



杭州百澳博生物科技有限公司

Hangzhou Bioblock Biotechnology co., Ltd.



BCA 蛋白浓度测定试剂盒（标准型）

BCA Protein Assay Kit (Standard Type)

产品信息

产品货号	200052-250	200052-1000
规格	250 T	1000 T

组分名称	200052-250	200052-1000
BCA 试剂 A	50 mL	2×100 mL
BCA 试剂 B	1.2 mL	5 mL
蛋白标准品 BSA (5mg/mL)	1 mL	2×1 mL

产品简介

BCA 法是常用的蛋白浓度定量分析方法之一。其原理是，在碱性环境中，蛋白质会与 Cu^{2+} 络合，并将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ 。蛋白将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ 的还原力来源于两个方面，其一是肽键，其二是色氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、胱氨酸等还原性氨基酸的侧链基团。随后两个 BCA 分子与一个 Cu^+ 螯合，形成稳定的蓝紫色复合物，其在 562 nm 波长下有最高的光吸收值，并且该值在一定范围内与蛋白质浓度线性相关，通过带入吸光值换算，可以得出样品中蛋白的浓度。

在标准实验方案下，本试剂盒测定蛋白的最佳线性范围是 50-2000 $\mu\text{g/mL}$ 。在测定时，对样品液中 5% 以内的去垢剂如 SDS、Triton X-100、Tween20、Tween80、NP40 有很好的耐受力，但易受螯合剂和还原剂的干扰，应保证 EDTA 浓度 $\leq 10 \text{ mM}$ 、DTT 浓度 $\leq 1 \text{ mM}$ 、EGTA 浓度 $\leq 1 \text{ mM}$ 、 β -巯基乙醇浓度 $\leq 0.01\%$ 。

储存条件

BCA 试剂 A 和试剂 B 建议置于 2 - 8°C 保存，也可室温保存。配置好的 BSA 标准溶液可以短期保存在 2 - 8°C，长期则置于 - 20°C 保存。有效期 1 年。

使用说明

步骤一 | 配置蛋白标准溶液

操作方法

吸取 120 μL 蛋白标准品，用和待测蛋白样品一致的溶剂，例如裂解液，稀释至 300 μL ，配置成 2mg/mL 的标准样品液。也可以使用 0.9% NaCl 或者 PBS 进行稀释。

步骤二 | 配置 BCA 工作液

操作方法

BCA 工作液现配现用，室温可以稳定保存 24 小时。根据测量的样品加标样的总孔数计算需要的液体量。每个浓度的标样和待测样品建议测量 3 次。一般考虑到损耗，应多配几个孔，计算方法为：

工作液体积总量 = 需要的孔数 × 200 μL。

可以近似认为工作液体积等于试剂 A 的体积。在离心管中按照试剂 A 和试剂 B 为 50:1 的体积比配置显色工作液，充分混匀后待用。

步骤三 | 定量检测

操作方法

利用稀释好的 2mg/mL 的标准样品液，按照下表的加样体积，在酶标板中配置不同浓度的标样液，保证最终的体积为 20 μL。为了添加方便，先添加稀释液。

组分名称	1	2	3	4	5	6	7	8
2 mg/mL 标准品 (μL)	0	0.5	1	2	5	10	15	20
补加稀释液 (μL)	20	19.5	19	18	15	10	5	0
标样浓度 (mg/mL)	0	0.05	0.1	0.2	0.5	1	1.5	2

加入待检测的 20 μL 样品液，设置重复。由于事先未知样品液的浓度，不知道其是否落在检测区间，如果条件允许，可以梯度稀释样品，分别检测。

每孔加入 200 μL 显色工作液，37℃放置 30min。加样时要轻柔，避免出现气泡，如果出现气泡，一般在孵育 30 分钟内会自动消除。也可以使用酶标仪的震荡功能混匀。

设置酶标仪的检测波长为 562nm，检测每孔的吸光度。

以标准样品浓度为横坐标，吸光度的平均值为纵坐标，绘制散点图和标准曲线，计算 R^2 。如果重复中有过度离群点应当剔除。一般 $R^2>0.99$ 为宜。带入样品的吸光度平均值，计算出样品中蛋白的浓度。

 注意事项

- 经过测试，使用兼容浓度的干扰物稀释或溶解标准样品，同样可以获得线性很好的标准曲线 ($R^2>0.99$)。如果使用纯水、0.9% NaCl 或者 PBS 替换，会造成计算时的偏差。兼容并不意味着此浓度的添加物不造成显著的吸光度值的改变。而利用添加干扰物的标曲，可以真实反应样本液中蛋白的浓度。
- 试剂 A 和试剂 B 混合，配置工作液时，会有不溶物出现，充分混匀后沉淀消失，配好的 BCA 工作液呈现苹果绿。建议工作液现配现用，配置好后在室温可以稳定保存 24 h。
- 可以改变样品液和工作液的混合比例，比如设定为 1: 8 或者 1: 20，可以相应节省工作液或者样品，也可以减弱样品液中干扰物的影响。需要注意调整样品液和工作液体积比例会改变检测时的浓度上下限。
- 本检测方法不是终点法，所以时间和温度都会对吸光值产生影响。在需要时，可以相应延长显色的时间和反应的温度。
- 如果使用分光光度计测量吸光度，可以成倍扩大反应体系。建议操作检测时间不要超过 10 min，避免其它测量的反应液颜色过度加深。
- 本试剂盒检测方法在原理上存在不可避免的劣势，因为检测过程只反应了肽键和四种氨基酸（半胱氨酸、胱氨酸、酪氨酸和色氨酸）的数目，而在多种蛋白混合且比例不同的样品中，吸光度并不能和蛋白实际浓度呈现很好的确定关系。为了提高检测的精度，可以使用相应的蛋白替换 BSA。但是相较于 Bradford 法，相同浓度的不同蛋白间的吸光度变异不算太大。