

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0470

Size: 100T/500T

BCA 蛋白含量检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

碱性条件下，蛋白将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ， Cu^+ 与 BCA 试剂形成紫蓝色的络合物，测定其在 562nm 处的吸收值，并与标准曲线对比，即可计算待测蛋白的浓度。

二、测定原理：

常用浓度的去垢剂 SDS, Triton X-100, Tween 不影响检测结果，但受螯合剂 (EDTA, EGTA)、还原剂 (DTT, 巯基乙醇) 和脂类的影响。实验中，若发现样品稀释液或裂解液本身背景值较高，可试用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (ZC-S0749)。

三、试剂的组成和配置：

种类	规格 (100T/500T)	储存条件	使用方法及注意事项
BCA 试剂 A	20ml/100ml	室温	
BCA 试剂 B	1ml/3ml	室温	
PBS 稀释液	30ml	室温	
BSA 蛋白标准 (5mg/ml BSA)	1ml	-20°C	

四、操作说明：

● 微孔酶标仪法：

1. 配制工作液：根据标准品和样品数量，按 50 体积 BCA 试剂加 1 体积 BCA 试剂 B (50:1) 配制成 BCA 工作液，充分混匀 (混合时可能会有浑浊，但混匀后就会消失)。BCA 工作液室温 24 小时内稳定。

2. 稀释标准品：取 10 微升 BSA 标准品用 PBS 稀释至 100 微升(样品一般可用 PBS 稀释)，使终浓度为 0.5mg/ml。将标准品按 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 微升加到 96 孔板的蛋白标准品孔中，加 PBS 补足至 20 微升(相当于标准品浓度分别为 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/ml)。

3. 将样品作适当稀释(最好多做几个梯度，如作 2 倍、4 倍、8 倍稀释)，加 20 微升到 96 孔板的样品孔中。由于移液器在取小量样品时误差偏大，标准线前面的点可能不很准确，所以尽可能的让样品点落在标准线 1/2 后。

4. 各孔加入 200 微升 BCA 工作液，37°C 放置 15-30 分钟。用酶标仪测定 A562nm，根据标准曲线计算出蛋白浓度。使用温箱孵育时，应注意防止因水分蒸发影响检测结果。

● 分光光度计法：

(如没有酶标仪，可用分光光度计在离心管中混匀后加入比色皿中比色。)

步骤如下：

1. 配制工作液：根据标准品和样品数量，按 50 体积 BCA 试剂加 1 体积 BCA 试剂 B (50:1) 配制成 BCA 工作液，充分混匀(混合时可能会有浑浊，但混匀后就会消失)。BCA 工作液室温 24 小时内稳定。

2. 稀释标准品：取 100 微升 BSA 标准品用 PBS 稀释至 1ml (样品一般可用 PBS 稀释)，使终浓度为 0.5mg/ml。

3. 取八支(或者更多) 5ml 离心管，标上号，按下表加入试剂。

离心管号	1	2	3	4	5	6	7 (样品管 1)	8 (样品管 2)	9 (样品管 3)
标准蛋白 BSA	0	40ul	80ul	120ul	160ul	200ul	200ul 适当稀释的样品 1	200ul 适当稀释的样品 2
PBS	200ul	160ul	120ul	80ul	40ul	0	0	0	0
BCA 工作液	2ml	2ml	2ml						

4. 37°C 放置 15-30 分钟。用分光光度计测 562nm 处吸光值，根据标准曲线计算出蛋白浓度

五、注意事项：

1. 长期不用时，Cu 试剂与 PBS 稀释液可置于 2-8°C 保存，如发现细菌污染则应丢弃。BCA 试剂在低温条件下出现结晶沉淀时，可 37°C 温育使其完全溶解，不影响使用。
2. 样品中若含有较多干扰物质时，请采用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (ZC-S0749)。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。