

BCA 蛋白定量试剂盒

产品概述：

BCA (Bicinchoninic acid) 蛋白定量法是目前应用最广、最灵敏的蛋白质浓度测定方法之一。其工作原理是基于双缩脲反应，即在碱性溶液中，蛋白质将二价 Cu^{2+} 还原为一价 Cu^+ ，一价 Cu^+ 被 BCA 溶液中二辛可宁酸 (Bicinchoninic acid) 螯合，形成紫色络合物，该复合物在 A 562 nm 处有很强的吸光度。该反应产物的量与蛋白质的浓度成正比关系，因此使用酶标仪测定其在 A 562 nm 处的吸光值，与标准曲线进行对比，即可算得待测蛋白质的浓度。本试剂盒中提供蛋白标准品用于制作标准曲线。

本试剂盒可用于比色皿法检测，也可用于微孔板法检测。比色皿法需要大量的蛋白质样品 (100 μL) 和 BCA 工作液 (2 mL)，蛋白样品与 BCA 工作液的比率为 1:20 (v/v)，因此降低干扰物质带来的影响。微孔板法操作简便，仅需少量 (10-25 μL) 的蛋白样品和工作液 (200 μL)，蛋白样品与工作液的比率为 1:20(v/v)或者 1:8(v/v)，但相应的会限制对干扰物质的承受浓度并降低最低检测水平。本试剂盒的蛋白质测定范围为 20 ~ 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，采用加强法可以检测到 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

产品组分：

产品名称	产品编号	规格 (500rxn)
BCA Reagent A	NGM004	100mL
BCA Reagent B		5mL
BSA Standard(2mg/ml)		1mL×2

储存条件：

BCA Reagent A/B可常温储存；BSA Standard 置于-30 ~ -15°C保存， $\leq 0^\circ\text{C}$ 运输。有效期一年。

产品特点：

- 灵敏度高：蛋白质测定范围为20 ~ 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，微孔板法试剂最低检测范围可达 5 ~ 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 快速：30min 即可完成检测，检测速度比传统的 Lowy 法快 4 倍。
- 性能稳定：可兼容去污剂以及大部分化学物质的影响。

注意事项：

- BCA 试剂在低温条件下出现结晶沉淀时，可 37°C 孵育使其完全溶解，不影响使用。
- 使用 BSA 标准蛋白绘制标准曲线时，使用样品蛋白的溶解液溶解 BSA Standard 进行标准曲线的绘制最优。
- 建议 BCA 工作液新鲜配置后应立即使用，长时间放置会影响检测灵敏度。
- 建议使用塑料比色皿。若使用玻璃比色皿或石英比色皿，请在使用后立即用少量 95%乙醇清洗。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

实验流程：

(一) 配制标准品和工作液

1. 配制 BSA 标准品体系 BSA 标准品浓度为 2 mg/mL，稀释液为蛋白样品的溶解液。原则上使用蛋白样品的溶解液稀释标准品。但也可用水或 1×PBS 进行稀释。BSA 标准品体系配制可参考下表（配置后标准品可置于 4℃ 保存，多次使用）。

Vial	稀释液体积 (μL)	BSA 标准品体积 (μL)	BSA 终浓度 (μg/mL)	Vial	稀释液体积 (μL)	BSA 标准品体积 (μL)	BSA 终浓度 (μg/mL)
A	0	100	2000	A	35	5	250
B	25	75	1500	B	75	5	125
C	50	50	1000	C	39	1	50
D	125	75	750	D	79	1	25
E	150	50	500	E	399	1	5
F	175	25	250	F	30	0	0 (Blank)
G	150	10	125				
H	158	2	25				
I	100	0	0 (Blank)				

表 1 BSA 标准品体系配置（线性范围 20~2000 μg/mL）配制方法

表 2 BSA 标准品体系配置（线性范围 5~250 μg/mL）配制方法

2. 配制 BCA 工作液

根据样品数量，按 50 体积 BCAREagent A 加 1 体积 BCAREagent B (50:1) 配制适量 BCA 工作液，充分混匀（BCAREagent B 加入 BCAREagent A 中后，迅速浑浊，混匀后立即变澄清）：总 BCA 工作液体积 = (标准品数量 + 待测样品数量) × 重复数 × 每个样品所需要的 BCA 工作液。

注：比色皿检测时每个样品加 2.0 mL BCA 工作液，微孔板检测每个样品加 200 μL BCA 工作液。BCA 工作液装入密封容器内，室温条件 24h 稳定。

(二) 检测方法

1. 比色皿检测方法（样品：BCA 工作液 = 1:20）

1) 各取 100 μL 标准品和待测样品加入到反应管中。

2) 每管加入 2.0 mL BCA 工作液，混匀。37℃ 孵育 30 min 或室温孵育 2 h（检测范围：20 ~ 2000 μg/mL）。

注：也可 60℃ 孵育 30 min（检测范围：5 ~ 250 μg/mL）。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。但温度升高和时间延长会降低检测下线及工作线性范围。若蛋白浓度较低，可适当提高孵育温度或延长孵育时间。

3) 冷却至室温。使用分光光度计进行检测，设定波长为 562 nm，在 10 min 内对所有样品进行读数。

注：由于 BCA 反应达不到真正的反应终点，温度降低至室温显色反应也会继续。但是室温下显色比率相当低，因此若 10 min 内完成对所有样品在 A562 nm 的吸光度测定，则不会导致明显错误。

4) 根据 BCA 标准品的吸光度（减去标准品中空白孔的 OD 值即为最终的读数），绘制标准曲线（X-蛋白浓度 μg/mL；Y-最终的 OD 562 nm）。依据标准曲线和样品的稀释倍数计算样品蛋白浓度。

2. 微孔板检测方法（样品：BCA 工作液 = 1:20）

1) 各取 10 μL 标准品和待测样品加入到反应管中。

注：样品与工作液比例为 1:20，检测范围为 125 ~ 2000 μg/mL。若样品浓度非常低，可使用 25 μL 标准品和待测样品进行检测（即样品：BCA 工作液 = 1:8），此时试剂盒的检测范围为 20 ~ 2000 μg/mL。

2) 每孔加入 200 μL BCA 工作液，吹打混匀。盖上微孔板，37℃ 孵育 30 min。

3) 冷却至室温。在酶标仪上的 562 nm 处检测吸光度

4) 根据 BCA 标准品的吸光度（减去标准品中空白孔的 OD 值即为最终的读数），绘制标准曲线（X-蛋白浓度 μg/mL；Y-最终的 OD 562 nm）。依据标准曲线和样品的稀释倍数计算样品蛋白浓度。