



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

BCA 蛋白定量试剂盒

简介:

目前世界上最常用的蛋白浓度检测方法是: BCA 法和 Bradford 法。

BCA 法测蛋白的原理是在碱性环境下蛋白质与 Cu^{2+} 络合并将 Cu^{2+} 还原成 Cu^{1+} 。BCA 与 Cu^{1+} 结合形成稳定的紫蓝色复合物, 在 562 nm 处有最大的光吸收值并与蛋白质浓度成正比, 据此可测定蛋白质浓度。BCA 法与传统方法相比, 操作更简单、试剂及其形成的颜色复合物更稳定、灵敏度更高。BCA 法测定蛋白浓度兼容性亦很好, 不受大部分样本中其他成分的影响, 对于 5% 以内的去垢剂如 SDS、Triton X-100、Tween 20、Tween80、NP-40 具有很好的兼容性, 但易受螯合剂、还原剂等的影响, 在测定蛋白浓度前应尽量使样本满足如下要求: EDTA 浓度 $\leq 10\text{mM}$ 、DTT 浓度 $\leq 1\text{mM}$ 、2-ME $\leq 0.01\%$ 、无 EGTA。

源叶生物 BCA Protein Assay Kit 在 50~2000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内有较好的线性关系。本试剂盒适用于微量蛋白质浓度的测定, 其最小检出量为 25 $\mu\text{g/ml}$ 。该试剂盒仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

组成:

名称 \ 编号	R21250 250T	R21250 500T	R21250 2500T	Storage
试剂(A): BCA 试剂 A	50ml	100ml	500ml	RT
试剂(B): BCA 试剂 B	1.5ml	3ml	15ml	RT
试剂(C): 蛋白标准(BSA)	20mg	20mg	20mg	RT
试剂(D): 蛋白标准配制液	5ml	10ml	10ml	RT
使用说明书	1 份			

自备材料:

- 1、蒸馏水、生理盐水或 PBS



2、酶标仪或分光光度计、EP 管、96 孔板或比色皿、恒温箱或水浴锅

操作步骤(仅供参考):

1、取 1ml 蛋白标准配制液加入到含有 20mg 的蛋白标准(BSA)中,充分溶解后配制成 20mg/ml 的蛋白标准溶液,配制后可立即使用,配制的蛋白标准溶液应-20℃保存。

2、取适量的 20mg/ml 蛋白标准溶液,稀释至终浓度为 500μg/ml,如取 25μl 蛋白标准(20mg/ml),加入 975μl 稀释液,充分混匀即配制成 500μg/ml 蛋白标准溶液。注意:待测蛋白溶解于什么样的稀释液中,蛋白标准也宜溶解于同样的溶液中,一般可用 0.9%NaCl 或 PBS 作为 BSA 的稀释液,稀释后的 500μg/ml 蛋白标准溶液也应-20℃长期保存。

3、根据样品数量,按试剂(A):试剂(B)=50:1 的比例配制 BCA 工作液,即取 50 份 BCA 试剂 A 和 1 份 BCA 试剂 B,充分混匀,即获得 BCA 工作液(注意:正常 BCA 工作液应为苹果绿或墨绿色,如变为紫色或其他颜色应弃用);例如取 5ml BCA 试剂 A 和 0.1ml BCA 试剂 B,配制成 5.1ml BCA 工作液,BCA 工作液室温 24 小时内稳定。

4、将 500μg/ml 蛋白标准溶液按 0、1、2、4、8、12、16、20μl 加到 96 孔板或 EP 管中,加稀释液补足至 20μl,其蛋白标准浓度依次为 0、25、50、100、200、300、400、500μg/ml。

5、加 20μl 待测蛋白到 96 孔板或 EP 管中,如果样本不足 20μl,用稀释液补足至 20μl。注意:如果标准品稀释液与溶解待测蛋白的溶液不同,应在待测蛋白中加入 20μl 稀释液;如果标准品稀释液与溶解待测蛋白的溶液相同,无需在待测蛋白孔中加入 20μl 稀释液,以减少不同溶液的差异。

6、向各孔或 EP 管加入 200μl 配制好的 BCA 工作液,迅速混匀,37℃孵育 30~60min。

7、冷却至室温,立即用酶标仪或分光光度计测定 562nm 波长处吸光度(如无 562nm,540~595nm 之间的波长也可),各孔或 EP 管吸光度减去蛋白浓度为 0μg/ml 的标准管的吸光度,以求得的差值为纵坐标:以标准孔或 EP 管中蛋白



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

浓度($\mu\text{g/ml}$)为横坐标, 得出标准曲线及回归方程, 根据标准曲线计算出待测样品的蛋白浓度。

注意事项:

1、蛋白标准(BSA)粉末溶解于蛋白标准配制液后, 即获得蛋白标准原液(即20mg/ml 的蛋白标准), 该原液中含有防腐剂, 不影响后续检测, 该蛋白标准原液-20℃长期保存。

2、待测蛋白溶解于什么样的稀释液中, 蛋白标准也宜溶解于同样的溶液中, 否者待测蛋白与蛋白标准中所含非蛋白成分不一致, 有可能导致测定不准确。

3、如果检测效果不佳, 可以室温放置 2h 或 60℃放置 30min, 颜色会随着时间的延长不断加深, 显色反应也会随温度升高而加快; 如果浓度较低, 可以适当延长孵育时间或在较高温度下孵育。

4、测定标准曲线时发现随着标准品浓度的增加, 吸光度或颜色没有明显变化, 可能的原因是样品中含有严重干扰 BCA 法测定蛋白浓度的物质。

5、如检测样本中含有较多螯合剂、还原剂等影响因素时可考虑 Bradford 法测定。

6、因 BCA 法测定时颜色会随着时间的延长不断加深, 建议每次测定时都作标准曲线, 且显色反应的速度和温度有关, 所以除非精确控制显色反应的时间和温度, 否则每次都做标准曲线。

7、如果没有酶标仪也可以用普通的分光光度计测定, 但应考虑比色皿的最小测定体积, 按比例适当加大 BCA 工作液的用量使总体积不小于最小检测体积, 样品和标准品的用量亦相应按比例放大; 使用分光光度计测定蛋白浓度时, 可以测定的样品数量会显著减少。

8、为了加快 BCA 法测定蛋白浓度的速度可以适当加热, 但切勿过热, 否则易失效。

有效期: 12 个月有效, 蛋白标准配制成溶液后应-20℃冻存。

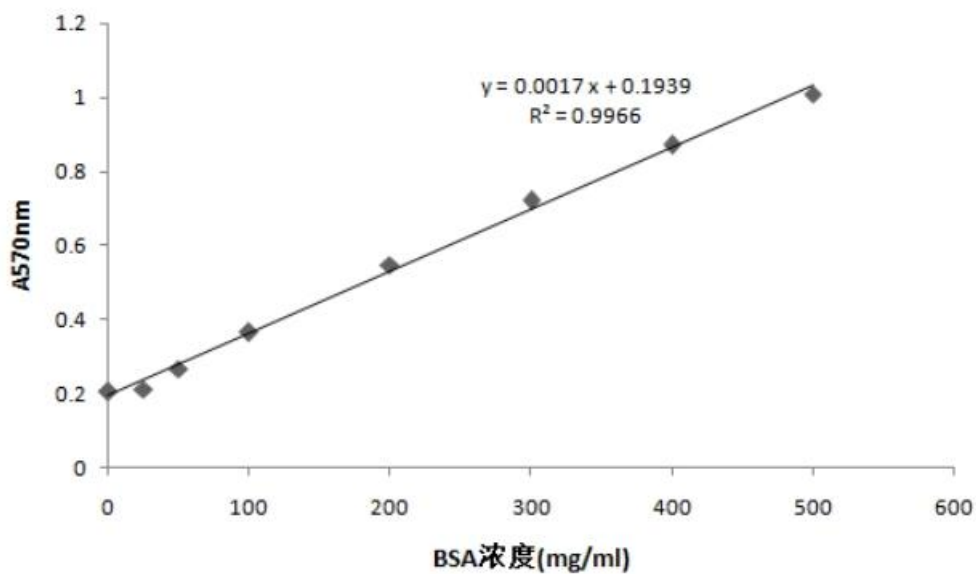


上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

附录 1: 标准曲线制作: 源叶生物 在室温条件下按说明书操作, 对系列标准用酶标仪测定 570nm 时的吸光度, 其数值及标准曲线如下(仅供参考):

蛋白标准($\mu\text{g/ml}$)	0	25	50	100	200	300	400	500
吸光度	0.205	0.211	0.266	0.364	0.547	0.72	0.87	1.009

注意: 对于 10~50 $\mu\text{g/ml}$ 范围内的蛋白样品, 要充分考虑如 EDTA、2-ME、DTT 等干扰因素, 其检测结果波动较大, 标准品亦有波动, 请注意小心精细操作。



源叶