BCA 蛋白浓度检测试剂盒

（货号：SB-WB013）

产品描述

BCA（Bicinchoninic acid）法是目前应用比较广泛的蛋白质浓度测定方法。基于双缩脲反应，即在碱性环境下蛋白质将Cu2+还原成Cu^{+}，Cu^{+}与BCA试剂形成紫颜色的络合物，在562 nm处有高的吸光值，该反应产物的量与蛋白质浓度成正比。测定其在562 nm处的吸光值，并与标准曲线对比，即可计算待测蛋白的浓度。该方法快速灵敏、稳定可靠且对不同种类蛋白质变异系数很小。试剂盒中提供了浓度稳定的蛋白标准品用于制作标准曲线。

BCA 蛋白浓度测定试剂盒可用于试管法检测，也可用于微孔板法检测。试管法需较大量的蛋白样品（100 μL）和工作液（2 mL），蛋白样品与 BCA 工作液的比率为1:20（v/v），蛋白质测定范围为20-2000 μg/mL，采用加强法可以检测到5 μg/mL；微孔板法操作简单方便，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），蛋白质测定范围为20-2000 μg/mL，采用加强法可以检测到5 μg/mL。我公司提供的BCA 蛋白浓度检测试剂盒，**比色皿法分别可做125 次，酶标法可做1250 次。**

产品组成

产品编号	产品名称	1250次	500次
SB-WB013-1	BCA 试剂 A	250 ml	100 ml
SB-WB013-2	BCA 试剂 B	12.5 ml	5 ml
SB-WB013-3	BSA 标准品 2 mg/ml	5*1 ml	2*1 ml

保存方法

室温保存，一年有效。

产品优势

1）准确灵敏：BCA 试剂的蛋白质测定范围为 20-2000 μg/mL，微孔板法试剂最低检测范围可达5-250 μg/mL。

2）快速： 30 分钟即可完成检测，比传统的 Lowy 法检测速度快 4 倍而且更加方便。

3）经济实用：除试管外，测定可在微孔板中进行，大大节约样品和试剂用量。

4）检测不同蛋白质分子的变异系数远远小于考马斯亮蓝。

5）可兼容样品中去污剂以及大部分化学物质的影响，可以兼容样品中 5%的 SDS，5%的 Triton X-100， 5%的 Tween 20，60，80。（详情见附录）

使用说明

一、配制标准品和工作液

1. **配制 BSA 标准品体系（线性范围 20-2000 μg/ml或者5-250 μg/ml标准品制备各2种配置方法，请根据习惯选用恰当方式。）**

注：BSA 标准品浓度为2 mg/ml，稀释液为蛋白样品的溶解液，原则上蛋白样品在什么溶液中，标准品也宜用什么溶液稀释。但也可用水或 1×PBS 进行稀释。

BSA 标准品体系配制表（**配制后可放置于4度冰箱多次使用**）。

表1 微孔板检测BSA 标准品体系配制(线性范围 20-2000 μg/ml)配置方法一

Vial	稀释液体积(μL)	BSA标准品体积(μL)	BSA终浓度(μg/mL)
A	0	100	2000
B	25	75	1500
C	50	50	1000
D	83	50	750
E	75	25	500
F	140	20	250
G	150	10	125
H	158	2	25
I	100	0	0=Blank

表2 微孔板检测BSA 标准品体系配制(线性范围 20-2000 μg/ml)配置方法二

Vial	稀释液体积(μL)	BSA标准品体积(μL)	BSA 终浓度(μg/mL)
A	0	BSA 标准液 100	2000
B	25	BSA 标准液 75	1500
C	65	BSA 标准液 65	1000
D	35	Vial B 35	750
E	65	Vial C 65	500
F	65	Vial E 65	250
G	65	Vial F 65	125
H	80	Vial G 20	25
I	80	0	0=Blank

表3 BSA标准品体系(微孔板检测，线性范围 5-250 μg/ml)配置方法一

Vial	稀释液体积(μL)	BSA标准品体积(μL)	BSA终浓度(μg/mL)
A	70	10	250
B	75	5	125
C	78	2	50
D	79	1	25
E	399	1	5
F	80	0	0

表4 BSA 标准品体系(微孔板检测，线性范围 5-250 μg/ml)配置方法二

Vial	稀释液体积(μL)	BSA标准品体积(μL)	BSA 终浓度(μg/mL)
A	70	BSA 标准液 10	250
B	40	Vial A 40	125
C	45	Vial B 30	50
D	40	Vial C 40	25
E	40	Vial D 10	5
F	40	0	0

2. **配制 BCA 工作液**

1) 计算所需要的总BCA 工作液体积。

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：试管法检测时每个样品加 2.0 ml BCA 工作液，微孔板检测每个样品加200 μL BCA 工作液。

2) 配制BCA 工作液：50 体积的BCA 试剂 A 中加入1 体积的BCA 试剂B（A:B=50:1），充分混匀。

注：BCA 工作液装入密封容器内，室温条件24h 稳定。

二、检测方法

1. **试管检测方法（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。根据待测样品的浓度范围选择孵育时间和温度。

标准孵育方法：37℃孵育30 min 或者室温2h（检测范围：20-2000 μg/mL）

增强孵育方法：60℃孵育30 min（检测范围：5-250 μg/mL）

注意：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。但是温度升高和时间延长会降低检测下限，以及降低工作线性范围。若蛋白浓度很低，可在较高温度孵育或者适当延长孵育时间。

3) 冷却到室温。在分光光度计上进行检测，设定波长为 562 nm，在10 分钟内对所有样品读数。

注意：由于BCA 反应达不到真正的反应终点，即使温度降低至室温生色反应液会继续。但是，由于室温下生色比率相当低，因此若是10 min 内能对所有的样本进行 562 nm 吸光度的测试，不会导致明显错误。

4) 根据BSA 标准品的吸光度（减去标准品中空白孔的OD 值即最终的读数），绘制标准曲线（X-蛋白浓度 μg/mL；Y-最终的OD562nm）。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微孔板中。

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 标准品和待检测样品进行检测（即 1:8），这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，枪头吹打充分混匀。盖上微孔板，37℃孵育30 min。

3) 冷却到室温，在酶标仪上的562 nm 波长范围处检测吸光度。

4) 根据BSA标准品的吸光度（减去标准品中空白孔的OD值即最终的读数），绘制标准曲线（X-蛋白浓度μg/ml; Y-最终的OD562nm）。依据标准曲线和样品的稀释倍数计算样品蛋白浓度。

另附： BCA 兼容表

BCA 蛋白浓度测定的兼容性

名称	耐受浓度	名称	耐受浓度
Sodium bicarbonate	100 mM	BugBuster protein Extraction Reagent（Cat. No. 70584）	nointerference（undiluted）
Sodium phosphate	25 mM	Calcium chloride（in TBS, pH8.0）	10 mM
2-Mercaptoethanol	0.01%	CelLytic B Reagent	nointerference（undiluted）
Glycercol（pure）	10%	Cesium bicarbonate	100 mM
Glycine-HCl, pH2.8	100 mM	CHAPS	5%
HEPES	100 mM	Cobalt chloride（in TBS, pH8.0）	0.8 mM
Hydrochloric acid	100 mM	CytoBuster Protein Extraction Reagent（Cat. No. 71009）	nointerference（undiluted）

Leupeptin	10 mg/L	Deoxycholic acid	5%
Nickel chloride（in TBS, pH8.0）	10 mM	Dithioerythritol（DTE）	1 mM
Nonidet P-40（NP-40）	5%（w/v）	Dithiothreitol（DTT）	1 mM
Octyl β-glucoside	5%（w/v）	DMF	10%
Potassium thiocyanate	3.0 M	DMSO	10%
SDS	5%	EDTA	10 mM
Sodium acetate, pH4.8	200 mM	EPPS, pH8.0	100 mM
Sodium azide	0.20%	Ethanol	10%
Sodium hydroxide	100 mM	Ferric chloride（in TBS, pH8.0）	10 mM
Sucrose	40%	Glucose	10 mM
Triton X- 100	5%	Glycerol	10%
Triton X- 114, X-305, X-405	1%	Guanidine-HCl	4 M
Tween-20, Tween-60, Tween-80	5%	Imidazole, pH7.0	50 mM
Zwittergent	1%	MES, PH6. 1	100 mM
ACES, pH7.8	25 mM	Methanol	10%
Acetone	10%	MOPS, pH7.2	100 mM
Acetonitrile	10%	N-Acetyglucosamine（10mM） in PBS, pH7.2	10 mM
Ammonium sulfate	1.5 mM	Octyl β - thioglucpyranoside	5%
Aprotinin	10 mg/L	PIPES, pH6.8	100 mM
Bicine, pH8.4	20 mM	PMSF	1 mM
Bis-Tris, pH6.5	33 mM	PopCulture Reagent（Cat. No. 71092）	nointerference（undiluted）
Borate, pH8.5	50 mM	Reportasol Extraction Buffer（Cat. No. 70909）	nointerference（undiluted）
Brij-35	5%	Sodium chloride	1 M
Brij-52	1%	Sodium citrate, pH4.8 or pH6.4	200 mM
Brij-56, Brij-58	1%	Sodium ortho-vanadate in PBS, pH7.2	1 mM
Triethanolamine, pH7.8	25 mM	Span 20	1%
Tris	250 mM	TBS（150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH8.0）	nointerference（undiluted）
Tris（hydroxypropyl） phosphine（THP）	1 mM	Thimerosal	0.01%
Urea	3 M	TLCK	0. 1mg/L
Zinc chloride（in TBS, pH8.0）	10 mM	TPCK	0. 1mg/L