

产品说明书

品名：BCA 蛋白浓度测定试剂盒

货号：YSD-500T

规格：500T

▶▶试剂盒组分

组分	YSD-500T
BCA 试剂 A 液	100mL
BCA 试剂 B 液	3mL
BSA 标准品 (5mg/ml)	1mL

▶▶工作原理

碱性条件下，蛋白将二价 Cu 离子还原为一价 Cu 离子，一价 Cu 离子与 BCA 试剂形成紫颜色的络合物，吸光度强度与蛋白浓度成正比。测定其在 562nm 处的吸收值，并与标准曲线对比，即可计算出待测液体的蛋白浓度。

▶▶试剂盒性能：

1. 准确灵敏，线性范围广，BCA 试剂的蛋白测定范围是 20-2000ug/ml；
2. 快速：45 分钟内完成测定；
3. 经济实用：在微孔板中进行测定，可大大节约样品和试剂用量；
4. 稳定：不受样品中离子型和非离子性去污剂影响；
5. 检测不同蛋白质分子的变异系数远小于考马斯亮蓝法蛋白定量。

▶▶注意事项：

1. 低温或长期保存，若发现 BCA 试剂中 A 或者 B 试剂有沉淀发生，请于 37℃ 恒温并搅拌促使其充分溶解，若发现细菌污染（如出现不可溶解的絮状物或沉淀）则应丢弃，避免对实验结果造成影响；
2. 不受大部分样品中的化学物质的影响，可以兼容样品中 5% 的 SDS，5% 的 Triton X-100，5% 的 Tween 20/60/80 等；
3. 每次测量蛋白浓度均应做标准曲线；
4. 当试剂 A 或者 B 混合时出现浑浊，请充分混匀，浑浊即会消失；
5. 需准备 37℃ 水浴或恒温箱、酶标仪或普通分光光度计，测定波长为 562nm（540-595nm 之间皆可）；
6. 使用 BCA 蛋白测定法测定时颜色会随着时间的延长不断加深，并且显色反应的速度和温度有关，因此需要注意检测时需要保持定时和定温，以确保测量数值的精确；（37℃ 30min/室温 2h）

7. 实验操作规范，提高上样量的精确度。

▶▶使用方法：

1. 配制 BSA 标准品

注：标准品稀释液为蛋白样品的溶解液，原则上蛋白样品的基质溶液应与稀释液保持一致，也可用 0.9% 的 NaCl 或 0.01M PBS 进行稀释。

先将标准品稀释至 2mg/ml（操作如：120ul BSA (5mg/ml) +180ul 稀释液 =300ul BSA 溶液 (2mg/ml)）

BSA 标准品配制可参考下表（微孔板检测，线性范围 20-2000ug/ml）

编号	稀释液体积 (ul)	2mg/ml BSA 体积 (ul)	BSA 终浓度 (ug/ml)
A	0	20	2000
B	5	15	1500
C	10	10	1000
D	12	8	800
E	14	6	600
F	16	4	400
G	18	2	200
H	19	1	100
I	20	0	0

BSA 标准品配制可参考下表（试管法检测，线性范围 20-2000ug/ml）

编号	稀释液体积 (ul)	2mg/ml BSA 体积 (ul)	BSA 终浓度 (ug/ml)
A	0	100	2000
B	25	75	1500
C	50	50	1000
D	60	40	800
E	70	30	600
F	80	20	400
G	90	10	200
H	95	5	100
I	100	0	0

2. 配制 BCA 工作液

(1) 配制 BCA 工作液

按照 50:1 的比例混合试剂 A 和试剂 B (A: 50, B: 1)，充分混匀

(2) 计算所需要的总 BCA 工作液体积

BCA 工作液体积 = (标准品 + 待测样品) * 重复孔数 * 每个样品所需 BCA 体积

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

▶▶实验步骤：

试管法（样品：BCA 工作液=1:20）

1. 各取 100ul 标准品梯度溶液和待测样品加入到反应管中；
2. 每管加入 2.0ml 的 BCA 工作液，混匀，37℃ 孵育 30 分钟；
注意：也可室温孵育 2 小时，或 60℃ 孵育 30 分钟。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。
3. 冷却至室温，在分光光度计上进行检测，设定波长为 562nm。用装满水的比色皿对仪器校零。然后在 10 分钟内完成对所有样品的判读。
注意：由于 BCA 反应无真正的反应终点，即时温度降低至室温，生色反应还是会继续。但是，由于室温下生色比率相对很低，因此若是 10 分钟内能对所有样品进行 562nm 的吸光度测试，不会导致明显误差。
4. 根据 BSA 标准品的吸光度（减去标准品中 0 值的 OD 值即为最终的读数），绘制标准曲线（蛋白浓度 ug/ml，为 x 值；吸光度 OD_{562nm} 为 Y 值），依据标准曲线和样品的稀释倍数计算出样品中蛋白浓度。

微孔板法（样品：BCA 工作液=1:10）

1. 如表，将 BSA 标准品 (2mg/ml) 添加入微孔板中，再用稀释液补足至 20ul；
2. 取 20ul 样品加入反应孔中（建议未知样品，利用稀释液稀释几个梯度）；
3. 将 BCA 工作液按照 200ul 孔加入各个反应孔中，封膜，放置合适环境进行反应（37℃ 或 60℃ 反应 30min；室温反应 2h）
4. 冷却至室温，在酶标仪的 540~595nm 波长范围内检测吸光度，其中 562nm 波长最佳；
5. 根据 BSA 标准品的吸光度（减去标准品中 Blank 孔的 OD 值即为最终的读数）。绘制标准曲线（蛋白浓度 ug/ml，为 x 值；吸光度 OD_{562nm} 为 Y 值），依据标准曲线和样品的稀释倍数计算出样品中蛋白浓度。