

## AFT BCA Protein Assay kit BCA 蛋白定量试剂盒

产品名称	单位	货号
AFT BCA Protein Assay kit	500T	AFT2045-01

### 【试剂盒组成、储存、稳定性】

试剂盒组成	保存	500 次
蛋白标准 (5mg/ml BSA)	-20°C	2x1ml
Solution A	室温	100ml
Solution B	室温	3ml
PBS 溶液	室温	10ml

本产品收到后按照上面指示温度存放各成份，一年内有效。蛋白标准长期保存-20°C放置，常温运输。

### 【产品介绍】

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  $\text{Cu}^{2+}$  还原成  $\text{Cu}^+$ ，产生一种紫蓝色复合物，在 562nm 处有高的吸光值，该反应产物的量与蛋白质浓度成正比。BCA 蛋白浓度测定法实现了蛋白质浓度测定的简便、灵敏、快速和稳定性。试剂盒中提供的蛋白标准品为用户制作标准曲线提供了便利。该 BCA 蛋白浓度测定试剂盒可用于比色皿法检测，也可用于微孔板法检测。前者虽需较大量 (100 $\mu\text{L}$ ) 的蛋白样品，但由于其在检测中使用蛋白样品与 BCA 工作液的比率为 1:20 (v/v)，从而降低干扰物质带来的影响。后者操作简单方便，仅需少量 (10-25 $\mu\text{L}$ ) 的蛋白样品。不过，由于其在检测中使用蛋白样品与 BCA 工作液的比率为 1:8 (v/v)，某种程度上限制干扰物质的承受浓度以及降低最低检测水平。

### 【产品特点】

- 1) 灵敏度高，最小检测蛋白量可达 0.2 $\mu\text{g}$ ，检测浓度下限达到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (在 20~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内有较好的线性关系)。
- 2) 速度快，比一般的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒显色所用时间短。比传统的 Lowry 法检测速度约快 4 倍。
- 3) 线性范围广，20-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内有较好的线性范围。
- 4) 不受大部分样品中的化学物质的影响，BCA 法测定蛋白浓度的最大优点是蛋白浓度的测定可以耐受高浓度的去垢剂，可以兼容样品中高达 5% 的 SDS; 5% 的 Triton X- 100; 5% 的 Tween 20, 60, 80。但受螯合剂和略高浓度的还原剂的影响，需确保 EDTA 低于 10mM，无 EGTA，二硫苏糖醇低于 1mM;  $\beta$ -巯基乙醇低于 0.01%。
- 5) Bradford 法与 BCA 法的对比：

方法	Bradford 法	BCA 法
灵敏度	1~5 $\mu\text{g}$	0.5~20 $\mu\text{g}$
时间	5~15 min	40~60 min
波长	595 nm	562 nm
检测不同类别蛋白质	变异系数较高	变异系数较低
吸光稳定性	1 h 内稳定	随时间变化

### 【注意事项】

- 1) BCA 蛋白测定法测定时颜色会随着时间的延长不断加深，显色反应的速度和温度有关，需注意保持定时和定温，以确保精确定量。
- 2) 长期保存，若发现 BCA 试剂 A 或者试剂 B 有沉淀发生。请 37°C 温育并伴随搅拌促使其充分溶解。如发现细菌污染，则应丢弃。

3) 实验操作规范, 提高上样量的精确度。

4) 每次测定都需做相应的标准曲线, 因为显色反应与温度和时间的变化有关, 精准蛋白定量宜每次都做标准曲线。

### 【操作步骤】(实验前请先阅读注意事项)

#### 一、BCA 工作液配制:

将试剂 A 和试剂 B 按照体积比 50:1 比例混合配成 BCA 工作液。取 50mL 试剂 A 与 1mL 试剂 B 混合, 配成 51mL BCA 工作液。两者混合时会有沉淀形成, 彻底混匀后沉淀消失。

#### 二、微孔板测定程序:(工作范围 20-2000 $\mu\text{g/ml}$ )

1. 蛋白标准品配制: 室温完全溶解蛋白标准品, 取 20 $\mu\text{l}$  5mg/ml BSA 蛋白标准溶液用 PBS 溶液稀释至 100 $\mu\text{l}$  使其终浓度为 1 mg/ml。

2. 按照下表配制 BSA 标准测定溶液:

编号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
	1 mg/ml BSA 标准溶液 $\mu\text{L}$							5 mg/ml BSA 标准溶液 $\mu\text{L}$	
BSA 标准溶液 $\mu\text{l}$	0	0.5	2.5	5.0	10	15	20	6	8
PBS 溶液 $\mu\text{l}$	20	19.5	17.5	15	10	5	0	14	12
BSA 终浓度 $\mu\text{g/ml}$	0	25	125	250	500	750	1000	1500	2000
总体积 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$								

3. 将适当体积的待测样品加入到微孔板中, 并用 PBS 补足到 20  $\mu\text{l}$

4. 向微孔板中加入 200 $\mu\text{L}$  BCA 工作液混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 分钟; 注: 也可以室温放置 2 小时, 或 60  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 分钟。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, 在较高温度孵育或适当延长孵育时间。

5. 测定 562 nm 处的吸光值, 并记录读数; 以不含 BSA 的样品的光吸收值作为空白对照。

6. 以 A562 为纵坐标 BSA 含量为横坐标绘制标准曲线计算样品中蛋白浓度。如果蛋白浓度不在标准曲线范围内, 请稀释样品后重测。

#### 三、试管测定程序:(工作范围 20-1000 $\mu\text{g/ml}$ )

1. 蛋白标准品配制:

室温完全溶解蛋白标准品, 取 150 $\mu\text{L}$  5mg/ml BSA 蛋白标准溶液, 加入 600 $\mu\text{L}$  PBS 溶液稀释至 750 $\mu\text{l}$ , 使其终浓度为 1.0 mg/ml。

2. 按照下表配制 BSA 标准测定溶液:

编号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
	1 mg/ml BSA 标准溶液 $\mu\text{l}$							5 mg/ml BSA 标准溶液 $\mu\text{l}$	
BSA 标准溶液 $\mu\text{l}$	0	2.5	12.5	25	50	75	100	30	40
PBS 溶液 $\mu\text{l}$	100	97.5	87.5	75	50	25	0	70	60
BSA 终浓度 $\mu\text{g/ml}$	0	25	125	250	500	750	1000	1500	2000
总体积 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$								

3. 将适当体积的待测样品加入到试管中, 并用 PBS 补足到 100  $\mu\text{l}$ ;

4. 向试管中加入 2ml BCA 工作液, 混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 分钟;

5、6 步骤同上。

#### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。