

BCA 蛋白定量试制盒

货号: HKW2019

【产品信息】

产品名称	产品货号	规格	有效期
BCA 蛋白定量试制盒	HKW2019	500T	一年

【产品简介】

BCA 法定量检测蛋白的基本原理是基于双缩脲反应,即在碱性条件下, Cu^{2+} 被蛋白质还原成 Cu^{+} , 随后 Cu^{+} 与 BCA (Bicinchonic acid, 一种显色剂) 发生螯合反应, 每两分子 BCA 螯合一个 Cu^{+} , 生成紫色的水溶性复合物, 该物质在 562 nm 处有最高吸收值, 且颜色深浅与蛋白质浓度一定范围内成正比, 因此可用于蛋白质的定量检测, 蛋白浓度在 50-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内有较好的线性关系。

本方法不受绝大部分样品中化学物质的影响, 可以兼容样品中高浓度的去垢剂, 包括浓度高达 5% 的 SDS, 5% 的 Triton X-100, 5% 的 Tween-20、60、80 等。但螯合剂和高浓度还原剂会影响检测结果, 需确保样品中无 EGTA, EDTA 浓度低于 10 mM, DTT 低于 1 mM, β -巯基乙醇低于 1 mM。

【产品组成】

产品目录	主要成分	产品规格
HKW2019-1	BCA 试剂	100mL
HKW2019-2	硫酸铜溶液	3×1.2mL
HKW2019-3	蛋白标准品 (BSA)	3×25mg
HKW2019-4	蛋白标准配制液	3×1.2mL

【储存与运输】

冰袋运输；蛋白标准品（BSA）4℃保存，有效期 12 个月。配制成的蛋白标准溶液后需

-20℃ 保存，并在 6 个月内使用。其余试剂常温保存，有效期 12 个月。

【使用方法】

1. 配制蛋白标准贮备液：取 1 mL 蛋白标准配制液加入到蛋白标准品（BSA）蛋白标准管中，将 25 mg 蛋白标准品完全溶解，即得到浓度为 25 mg/mL 的蛋白标准贮备液。配制成的蛋白标准溶液可-20℃ 长期保存。

2. 配制蛋白标准工作液：取适量 25 mg/mL 蛋白标准贮备液，用 PBS 或生理盐水稀释 50 倍，得到终浓度为 0.5 mg/mL 的蛋白标准工作液。注意稀释时按照 10 倍梯度方法稀释，确保稀释准确。

3. 绘制标准曲线（酶标仪法）：将蛋白标准工作液分别按 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ L 加到 96 孔板中，然后用 PBS 或生理盐水依次加 20, 19, 18, 16, 12, 8, 4, 0 μ L 将上述梯度工作液补足到 20 μ L。得到蛋白浓度依次为 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 μ g/mL 的梯度曲线。

4. 准备待测样品：将待测的蛋白样品进行适当稀释（可通过预实验检测，使样品蛋白浓度在标准曲线范围内，确保检测结果可信），按照每个样品 20 μ L 的量加到 96 孔板中。待测样品与蛋白标准品用相同溶液稀释。

5. 配制 BCA 显色工作液：将 BCA 试剂与硫酸铜溶液按照 50:1 体积比充分混合均匀，得到 BCA 显色工作液。BCA 显色工作液可室温保存，24 h 内使用。每个待测样品需 200 μ L，建议按需配制，避免浪费。

6. 检测：向标准曲线样品孔及待测样品孔中每孔加入 BCA 显色工作液 200 μ L，充分混匀（可将 96 孔板放在振荡器上振荡 30 s），37℃反应 30 min 后，以标准曲线 0 号做参比，在 562 nm 波长下比色测定，记录各孔吸光度值。（注：也可以在室温反应 2 h，或 60℃反应 30 min。如果蛋白浓度较低，建议置于 60℃反应）

7. 计算：以标准曲线中梯度蛋白含量（ $\mu\text{g/mL}$ ）为横坐标，吸光值为纵坐标，绘出标准曲线。根据所测样品的吸光值，在标准曲线上即可查得相应孔中待测样品的蛋白浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ），再乘以样品稀释倍数即为待测样品实际蛋白浓度。议按需配制，避免浪费。

【注意事项】

1. BCA 法测定蛋白使用 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，因此需注意保持定时和定温，以确保精确定量，若显色反应时间和温度无法精确控制，宜每次都做标准曲线。

2. 在进行蛋白标准贮备液的配制时，需确保溶解充分。稀释配制蛋白标准工作液时建议 10 倍梯度稀释，不要一次稀释 50 倍，以免产生较大误差。

3. 低温或长期保存，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，则应舍弃，避免对实验结果造成影响。

4. 操作时请穿实验服，并佩戴一次性手套。