



## BCA Protein Quantification Kit

### BCA 蛋白浓度测定试剂盒

#### 产品简介

碱性条件下，蛋白将  $\text{Cu}^{2+}$  还原为  $\text{Cu}^{+}$ ， $\text{Cu}^{+}$  与 BCA 试剂形成紫蓝色的络合物，测定其在 562nm 处的吸收值，并与标准曲线对比，即可计算待测蛋白的浓度。常用浓度的去垢剂 SDS, Triton X-100, Tween 不影响检测结果，但受螯合剂(EDTA, EGTA)、还原剂(DTT, 巯基乙醇)和脂类的影响。实验中，若发现样品稀释液或裂解液本身背景值较高，可试用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒。

本公司生产的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒是根据目前广泛立用的蛋白浓度检测方法之一 BCA 法研制而成。其操作简单，灵敏度高，所形成的颜色复合物稳定性佳，受干扰物质影响小。可检测浓度下限达 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  的蛋白样品，最小检测蛋白量达到 0.4 $\mu\text{g}$ ，待测样品体积为 1-20 $\mu\text{l}$ 。本产品主要成分为: BCA 二钠盐，无水碳酸钠，酒石酸钾钠，氢氧化钠，碳酸氢钠和硫酸铜。

#### 产品组成

产品名称	BCA Protein Quantification Kit		
	BCA 蛋白浓度测定试剂盒		
组分	规格(500T)	规格(2500T)	保存条件
试剂 A: BCA 试剂 A	100ml	500ml	RT, 避光
试剂 B: BCA 试剂 B	2ml	10ml	RT
试剂 C: 蛋白标准 (BSA)	2mg	20mg	RT
试剂 D: 蛋白标准配置液	1ml	10ml	RT
说明书	1 份		

**储存及运输条件:** 常温运输，室温保存，12 个月有效。

#### 自备材料:

- 1、酶标仪（能测 562 nm 处的吸光度）或分光光度计
- 2、96 孔板或 EP 管
- 3、恒温箱或水浴锅
- 4、PBS、0.9% NaCl 或去离子水

#### 操作步骤(仅供参考):

- 1、取 1ml 蛋白标准配置液完全加入到含有 20mg 的蛋白标准(BSA)中，充分溶解后配制成 20mg/ml 的蛋白标准溶液，配制后可立即使用，配制的蛋白标准溶液应-20 $^{\circ}\text{C}$  保存。
- 2、取适量的 20mg/ml 蛋白标准溶液，稀释至终浓度为 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  或所需浓度。如取 25 $\mu\text{l}$  蛋白标(20mg/ml)，加入 975 $\mu\text{l}$  稀释液，充分混匀即配制成 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  蛋白标准溶液。

**注意:** 待测蛋白溶解于什么样的稀释液中，蛋白标准也宜溶解于什么样的稀释液中，一般可用 0.9%NaCl 或 PBS 作为溶解 BSA 稀释液，稀释后的 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  蛋白标准溶液也应-20 $^{\circ}\text{C}$  长期保存。

- 3、根据样品数量，按试剂(A):试剂(B)=50:1 的比例配制 BCA 工作液，即取 50 份 BCA 试剂 A 和 1 份 BCA 试剂 B，充分混匀，即获得 BCA 工作液(注意：正常 BCA 工作液应为苹果绿或墨绿色，如变为紫色或其他颜色应弃用)。例如取 5ml BCA 试剂 A 和 0.1ml BCA 试剂 B，配制成 5.1ml BCA 工作液，BCA 工作液室温 24 小时内稳定。



4、将 500 μg/ml 蛋白标准溶液按 0、1、2、4、8、12、16、20μl 加到 96 孔板或 EP 管中，加稀释液补足至 20μl，其蛋白标准浓度依次为 0、25、50、100、200、300、400、500μg/ml。

5、加 20μl 待测蛋白到 96 孔板或 EP 管中，如果样本不足 20μl，用稀释液补足至 20μl。

【注意】：如果标准品稀释液与溶解待测蛋白的溶液不同，应在待测蛋白中加入 20μl 稀释液；如果标准品稀释液与溶解待测蛋白的溶液相同，无需在待测蛋白孔中加入 20μl 稀释液，以减少不同溶液的差异。

6、向各孔或 EP 管加入 200μl 配制好的 BCA 工作液，37℃ 孵育 20~30min。

7、酶标仪或分光光度计测定 562nm 波长处吸光度(如无 562nm，540~595nm 之间的波 长也可)，空白孔 (0 μg/mL) 记为 A<sub>空</sub>，标准孔记为 A<sub>标</sub>，样本孔记为 A<sub>样</sub>。计算  $\Delta A_{标} = A_{标} - A_{空}$ ， $\Delta A_{样} = A_{样} - A_{空}$ 。

表 1：标准曲线制作：在室温条件下按说明书操作，对系列标准进行吸光度的测定，其数值及标准曲线如下(仅供参考)，

	2mg/ml 标准品体积 (ul)	PBS 或生理盐水体	标准品 浓度 (ug/ml)
Std.1	0	200	0
Std.2	2	198	20
Std.3	5	195	50
Std.4	10	190	100
Std.5	20	180	200
Std.6	50	150	500
Std.7	100	100	1,000
Std.8	200	0	2,000

【注意①】：对于 10-50μg/ml 范围内的蛋白样品，要充分考虑如 EDTA、2-ME、DTT 等干扰因素，其检测结果波动较大，标准品亦有波动，请注意小心精细操作。

【注意②】：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。BCA 法测定蛋白浓度时，颜色会随着时间的延长不断加深，并且显色反应会因温度升高而加快。如果浓度较低，适合在较高温度孵育，或适当延长孵育时间。

## 结果计算

注意：我们为您提供的计算公式，包括推导过程计算公式和简洁计算公式。两者完全相等。建议以加粗的简洁计算公式为最终计算公式。

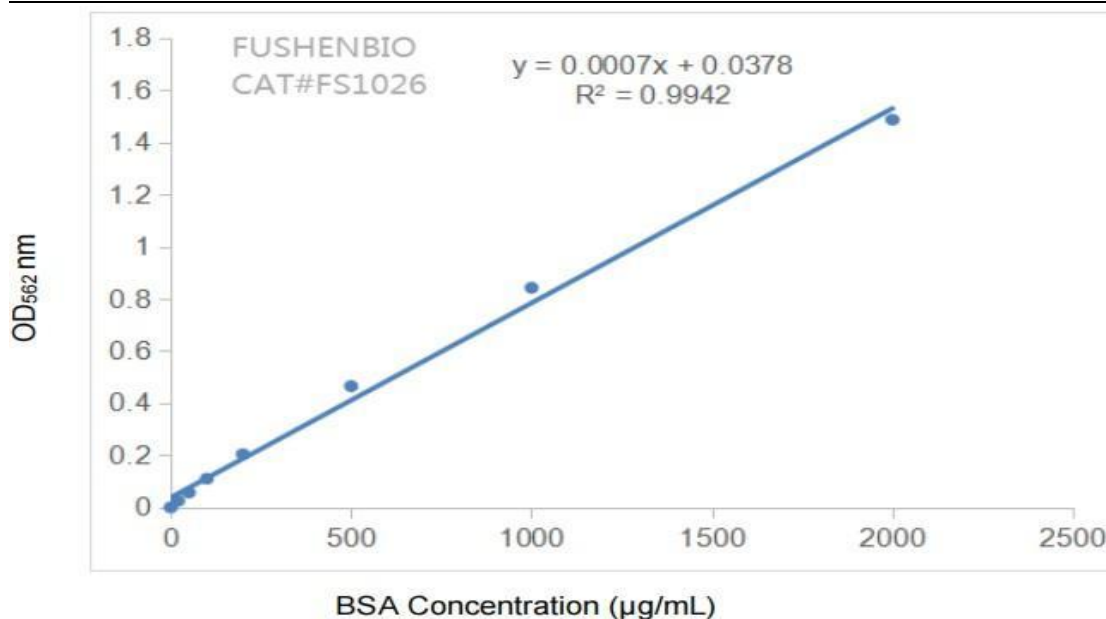
标准曲线的绘制：以  $\Delta A_{标}$  为 y 轴，标准品浓度为 x 轴，绘制标准曲线  $y=kx+b$ 。

样本浓度的计算：将样本的  $\Delta A_{样}$  带入方程得到 x 值 (μg/mL)。

注意：若样本进一步稀释，则需要再乘以进一步稀释的稀释倍数 n。

## 结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



### 注意事项

- 1) 蛋白标准(BSA)粉末溶解于蛋白标准配制液后, 即获得蛋白标准原液(即 20mg/ml 的蛋白标准), 该原液中含有防腐剂, 不影响后续检测, 该蛋白标准原液-20℃长期保存。
- 2) 待测蛋白溶解于什么样的稀释液中, 蛋白标准也宜溶解于什么样的稀释液中, 否则待测蛋白与蛋白标准中所含非蛋白成分不一致, 有可能导致测定不准确。
- 3) 如果检测效果不佳, 可以室温放置 2h 或 60℃放置 30min, 颜色会随着时间的延长不断加深, 显色反应也会随温度升高而加快; 如果浓度较低, 可以适当延长孵育时间或在较高温度下孵育。
- 4) 测定标准曲线时发现随着标准品浓度的增加吸光度或颜色没有明显变化, 可能的原因是样品中含有严重干扰 BCA 法测定蛋白浓度的物质。但 BCA 法受螯合剂和略高浓度的还原剂的影响, 需确保待测样本中 EDTA 低于 10 mM, 无 EGTA, 二硫苏糖醇(DTT) 低于 1 mM, β-巯基乙醇(β-Mercaptoethanol)低于 0.01%。
- 5) 因 BCA 法测定时颜色会随着时间的延长不断加深, 建议每次测定时都作标准曲线, 且显色反应的速度和温度有关, 所以除非精确控制显色反应的时间和温度, 否则每次都做标准曲线。
- 6) 如果没酶标仪, 也可用普通分光光度计测定, 但应考虑根据比色皿的最小测定体积, 应按比例适当加大 BCA 工作液的用量使总体积不小于最小检测体积, 样品和标准品的用量亦相应按比例放大; 使用分光光度计测定蛋白浓度时, 可以测定的样品数量可能会显著减少, 建议把系列标准品用量增加至 100 µl, BCA 工作液用量增加至 1ml。
- 7) 为了加快 BCA 法测定蛋白浓度的速度可以适当加热, 但是切勿过热, 否则易失效。
- 8) 如发现样品稀释液或裂解液本身就有较高背景, 请使用蛋白质定量试剂盒(Bradford 法)(CAT#:FS1027)
- 9) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 相关产品

产品货号	产品名称	规格
FS1027	Bradford Protein Quantification Kit Bradford 蛋白浓度测定试剂盒	500T
FS1007	高效 RIPA 组织细胞裂解液 (含 PMSF, 1.5ml)	100ml
FS1033	30% Acryl/Bis Solution, 29:1 30%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺, 29:1	500ml
FS1409	FUSHENBIO® 彩色预染蛋白分子量标准 (10-180KD)	250ul
FS8602	FUSHENBIO®Fast Blocking Western (快速封闭液)	500ml
FS8603	Western Blot Stripping Buffer 蛋白质印迹膜再生液	500ml