



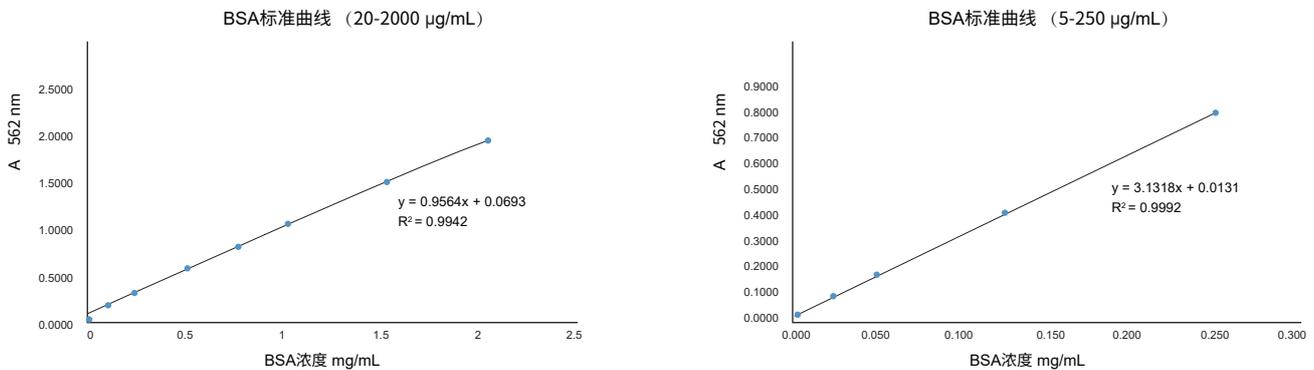
BCA Protein Assay Kit

目录

| | |
|-------------------|---|
| 1. 产品介绍..... | 1 |
| 2. 操作步骤..... | 1 |
| 3. 问题及解决方案..... | 3 |
| 4. 订购信息及相关产品..... | 3 |

1. 产品介绍

BCA (Bicinchoninic acid) 法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 (Cu^{2+}) 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 562 nm 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。

| 试剂名称 | 250 T | 1250 T |
|--------------------------------|-------|--------|
| Solution A | 50 mL | 250 mL |
| Solution B | 1 mL | 5 mL |
| Protein Standard (2 mg/mL BSA) | 1 mL | 1 mL*5 |
| 说明书 | 1 份 | 1 份 |

表 1. BCA Protein Assay Kit 组成

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。



用于标准方案的稀释方法 (检测范围=20-2000 µg/mL)

| 编号 | 稀释液体积 | 标准品体积 | 最终浓度 |
|----|--------|-------------|------------|
| A | 0 | 300 µL原液 | 2000 µg/mL |
| B | 125 µL | 375 µL原液 | 1500 µg/mL |
| C | 325 µL | 325 µL原液 | 1000 µg/mL |
| D | 175 µL | 175 µL B稀释液 | 750 µg/mL |
| E | 325 µL | 325 µL C稀释液 | 500 µg/mL |
| F | 325 µL | 325 µL E稀释液 | 250 µg/mL |
| G | 325 µL | 325 µL F稀释液 | 125 µg/mL |
| H | 400 µL | 100 µL G稀释液 | 25 µg/mL |
| I | 400 µL | 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 | 稀释液体积 | 标准品体积 | 最终浓度 |
|----|--------|-------------|-----------|
| A | 700 µL | 100 µL原液 | 250 µg/mL |
| B | 400 µL | 400 µL A稀释液 | 125 µg/mL |
| C | 450 µL | 300 µL B稀释液 | 50 µg/mL |
| D | 400 µL | 400 µL C稀释液 | 25 µg/mL |
| E | 400 µL | 100 µL D稀释液 | 5 µg/mL |
| F | 400 µL | 0 | 0=空白 |

表 2. 稀释牛血清蛋白 (BSA) 标准品

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 Solution A 与 1 份 Solution 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°C, 30 min

增强方案: 60°C, 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 min 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 s, 使其充分混合。

2.4.3 将微孔板密封, 在 37°C 孵育 30 min。

2.4.4 将微孔板冷却至室温, 使用酶标仪测量样品在 562 nm 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 Solution B 加入到 Solution A 中时, 开始可观察到有浑浊产生, 搅拌后浑浊迅速消失, 得到果绿色的澄清工作液。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 h。

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 min 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°C 孵育,也可选择室温孵育 2 h。

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,请咨询 ACE 的技术支持。

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,请咨询 ACE 的技术支持。

3. 常见问题及解决方法

| 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 | BK0001-01 | 250 T |
| | BK0001-02 | 1250 T |