微量 BCA 蛋白定量试剂盒

产品简介：

目前世界上最常用的蛋白浓度检测方法是： BCA 蛋白定量试剂盒(BCA Protein Assay Kit)和 Bradford 蛋白定量试剂盒(Bradford Protein Assay Kit)。微量 BCA 蛋白定量检测法与传统方法相比，更简单、更稳定、更灵敏度， BCA 法测定蛋白浓度兼容性亦很好，不受大部分样本中其他成分的影响，对于 5%以内的 SDS、Triton X-100、Tween 20、Tween 80 具有很好的兼容性。

微量 BCA 蛋白定量检测法是基于 Bicinchoninic Acid 研制而成，其检测原理 是在碱性环境下蛋白质分子中的肽键结构能与 Cu^{2+}离子生成络合物，同时将 Cu^{2+}还原成 Cu^{+}，BCA 可敏感的特异的与 Cu^{+}结合，形成稳定的有色化合物，在 562nm处有高的吸光 度，颜色的深浅与蛋白质浓度呈正比，可根据吸光度值的大小来测定蛋白质的含量， Micro BCA Protein Assay Kit 在 10 ~250μg/ml 浓度范围内有较好的线性关系，其最小检出量为 5μg/ml 左右。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

编号 / 名称	GCPT0006 250T	GCPT0006 500T	Storage
试剂(A): Micro BCA 试剂 A	25ml	50ml	RT
试剂(B): Micro BCA 试剂 B	25ml	50ml	RT 避光
试剂(C): Micro BCA 试剂 C	1.5ml	3ml	RT
试剂(D): 蛋白标准(BSA)	20mg	20mg	RT
试剂(E): 蛋白标准配制液	5ml	10ml	RT
使用说明书	1 份		

自备材料：

1、 酶标仪或分光光度计

2、 96 孔板或 EP 管

3、 恒温箱

操作步骤(仅供参考)：

1、 取 1ml 蛋白标准配制液完全加入到含有 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℃保存。

2、 取适量的蛋白标准溶液(20mg/ml)，稀释至终浓度为 200μg/ml 或所需浓度；如取 10μl 蛋白标准 20mg/ml，加入 990μl 稀释液中，充分混匀，即成蛋白标准溶液(200μg/ml)。

特别提示：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，例如待测蛋白溶解于蔗糖溶液中，亦取 20mg/ml 蛋白标准溶解于蔗糖溶液中；一般也可以用 0.9%NaCl 或 PBS 作为溶解 BSA 的稀释液，稀释后的 200μg/ml 蛋白标准溶液也应-20℃长期保存。

3、 根据样品数量，按试剂(A):试剂(B):试剂(C) =26:25:1 的比例配制 Micro BCA 工作液，充分混匀(注意：Micro BCA 工作液应为浅绿色或苹果绿色，如变为紫色或其他颜色应弃用)。例如取 2.6ml BCA 试剂 A、2.5ml BCA 试剂 B 和 0.1ml BCA 试剂 C，配制成 5.2ml Micro BCA 工作液，Micro BCA 工作液室温 24 小时内稳定。

4、 稀释系列标准品：将 200μg/ml 蛋白标准溶液和稀释液按下边一次加入到 96 孔板或 EP 管中，即得相应标准梯度。

加入物(μl)	0	1	2	3	4	5	6	7
蛋白标准 (200μg/ml)	0	1	2	4	8	12	16	20
稀释液	20	19	18	16	12	8	4	0
蛋白浓度(μg/ml)	0	10	20	40	80	120	160	200

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。

6、 各孔或管加入 200μl 配制好的 Micro BCA 工作液，60℃孵育 60min。

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)，各孔或管吸光度减去”0”号孔的吸光度，以求得的差值为纵坐标，以标准孔或管中的蛋白浓度(μg/ml)为横坐标，得出标准曲线及回归方程，根据标准曲线计算出待测样品的蛋白浓度。

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，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，否者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、 待测蛋白和蛋白标准加入 Micro BCA 工作液后，如果发现检测效果不佳，可以 60℃水浴 120min，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。

5、 BCA 法检测中样本中不应含有 EGTA，否则影响检测结果。

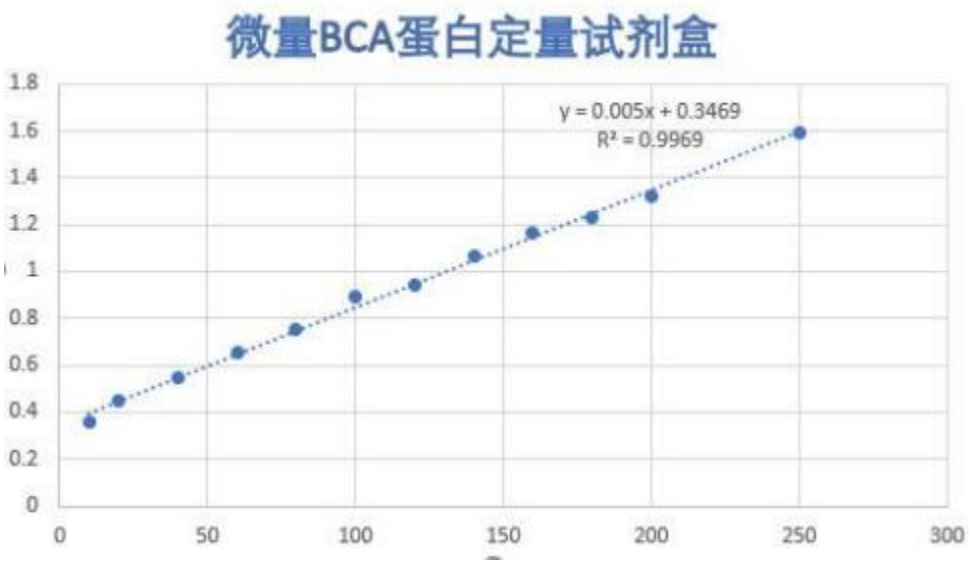
6、 因 BCA 法测定时颜色会随着时间的延长不断加深，建议每次测定时都做标准曲线，并且显色反应的速度和温度有关，所以除非精确控制显色反应的时间和温度，否则每次都做标准曲线。

7、 如果没有酶标仪， 也可以使用普通分光光度计测定， 但应考虑根据比色皿的最小检测体积。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。

8、 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。

有效期： 12 个月有效， 蛋白标准配制成溶液后应-20℃冻存。

附录(标准曲线制作)**：** 在室温条件下， 按说明书操作， 用酶标仪 570nm对系列 标准(10、20、40、60、80、100、120、140、160、180、200、250μg/ml)进行吸光度 的测定，其标准曲线如下(仅供参考)：



注意： 对于 5～25μg/ml 范围内的蛋白样品， 要充分考虑如 EGTA、 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。