For Research Use Only

BCA蛋白浓度检测试剂盒

Catalog Number: PK10026

proteintech®

www.ptgcn.com

产品介绍

Proteintech BCA蛋白浓度检测试剂盒是一种双组分、高精度、兼容去垢剂的蛋白定量试剂盒，可实现对蛋白质进行快速、稳定、灵敏的浓度测定。该定量的原理是在碱性环境下，蛋白质将 Cu^{2+}还原成 Cu^{+}的反应，然后使用含有BCA 的试剂，利用比色法来检测亚铜阳离子 (Cu^{+})，形成一种在540-595 nm之间（最佳562 nm） 处有强吸收值的紫色复合物，通过与标准品曲线对比，获得待测定蛋白的浓度。对于蛋白研究中的常见样品类型如：全细胞裂解物、亲和柱分离组分和蛋白样品纯化的产物等，此款BCA蛋白浓度检测试剂盒可准确测定其蛋白浓度。与大多数染料结合法相比，BCA蛋白定量法受蛋白质氨基酸组成差异的影响更小，因此有更高的蛋白间定量一致性。

关于试剂盒

●本检测范围：蛋白质浓度的检测范围为 20 至 2000 ug/mL。

●本产品可以采用分光光度计或酶标仪测定蛋白浓度。

●使用96孔微孔板方案需要的待测蛋白样品体积10-25 uL。

●测量500 ug/mL以下的蛋白浓度可将BSA标准品绘制25 ug/mL到500 ug/mL的标准曲线，能够进一步的提升检测精准度。

●部分干扰BCA定量分析的物质包括还原剂、螯合剂、强酸或强碱等，即使浓度很低也可能会影响定量的结果（参考表2）。

●对于浓度高于2000 ug/mL的待测蛋白样品，可根据样品的浓度，提前稀释 5 倍或 10 倍再进行检测。

●Proteintech蛋白提取试剂盒产品提取的蛋白样品经过稀释后（使蛋白浓度在检测范围内）均可使用本BCA蛋白浓度检测试剂盒进行定量。

产品成分

组分	规格（250T/500T）	保存条件
BCA试剂A液	50 mL/100 mL	室温保存一年
BCA试剂B液	1.5 mL/3 mL	室温保存一年
BSA标准品溶液（2 mg/mL）	1 mL*2/1 mL*3	室温保存一年

包装规格

250T/500T

保存条件

室温保存一年。

使用方法

1. 蛋白标准品的准备

用与待测蛋白样品一致的稀释液按表1梯度稀释牛血清白蛋白（BSA）标准品。

表1 梯度稀释牛血清白蛋白（BSA）标准品

管号	稀释液的体积（uL）	2 mg/mL BSA 标准品用量（uL）	BSA 标准品最终浓度（ug/mL）
A	0	200 uL原液	2000
B	100	300 uL原液	1500
C	200	200 uL原液	1000
D	200	200 uL B管稀释液	750
E	200	200 uL C管稀释液	500
F	200	200 uL E管稀释液	250
G	200	200 uL F管稀释液	125
H	200	50 uL G管稀释液	25
I	200	0	0（空白）

2. 配制BCA工作液

（1）计算所需BCA工作液总体积：

所需BCA工作液总体积=（BSA标准品样本个数+待测蛋白样本的个数）×实验重复次数×用于每个样本的BCA工作液体积。

注意： 在96孔微孔板方案中，每个样本需要200 uL BCA工作液。

（2）按所需BCA工作液总体积，将50份 BCA试剂A液与1份BCA试剂B液混合（BCA试剂A液与B液的比例=50：1），充分混匀。例如5 mL BCA试剂A液 与100 uL BCA试剂B液混匀，配制成5.1 mL BCA工作液。

注意： 当BCA试剂B液加入BCA试剂A液时，会观察到深绿色浑浊，经混匀浑浊会迅速消失，得到绿色澄清工作液。BCA工作液储存于密闭容器中，在室温下可稳定保存24小时。

3. 蛋白浓度检测

（1）加入梯度稀释好的标准品和待测蛋白样品：将梯度稀释好的BSA标准品和待测蛋白样品各20 uL分别加入到做好标记的96孔微板孔中，推荐每个待测的样本做2-3个平行反应（根据样品的浓度，可提前稀释5-10倍使蛋白浓度在检测范围内）。

（2）加入BCA工作液：每孔加入200 uL BCA工作液，震荡30 s，充分混匀，盖上96孔板盖，37 ℃孵育30 min。

注意： 延长孵育时间或升高温度可使检测下限降至20 ug/mL以下，但检测范围会缩小。

（3）酶标仪读数：96孔微板孔冷却至室温，使用酶标仪测定562 nm或540-595 nm之间波长的吸光值。

（4）绘制标准曲线，计算待测蛋白样品浓度：首先将每个标准品和待测蛋白样品的吸光值减去空白标准品的吸光值进行空白校正，然后将校正后的BSA标准品吸光值对其浓度（ug/mL）绘制标准曲线，最后使用该标准曲线计算每个待测蛋白样品的浓度。

注意

1. 建议每次测定蛋白样品时，绘制标准曲线，获得更准确数据。
2. BSA 标准品稀释液需和待测样品的稀释液一致。

3. BCA 法测定蛋白浓度时，吸光值会随时间的延长不断加深，并且显色反应会因浓度升高而加快，如果浓度较低，适合较高温度孵育，或适当延长孵育时间。
4. 如果得到的蛋白浓度不在检测范围内，请重新稀释样品后再次测定。
5. 样品制备试剂盒产品提取的总蛋白通常浓度会较高，可提前稀释 5 -10 倍使蛋白浓度在检测范围内再进行BCA法蛋白定量。

问题解答

1. 哪些物质会干扰BCA定量分析的结果？
答： 各物质与BCA的兼容性浓度见表2，由表2可知干扰BCA定量分析的物质包括还原剂、螯合剂、强酸及强碱等，及浓度很低也可能会影响定量的结果。

表2 各物质与BCA的兼容性浓度

物质	兼容性浓度		物质	兼容性浓度	
	BCA	Bradford		BCA	Bradford
酸/碱			溶剂		
HCl	0.1 mol/L	0.1 mol/L	MDSO	10%	10%
NaOH	0.1 mol/L	0.1 mol/L	乙醇	10%	10%
高氯酸	<1%	NA	甘油	10%	10%
三氯乙酸	<1%	NA	盐酸胍	4.0 mol/L	3.5 mol/L
缓冲液/盐类			甲醇	10%	10%
硫酸铵	1.5 mol/L	1.0 mol/L	PMSF	1 mmol/L	1 mmol/L
硼酸盐	10 mmol/L	不稀释	蔗糖	40%	10%
甘氨酸	1 mmol/L	100 mmol/L	尿素	3.0 mol/L	3.0 mol/L
咪唑	100 mmol/L	100 mmol/L	去垢剂		
HEPES	50 mmol/L	200 mmol/L	Brij35	5%	0.125%
氯化钾	<10 mmol/L	1.0 mol/L	CHAPS	5%	5%
PBS	不稀释	不稀释	脱氧胆酸钠	5%	0.05%
乙酸钠	200 mmol/L	180 mmol/L	NP-40	5%	0.5%
叠氮钠	0.20%	0.50%	SDS	5%	0.125%
氯化钠	1.0 mol/L	5.0 mol/L	Triton X-100	5%	0.125%
三乙酸铵	25 mmol/L	NA	Tween-20	5%	0.062%
Tris	250 mmol/L	2.0 mol/L	螯合剂		
还原剂			EDTA	10 mmol/L	100 mmol/L
半胱氨酸	NA	10 mmol/L	EGTA	NA	2 mmol/L
DTT	1 mmol/L	5-1000 mmol/L	其他		
2-巯基乙醇	0.01%	1.0 mol/L	DNA	0.1 mg	0.25 mg
硫柳汞	0.01%	0.01%			

2. BCA法与Bradford法应如何选择？
答：主要由样本中干扰物质的兼容性浓度决定（参考表2）。如果待测蛋白样品中含有大量去垢剂且不含螯合剂和还原剂时，可选用BCA法；如果待测蛋白样品中含有螯合剂和还原剂，且不含有去垢剂时，可使用Bradford法。
3. Proteintech蛋白提取试剂盒产品提取的蛋白样品是否可以直接使用本BCA试剂盒蛋白定量？
答：Proteintech蛋白提取试剂盒产品如：细胞总蛋白提取试剂盒（货号：PK10020）、动物组织总蛋白提取试剂盒（货号：PK10021）、线粒体分离及蛋白提取试剂盒（货号：PK10016）、核蛋白与胞浆蛋白抽提试剂盒（货号：PK10014）、膜蛋白抽提试剂盒（货号：PK10015）、组蛋白抽提试剂盒（货号：PK10022）、磷酸化蛋白提取试剂盒（货号：PK10023）、易降解蛋白提取试剂盒（货号：PK10024）、血清血浆白蛋白去除试剂盒（货号：PK10025）等提取的蛋白样品经过稀释后（使蛋白浓度在在检测范围内）均可使用本BCA蛋白浓度检测试剂盒进行定量。
4. BCA法孵育时间和温度对检测结果有何影响？
答： 96孔微孔板方案中，推荐的37℃孵育30 min。当延长孵育时间或升高温度对于低浓度待测样品（20-100 ug/mL）的蛋白定量会更加精准，但检测范围会缩小，高浓度（1000-2000 ug/mL）之间的蛋白定量精度会下降。
5. BCA法待测样品加入的体积对检测结果有何影响？
答：BCA法待测样品加入的体积范围为10-25 uL，推荐最佳待测样品体积为20 uL。对于低浓度待测样品（20-100 ug/mL）的蛋白定量推荐可加入待测样品体积25 uL；对于高浓度待测样品（500-2000 ug/mL）的蛋白定量推荐可适当减少待测样品体积，最低不少于10 uL。但必须保持待测蛋白样品和BSA标准品的用量体积一致。