

BCA 蛋白定量试剂盒使用说明书

【产品名称】

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|---------|-----------------------|-------|
| EK-5001 | BCA Protein Assay Kit | 1000次 |

【包装规格】

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|----------------------|-------|
| EK-5001A | BCA 试剂 A | 200ml |
| EK-5001B | BCA 试剂 B | 10ml |
| EK-5001C | 蛋白标准品, 5mg/ml BSA 溶液 | 1ml |
| | 使用说明书 | 1 份 |

【保存条件】

BCA 试剂 A 室温避光保存 1 年

BCA 试剂 B 室温保存 1 年

蛋白标准品-20℃保存 1 年

【概述】

BCA 蛋白浓度测定试剂盒(BCA Protein Assay Kit)是根据目前世界上最常用的两种蛋白浓度检测方法之一 BCA 法研制而成, 实现了蛋白浓度测定的简单、高稳定性、高灵敏度和高兼容性。灵敏度高, 检测浓度下限达到 25 μ g/ml, 最小检测蛋白量达到 0.5 μ g, 待测样品体积为 1-20 μ l。在 50-2000 μ g/ml 浓度范围内有较好的线性关系。

BCA 法测定蛋白浓度不受绝大部分样品中的化学物质的影响, 可以兼容样品中高达 5%的 SDS, 5%的 Triton X-100, 5%的 Tween20、60、80。但本试剂盒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(DTT) 低于 1mM, β -巯基乙醇(β -Mercaptoethanol)低于 0.01%。不适用 BCA 法时建议试用本司生产的 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒。

【操作方法】

1.配制 BCA 工作液:

依据样品数量, 将试剂 A 和试剂 B 按体积比 50:1 配制适量 BCA 工作液, 并充分混匀。

注: 配制 BCA 工作液前请将试剂 A 摇晃混匀, 观察是否析出结晶, 如若析出结晶, 可 37℃水浴促溶。

2.稀释蛋白标准品:

蛋白样品在什么溶液中, 标准品也宜用什么溶液稀释。但是为了简便起见, 如果蛋白样品所在溶液不含有干扰本试剂盒检测的物质, 也可以用 0.9%NaCl、PBS 或水稀释标准品。蛋白标准液(5mg/ml BSA)如果冻

存，请完全融化并混匀后使用。具体如下表：

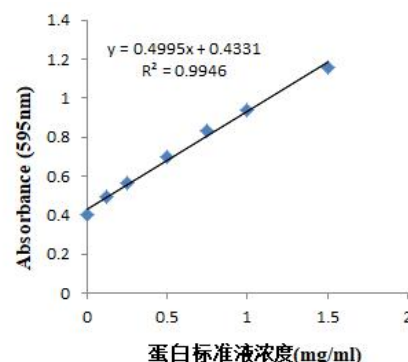
| 编号 | 稀释液体积 | 蛋白标准液体积 | 最终浓度 |
|----|------------|-----------------------|------------|
| A | 70 μ l | 5mg/ml BSA 30 μ l | 1.5mg/ml |
| B | 30 μ l | 从 A 管取 60 μ l | 1mg/ml |
| C | 20 μ l | 从 B 管取 60 μ l | 0.75mg/ml |
| D | 30 μ l | 从 C 管取 60 μ l | 0.5mg/ml |
| E | 60 μ l | 从 D 管取 60 μ l | 0.25mg/ml |
| F | 60 μ l | 从 E 管取 60 μ l | 0.125mg/ml |
| G | 60 μ l | 0 μ l | 0mg/ml |

3. 蛋白浓度的检测

- 取 5 μ l 不同浓度蛋白标准加到 96 孔板的蛋白标准孔中。
- 取 5 μ l 样品到 96 孔板的样品孔中。如果样品不足 5 μ l，需加标准品稀释液补足到 5 μ l。请注意记录样品体积。
- 各孔加入 195 μ l BCA 工作液。37 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟。
注：也可以室温放置 2 小时，或 60 $^{\circ}$ C 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。
- 用酶标仪测定 A595，或 560-610nm 之间的其它波长的吸光度。可以立即测定吸光度，也可以在 2 小时内测定，2 小时内检测数据无显著变化。

4. 数据计算

- 以不同浓度的蛋白标准液为横坐标
- 以不同浓度的蛋白标准测得 OD 值（多孔则为平均 OD）为纵坐标
- 建立线性关系，获得公式（如右图中所示（本产品实际检测），若测得样品 OD=0.6 则 $0.6=0.4995x+0.4151$ ，计算得浓度 $x=0.37\text{mg/ml}$ ）



【注意事项】

- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 不同 96 板的吸收值会有不同，得到 OD 有区别为正常现象（保证数据呈线性关系）。
- 蛋白标准液（5mg/ml）收到后尽快分装，避免反复冻融。
- BCA 试剂 A 在低温环境下会析出结晶，可适当 37 $^{\circ}$ C 水浴促溶后使用。
- 请使用 96 孔底部透明板（如普通细胞培养板）检测，最佳波长为 595nm。