



BCA 蛋白浓度测定试剂盒

产品简介:

BCA 蛋白定量法是一种快速灵敏、稳定可靠的蛋白定量测定方法，其测定范围是 10—2000 μ g/ml，是比 Lowry 法更优越的专用于检测总蛋白质含量的产品。BCA 法测定蛋白浓度不受绝大部分样品中的化学物质的影响。其在 562nm 处有最大的吸收值，通过与标准曲线对比，即可计算待测蛋白的浓度。

原理:

BCA(bicinchoninic acid)与二价铜离子的硫酸铜等其他试剂组成的试剂，混合一起显示为苹果绿色，即 BCA 工作试剂。在碱性条件下，BCA 与蛋白质结合时，蛋白质将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ，一个 Cu^+ 螯合二个 BCA 分子，工作试剂由原来的苹果绿形成紫色复合物，最大光吸收强度与蛋白质浓度成正比。

试剂盒组成:

	BCA01(50ml)	BCA02(100 ml)
试剂 A: BCA 碱性溶液	50ml	100ml
试剂 B: 硫酸铜溶液	1ml	1ml $\times$ 2
试剂 C: 标准 BSA 蛋白 (1mg/ml)	1ml	1ml $\times$ 2
1.5ml 离心管	25 个	50 个
说明书	1 份	1 份

试剂盒保存:

试剂 A 和试剂 B 室温保存。试剂 C (标准 BSA 蛋白)，为避免反复冻融导致蛋白降解，建议分装成小管-20 $^{\circ}$ C 保存。

测定方法 1: (试管法)

- 1、配制工作液：根据标准品和样品数量，按 50 体积试剂 A，1 体积试剂 B 配制适量 BCA 工作液，充分混匀。注意：BCA 工作液室温 24 小时内稳定。工作液配制的量要与测定所用的比色杯对应。每个测定要做 2-3 个平行反应。本处列举的比色体系所用的是 0.5ml 的比色杯；如果没有 0.5ml 比色杯，反应体系需要放大到实验将采用的比色杯准确读数所需要的体积。
- 2、BSA 标准品和样品的准备：样品用水或其它不干扰显色反应的缓冲配置，使待测定的浓度位于标准曲线的线性部分。每个反应准备 3 个平行测定。标准曲线一般 5-6 个点即可，根据样品的估测浓度确定各点的具体浓度。稀释 BSA 时，可以用水或与样品一致溶液。如



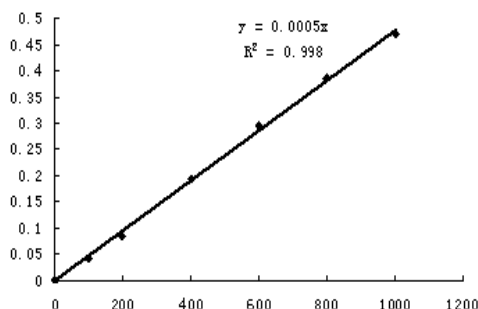
待测定的浓度为 200 μ g/ml 左右，按下表的次序加入 BSA 标准品、样品及 BCA 工作液。

- 3、取适当体积的标准蛋白（蛋白样品）以蛋白液：工作液为 1：20 的比例混匀，37 $^{\circ}$ C 温浴 30min，冷却至室温。
- 4、将样品与标准品在 562nm 波长下测定吸光度。
- 5、绘制标准曲线，计算样品的浓度。注意：实际浓度需要乘以样品的稀释倍数。

	1	2	3	4	5	6	7	待测样品 稀释 1	待测样品 稀释 2
BSA (μ l)	0	2.5	5	10	15	20	25		
H ₂ O (μ l)	25	22.5	20	15	10	5	0	0	0
工作液(μ l)	500	500	500	500	500	500	500	500	500
OD ₅₆₂									
OD ₅₆₂ 平均值									

测定方法 2：（96 孔板）

- 1、配制 BCA 工作液：根据标准品和样品数量，按 50 体积试剂 A，1 体积试剂 B 配制适量 BCA 工作液，充分混匀。
- 2、将蛋白标准品按 0、1、2、4、6、8、10 μ l 加到 96 孔板的蛋白标准品孔中，加灭菌双蒸水补足到 10 微升；取 10 微升待测样品加入 96 孔板。每个测定要做 2-3 个平行。
- 3、向待测样品孔和蛋白标准品孔中加入 200 μ l BCA 工作液（即样品与工作液的体积比为 1：20）混匀。
- 4、37 $^{\circ}$ C 温浴 30min。冷却至室温。
- 5、酶标仪 562nm 波长下测定吸光度。
- 6、绘制标准曲线，计算样品的浓度。注意：实际浓度需要乘以样品的稀释倍数。



注意事项：

- 1、反应颜色的深浅除了与样品的蛋白质浓度相关外，还与反应的温度有关。如果样品的浓度较高（>50 μ g/ml），反应温度一般采用 37 $^{\circ}$ C。如果样品蛋白质的浓度较低（<50 μ g），反应的温度为 60 $^{\circ}$ C，该温度下，色氨酸、酪氨酸和肽键得到充分氧化，大大提高检测灵敏度。
- 2、当蛋白浓度<20 μ g/ml 时，推荐 60 $^{\circ}$ C 温浴，并将蛋白液：工作液的比例调至 1：8 进行测定（增强法）可以检测到 5 μ g/ml。