

BCA 蛋白定量试剂盒

目录号：ZD301 版本：2014-07-1

试剂盒内容：

试剂盒组成	ZD301-1 (200 次)	ZD301-2 (500 次)	ZD301-3 (2500 次)
1、 Solution A 室温保存	40ml	100ml	500ml
2、 Solution B 室温保存	1ml	2ml	10ml
3、 BSA 标准蛋白溶液 (5mg/ml)-20℃保存	0.25ml	0.5ml	3ml
4、 产品使用说明书	1 份	1 份	1 份

BSA 标准蛋白溶液 (5mg/ml) 可单独购买； 目录号：ZS301 包装 1ml

试剂盒组成、储存、稳定性：

本产品收到后按照上面指示温度存放各成份，至少一年内有效。

蛋白标准长期保存-20℃放置，常温运输。

产品介绍：

BCA(bicinchoninic acid)法蛋白浓度定量试剂盒是一种抗干扰能力强且准确定量的蛋白含量检测试剂盒。众所周知，二价铜离子在碱性的条件下，可以被蛋白质还原成一价铜离子(biuret reaction)，一价铜离子和独特的 BCA Solution A (含有 BCA) 相互作用产生敏感的颜色反应。两分子的 BCA 螯合一个铜离子，形成紫色的反应复合物。该水溶性的复合物在 562nm 处显示强烈的吸光性，吸光度和蛋白浓度在广泛范围内有良好的线性关系，因此根据吸光值可以推算出蛋白浓度。

产品特点：

1. 步骤简单，45 分钟内完成测定，比经典 Lowry 法快 4 倍而且更加方便。
2. 灵敏度高，检测浓度下限达到 25ug/ml，最小检测蛋白量达到 0.5ug，待测样品体积为 1-20ul。
3. 在 50-2000ug/ml 浓度范围内有良好的线性关系。
4. 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. 蛋白标准请在**全部溶解后先混匀，再稀释**成一系列不同浓度的蛋白标准。标准品曲线配制时，如果吸量不准确或者加样枪不精确会造成标准曲线相关系数减小，可根据需要使用倍比梯度稀释的方法来配制，或者使用精确度高的加样枪。
2. Solution A 和 Solution B 混合成**工作液**时可能会有浑浊，但充分振荡混匀后就会消失，成为淡绿色的透明溶液。
3. 需酶标仪一台，测定波长为 540-590nm 之间，562nm 最佳；需 96 孔板。如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定，但是测定蛋白浓度时，需要根据测定吸光度的杯子的体积，按比例调整 A 液，B 液和样品的体积。使用分光光度计测定蛋白浓度时，每个试剂盒可以测定的样品数量可能会显著减少。

- BCA 法测定蛋白浓度不受绝大部分样品中的化学物质的影响，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，β-巯基乙醇低于 1mM。不适用 BCA 法时建议使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒。还可以考虑用超纯水稀释，透析/除盐，ACETONE/TCA 沉淀蛋白后重溶于超纯水等方法来消除干扰物质的影响。
- 为了加快 BCA 法测定蛋白浓度的速度可以适当用微波炉加热，但是切勿过热。
- 如发现样品稀释液或裂解液本身就有较高背景，请试用 Bradford 法蛋白定量试剂盒(目录号：ZD302)。

操作步骤：(实验前请先阅读注意事项)

- 使用时将 Solution A 摇晃混匀，根据样品数量，按 50 体积 Solution A 加 1 体积 Solution B (50:1) 配制适量 BCA 工作液，充分混匀。BCA 工作液室温 4 小时内稳定。
- 蛋白标准品(1mg/mlBSA)：取 10ul 蛋白标准品(5mg/mlBSA)稀释至 50ul，使终浓度为 1mg/ml。蛋白样品在什么溶液中，蛋白标准品也宜用什么溶液稀释。但是为了简便起见，也可以用去离子水，0.9%NaCl 或 PBS 稀释蛋白标准品。
- 检测操作 (按 1 份体积的样品加入 20 倍体积的 BCA 工作液)**

注：

- 如果推荐的标淮曲线设计方案的浓度范围和梯度都较大，则标准曲线为非直线，只能用于粗略估计！需要精确定量则应该在相差 10ug 以下范围内设计蛋白含量梯度为 2.5ug 或更低的标准曲线。如：估计蛋白浓度在 50-60ug 之间，则可以选取 50ug,52ug,54ug,56ug,58ug,60ug 几个点做标准曲线。或精确稀释 3 个以上平行样品到一个已测好的精确度高的标准曲线内，测量后取平均值。
- OD 值在 0.2-1.2 的范围内的线性度较好，准确定量时，应尽可能将标准品和样品稀释到这个范围检测。

A . 酶标板操作

(1) 孔号	0	1	2	3	4	5	6	7
蛋白标准溶液 (μL)	0	0.5	1	2	4	6	8	10
去离子水 (μL)	10	9.5	9	8	6	4	2	0
对应蛋白含量 (μg)	0	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0

- 各孔加入 200μL BCA 工作液；把酶标板放在振荡器上振荡 30sec，37°C 放置 30 分钟，然后在 562nm 下比色测定。以蛋白含量 (μg) 为横坐标，吸光值为纵坐标，绘出标准曲线；
- 稀释待测样品至合适浓度，使样品稀释液总体积为 10μL，加入 BCA 工作液 200μL，充分混匀，37°C 放置 30 分钟后，以标准曲线 0 号管做参比，在 562nm 波长下比色，记录吸光值；
- 根据所测样品的吸光值，在标准曲线上即可查得相应的蛋白含量 (μg)，除以样品稀释液总体积 (10μL)，乘以样品稀释倍数即为样品实际浓度 (单位：μg/μL)。

B . 分光光度计测定

(1) 孔号	0	1	2	3	4	5	6	7
蛋白标准溶液 (μL)	0	2.5	5	10	20	30	40	50
去离子水 (μL)	50	47.5	45	40	30	20	10	0
对应蛋白含量 (μg)	0	2.5	5.0	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0

- 各管加入 1000μL BCA 工作液；各管充分混匀，37°C 放置 30 分钟，然后在 562nm 下比色测定。以蛋白含量 (μg) 为横坐标，吸光值为纵坐标，绘出标准曲线；
- 稀释待测样品至合适浓度，样品稀释液总体积为 50μL，加入 BCA 工作液 1000μL，充分混匀，37°C 放置 30 分钟后，以标准曲线 0 号管做参比，在 562nm 波长下比色，记录吸光值；
- 根据所测样品的吸光值，在标准曲线上即可查得相应的蛋白含量 (μg)，除以样品稀释液总体积 (50μL)，乘以样品稀释倍数即为样品实际浓度 (单位：μg/μL)。

数据处理可以采用 EXCEL 绘制 X-Y 散点图。添加趋势线获得标准曲线方程；也可以到我公司网站下载 excel 文件

<http://www.zomanbio.com/download.php?id=7>