



BCA蛋白定量试剂盒说明书

货号：WGD-X-3100093

一 产品介绍

Bicinchoninic acid (BCA) 法是近来广为应用的蛋白定量方法。其原理与 Lowery 法蛋白定量相似，即在碱性环境下蛋白质与 Cu^{2+} 络合并将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ 。BCA 与 Cu^+ 结合形成稳定的紫蓝色复合物，在 562 nm 处有高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。与 Lowery 法相比，BCA 蛋白测定方法灵敏度高，操作简单，试剂及其形成的紫蓝色复合物稳定性俱佳，并且受干扰物质影响小。与考染法相比，BCA 法的显著优点是不受去垢剂的影响。

二 产品目录

产品名称	规格
BCA 蛋白定量试剂盒	200 次
	500 次
	2500 次

三 产品组成

组分	200 次	500 次	2500 次
BCA 试剂 A	40 mL	100 mL	100 mL×5
BCA 试剂 B	1 mL	1 mL×2	1 mL×10
BSA 标准品 (5000 $\mu\text{g/mL}$)	1 mL	1 mL	1 mL×5

四 产品用途

用于 BCA 法的蛋白定量检测。

五 产品特点

1. 检测范围：20 ~ 2000 $\mu\text{g/mL}$ ；
2. 变异系数小，定量效果佳；
3. 受去污剂、还原剂等杂质影响小。

六 注意事项

1. 本产品可以采用酶标仪（微孔检测法）或者分光光度计（试管检测法）测定蛋白浓度，如使用普通的光度计测定，需根据比色皿的最小检测体积，适当加大 BCA 工作液的用量使其不小于最小检测体积，样品和标准品的用量可相应按比例放大。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；

2. 试剂在低温条件或长期保存出现沉淀时，可搅拌或 37°C 温育使其溶解；

3. BSA 标准品的稀释液需与待测样品的稀释液一致（可用双蒸水、1×PBS 或 0.9 % 生理盐水进行稀释）；

4. 建议每次测定蛋白样品时，都须绘制标准曲线；

5. BCA 法检测样品中含有脂类物质时，光吸收值会偏高。样品中 EDTA 或葡萄糖浓度大于 10 mM 不能使用 BCA 方法，葡萄糖浓度大于 10 mM 时可用改良 Lowry 法蛋白定量试剂盒，EDTA 大于 10 mM 的样品可用考染法蛋白质定量试剂盒。另外，蛋白质样品经液体样品蛋白抽提试剂沉淀后，可彻底去除干扰 BCA 法、考染法和 Lowry 法蛋白测定的物质。

6. 本产品仅限科研使用。



■ 使用方法

1. 所需设备：比色计、酶标仪或微板比色仪，工作波长最佳为 562 nm，可在 540 ~ 590 nm 之间。
2. 显色工作溶液配制：
- a. 计算显色工作液总量：工作液总量 = （BSA 标准品样本个数+待测样本个数）× 复孔数 × 每个样本显色工作液体积
- b. 根据计算出的所需显色工作液用量，将试剂 A 和试剂 B 按照 50 : 1 的体积比，配制显色工作液，充分混匀。呈嫩绿色，室温 24 h 内稳定。
- 注意：**由于加样可能存在误差，建议配制 BCA 工作液时，多配制 1~2 个孔的量；BCA 试剂 A 在储存时可能会有少量结晶析出，属于正常现象，37℃复溶后使用即可。
3. 稀释 BSA 标准品：取 120 μL BSA 标准品(5000 μg/mL)（需完全融解），用与待测蛋白样品相一致的稀释液稀释至 300 μL，使终浓度为 2000 μg/mL。
- 注意：**为方便起见，也可以用双蒸水，0.9 %生理盐水或 1×PBS 缓冲液稀释标准品。
4. 蛋白浓度测定：
- ①. 稀释后的标准品按 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 μL 分别加到 96 孔板中，加入用于稀释标准品的溶液补足到 20 μL（为避免枪尖损失，可先补足稀释液后加入标准品）；

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
稀释后标准品（μL）	0	1	2	4	6	8	10	15	20
稀释液（μL）	20	19	18	16	14	12	10	5	0
BSA 终浓度（μg/mL）	0	100	200	400	600	800	1000	1500	2000

- ②. 将样品适当稀释（可以多作几个梯度，如 2 倍、4 倍、8 倍稀释），加 20 μL 到 96 孔板的样品孔中；
- ③. 各孔加入 200 μL 显色工作液，充分混匀，盖上 96 孔板盖，37℃孵育 30 min，冷却至室温；
- 注意：**也可以室温放置 2 h，或 60℃放置 30 min。BCA 法测定蛋白浓度时，吸光度会随着时间的延长不断加深，且显色反应会因温度升高而加快。如果蛋白浓度较低，可在较高温度孵育，或延长孵育时间。
- ④.用酶标仪测定每个样品及 BSA 标准品的 OD₅₆₂，或 540 ~ 590 nm 的其它波长的吸光度，注意要减去空白对照（稀释液+工作液）的吸光度。
- ⑤.绘制标准曲线，X 轴为 BSA 蛋白标准品（mg/mL 或 μg/mL），Y 轴为各标准管对应的 OD₅₆₂ 值，拟合曲线（eg. Excel 工具）并计算蛋白浓度。
- 注意：**数据处理时需要去除明显错误的值。待测样品浓度可以从标准曲线中查得，实际浓度需要乘以样品的稀释倍数。如果是计算机绘制的曲线，可以从计算机给出的线性方程式计算出待测样品的浓度。

■ 储存运输条件

- BCA 蛋白定量试剂盒置于 2 ~ 8℃保存，保质期 12 个月，2 ~ 8℃运输；
- BSA 标准品(5000 μg/mL)，置于-25 ~ -15℃保存，保质期 12 个月，2 ~ 8℃运输。

■ 常见问题及解决方法

问题	可能原因	解决办法
没有颜色	样品中含有铜离子络合剂	1. 透析，脱盐，或稀释样品； 2. 提高工作液中铜离子的浓度，如提高 A : B 至 50 : 2； 3. 使用蛋白沉淀法去除干扰物。
空白对照孔光吸收值正常，但是蛋白标准品和待测样品光吸收值低于预期	样品所用溶剂是强酸碱性缓冲液，改变了工作液的 pH 光吸收波长选择错误	透析，脱盐，或稀释样品。 在 562 nm 或 540 ~ 590 nm 读取光吸收值。



待测样品孔光吸收值高于预期	蛋白浓度过高 样品中含有脂类或脂蛋白	稀释样品。 向样品中加入 2% SDS 以除去脂类干扰。
所有孔，包括空白对照孔，呈暗紫色	缓冲液中含有还原剂、硫醇、含有生物胺（儿茶酚胺）等	1. 透析或稀释样品； 2. 使用蛋白沉淀法去除干扰物。
需要用不同的波长读取光吸收值	酶标仪或分光光度计没有 562 nm 滤光片	可以读取 540 ~ 590 nm 区间的光吸收值，但是标准曲线的斜率和检测灵敏度都会受到一定影响。