowry 法蛋白定量试剂盒进行测定。

III. 试剂盒特点

- 准确灵敏: 试管法检测范围为 20 - 2000 $\mu\text{g/ml}$, 如果在 60 $^{\circ}\text{C}$ 进行增色反应, 检测范围可达 5 - 250 $\mu\text{g/ml}$; 微孔板法的检测范围为 25 - 500 $\mu\text{g/ml}$ 。
- 操作简单: 所需样品少, 检测试剂少, 操作简捷, 30 分钟内完成测定。
- 兼容性好: 不受样品中大多数离子型和非离子型表面活性剂的影响。
- 稳定性好: BCA 试剂 (A 和 B) 在室温可稳定保存 12 个月; BCA 工作液可在室温稳定保存一周; 显色反应产物在 1 小时内比色测定, 吸收值稳定。
- 使用方便: 提供微孔板法和试管法测定两种检测方法, 方便用户选择。

IV. 试剂盒组分

组分	目录号	RW0201-250T	RW0201-500T	储存条件
	规格	250T	500T	
BCA 试剂 A		50 ml	100 ml	室温
BCA 试剂 B		1.25 ml	2.5 ml	室温
BSA 标准蛋白 (2 mg/ml)		1ml×2支	5 ml	室温 *
PBS 稀释液		15ml	30ml	室温

*注: BSA 标准蛋白易污染, 如有变质请勿使用。标准蛋白室温稳定6个月, 如需长期保存请冷冻

V. 使用方法

1. 按需用量配制适量 BCA 工作液 (可在室温稳定保存一周)。

BCA 试剂 A 与 BCA 试剂 B 以体积比 50:1 混合, 充分混匀。

2. 配制标准蛋白溶液 (参照附表 2 配制), 并以蒸馏水作为空白对照。

3. 将样品作适当稀释, 样品一般可用 PBS 稀释, 可选用试剂盒配套 PBS 稀释液或自备蒸馏水进行稀释, 样品建议作梯度倍比稀释, 稀释液需与标准品的稀释液一致如 2 倍、4 倍、8 倍等稀释。

4. 根据实验方案, 选择以下其中一种方法进行测试。

4.1 微孔板法

(1) 分别取 20 μl 不同浓度标准蛋白溶液、待测样品以及空白对照 (蒸馏水或 PBS) 分别置于各孔, 为测定准确每个加样孔均应做复孔。

(2) 每孔分别加入 200 μl BCA 工作液, 轻微震荡混匀, 动作不可剧烈, 避免交叉污染。

- (3) 封上微孔板, 放置37°C反应30分钟 (对于低浓度样品的检测也可37°C反应2小时, 以提高562 nm波长吸收值, 增强检测灵敏度)。
- (4) 取出微孔板恢复至室温, 采用 562 nm 波长酶标仪比色。
- (5) 计算出每孔标准蛋白和待测样品的实际吸收值(即标准品吸收值-空白平均吸收值), 然后计算出复孔平均吸收值。
- (6) 绘制标准蛋白曲线。通过标准曲线回归公式, 计算出待测样品的蛋白浓度。

4.2 试管法

- (1) 分别取50 μ l不同浓度标准蛋白溶液、待测样品以及空白对照(蒸馏水或PBS)置于1.5 ml干净的Eppendorf管, 并作好标记(建议每管均应做2-3个平行反应)。
- (2) 每管分别加入1 ml BCA工作液, 立即混匀。
- (3) 放置37°C反应30分钟(如果放置60°C反应30分钟, 最低检测蛋白浓度可达5 μ g/ml)。
- (4) 试管恢复至室温, 采用562 nm波长比色(使用0.5厘米光程比色杯), 以空白对照管调零, 然后进行标准蛋白和待测样品比色测定。
- (5) 计算出标准蛋白与待测样品复管平均吸收值。
- (6) 绘制标准蛋白曲线。通过标准曲线回归公式, 计算出待测样品的蛋白浓度。

VI. 附表

表1 可兼容干扰物质及浓度

干扰物质	最大抗干扰浓度	干扰物质	最大抗干扰浓度
SDS	5%	Sodium azide	0.2%
Dithiothreitol (DTT)	1 mM	2-Mercaptoethanol	0.01%
CHAPS	5%	EDTA	10 mM
Glycerol	10%	Urea	3 M
DMSO	5%	NaOH	0.25 M
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5 M	Guanidine HCl	10 mM
Tris, pH 8.0	250 mM	Acetone	10%
Potassium thiocyanate	3.0 M	TritonX-100/X-114	5%
Tween-80	5%	Tween-20	5%

表2 BSA标准蛋白溶液的配制

根据需要取适量 BSA 标准蛋白, 用于待测样品相一致的稀释液稀释至终浓度为 0.5 mg/ml (原液为 2 mg/ml), 然后依下述方法稀释配制。

管号	BSA标准品用量(μ l)	稀释液用量(μ l)	BSA标准品终浓度(μ g/ml)
1	0	20	0
2	1	19	25
3	2	18	50
4	4	16	100
5	8	12	200
6	12	8	300
7	16	4	400
8	20	0	500

VII. 注意事项

1. 请在使用本产品前仔细阅读说明书。本产品仅用于科研，不可用于诊断。
2. 为了您的安全和健康，请穿戴实验防护服、手套、口罩等必要的防护装备。
3. BSA标准蛋白建议分装，避免反复冻融。
4. 每次使用前请检查试剂是否出现沉淀。如果有沉淀，请在37℃温浴，溶解沉淀后再使用。如果有任何试剂出现变色或微生物污染即丢弃。
5. BCA法测定蛋白浓度时，吸光度会随时间的延长不断加深，因此所有样品的测定需在10分钟内完成，否则会影响蛋白定量的准确度。
6. 待测样品中如含有较高浓度的非离子型表面活性剂，普通Lowry法会因反应液出现沉淀而无法检测，BCA检测法则不会有此情况发生，但是会导致待测样品显色反应加深，仍将产生测定误差。
7. 待测样品中如含有螯合剂，或处于强酸、强碱条件则会导致负吸收值。
8. 如含有脂类物质会导致吸收值明显升高。
9. 如因上述干扰因素存在，造成测定误差，请通过稀释、透析或其他处理方式，使干扰物质浓度降至BCA检测最大兼容浓度以下，或选用瑞帕特生物生产的抗干扰蛋白定量试剂盒直接进行测定。
10. 如果酶标仪没有562 nm检测波长，540 - 590 nm之间的波长也可接受。
11. 更多相关产品敬请关注瑞帕特生物网站或致电0311-80695301咨询。

VIII. 结果示例

表 3 37℃反应 30 分钟后的标准曲线 OD 值

µg/ml	OD1	OD2	AV	Blank	Corrected	SD	CV	AVCV
500	0.653	0.651	0.652	0.133	0.519	0.001	0.2%	1.0%
400	0.527	0.518	0.523	0.133	0.390	0.006	1.2%	
300	0.430	0.441	0.436	0.133	0.303	0.008	1.8%	
200	0.333	0.330	0.332	0.133	0.199	0.002	0.6%	
100	0.232	0.225	0.229	0.133	0.096	0.005	2.2%	
50	0.183	0.181	0.182	0.133	0.049	0.001	0.8%	
25	0.155	0.156	0.156	0.133	0.023	0.001	0.5%	
0	0.132	0.133	0.133					

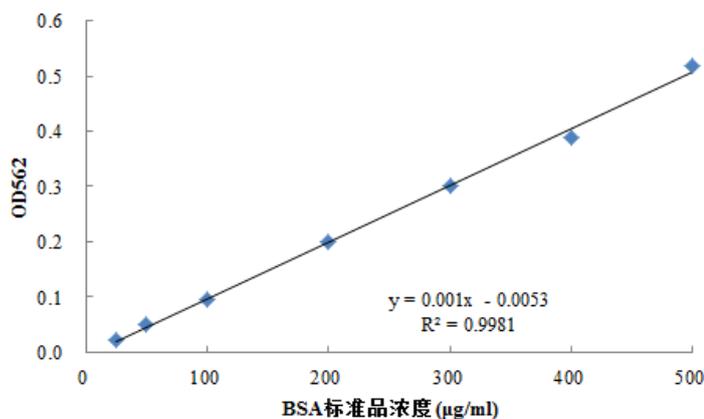


图 1 37℃反应 30 分钟后的标准曲线

IX. 问题及解决策略

问题	可能的原因	解决策略
所有样品均无颜色	样品中含有铜离子螯合剂	透析、脱盐或稀释样品；增加工作液中铜离子浓度
空白孔正常，但标准和样品颜色比预期的弱	强酸或强碱缓冲液，改变了工作液的 pH 值	透析、脱盐或稀释样品
	检测波长错误	选择 562 nm 测定
样品颜色比预期的深	蛋白浓度过高	稀释样品
	样品中含有脂类或脂蛋白	样品中加入 2% SDS，消除脂类物质的干扰
所有孔(包括空白孔)均为深紫色	缓冲液中含有还原剂	透析或稀释样品
	缓冲液中含有巯基	
	缓冲液中含有生物胺	
需要改变检测波长	没有 562 nm 检测波长	540 - 590 nm 波长均可接受，但标准曲线的斜率和灵敏度可能会降低