



BCA蛋白浓度测定试剂盒

BCA蛋白浓度测定试剂盒的原理是蛋白质分子中肽键结构在碱性环境下能与 Cu^{2+} 生产络合物，并将 Cu^{2+} 还原成 Cu^{+} ，而BCA试剂可以特异性地与 Cu^{+} 结合，形成稳定的有颜色的复合物，并在562nm处有最大的光吸收值，该复合物颜色的深浅与蛋白质浓度成正比，可以根据吸收值的大小来测定蛋白的含量。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。

- 1、灵敏度高，检测浓度下限达到25μg/ml（在50-1000μg/ml 浓度范围内有较好的线性关系），最小检测蛋白量达到0.5μg，待测样品体积为1-20μl。
- 2、速度快，显色所用时间短，比传统的Lowry 法检测速度约快4 倍。
- 3、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，β-巯基乙醇低于0.01%。

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。如，取50ml 试剂A 与1ml 试剂B 混合，配成51 ml BCA 工作液。两者混合时会有沉淀形成，彻底混匀后沉淀消失，注意需现配现用。

二、微孔板测定程序：（工作范围50-2000 μg/ml）

1、蛋白标准品配制：室温完全溶解BSA 蛋白标准液，取20 μ l 5mg/ml BSA 蛋白标准液用PBS 溶液稀释至100 μ l，使其终浓度为1 mg/ml。

2、按照下表配制BSA 标准测定溶液:

[illegible]

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 μl

4 向微孔板中加入200 μl BCA 工作液，混匀，37℃放置30 分钟；

注：也可以室温放置 2 小时，或 60℃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，适合在较高温度孵育，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，计算样品中的蛋白浓度。如果所得到的蛋白浓度不在标准曲线范围内，请稀释样品后重新测定。

三、试管测定程序：（工作范围 50-1000 μg/ml）

1、蛋白标准品配制：室温完全溶解蛋白标准品，取150μl 5mg/ml BSA 蛋白标准溶液，加入600μl PBS 溶液稀释至750μl，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 μl							5 mg/ml BSA 标准溶液 μl	
BSA 标准溶液 μl	0	2.5	12.5	25	50	75	100	30	40
PBS 溶液 μl	100	97.5	87.5	75	50	25	0	70	60
BSA 终浓度μg/ml	0	25	125	250	500	750	1000	1500	2000
总体积 μl	100 μl								

3、将适当体积的待测样品加入到试管中，并用PBS 补足到100 μl；

4、向试管中加入2ml BCA 工作液，混匀，37℃放置30 分钟；

5、步骤同上。

6、步骤同上。

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，请 37℃ 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、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。

4、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件：

试剂 A 和试剂 B 室温贮存；牛血清白蛋白标准溶液-20℃贮存；PBS 溶液4℃贮存。本试剂盒有效期1 年。