

Version 1

Code No. AG21504

ProtQuanti BCA 蛋白定量试剂盒

ProtQuanti BCA Protein Quantification Kit

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本产品是基于 BCA 法 (Bicinchoninic Acid) 的蛋白质比色定量试剂盒, 原理是在碱性环境中, 蛋白质中的肽键可将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , 生成的 Cu^+ 与 BCA 试剂反应形成稳定的蓝紫色复合物, 在 562nm 处具有强吸收, 其吸光值与蛋白质浓度呈良好线性关系。

本产品提供两种测定模式: 标准浓度蛋白测定模式(简称: 标准测定模式) ($50 \sim 2000 \mu\text{g/ml}$) 与微量浓度蛋白测定模式(简称: 微量测定模式) ($< 50 \mu\text{g/ml}$), 请根据实验需求选择合适的测定模式。

本产品可用于微孔板法和比色皿法进行检测, 微孔板法操作简便、快速, 仅需少量的蛋白样品; 比色皿法需要相对较多的蛋白样品, 比色皿法因其光径比微孔板长, 所以灵敏度会优于微孔板法。

本产品对蛋白样品中含有表面活性剂 SDS、Triton X-100、Tween-20 等干扰物质耐受性强, 但不适合对含有还原剂或者螯合剂的蛋白质样品进行定量检测。检测蛋白样品中含不同干扰物质的最大耐受浓度见附录 1。

➤ 产品组成

组分名称 ^{*1}	AG21504 (500 rxns / 200 μl^2)
BCA Reagent A	100 ml
BCA Reagent B	3 ml
BSA Standard Solution (2 mg/ml)	1ml X 3 pcs

*1: 组分中 BCA Reagent A 与 BCA Reagent B 包装于 Package 2-1 中, 放置于室温($15 \sim 30^\circ\text{C}$) 保存, BSA Standard Solution (2 mg/ml) 包装于 Package 2-2 中, 放置于 4°C 保存。

*2: 使用微孔板法 (200 μl 反应体系), 本产品可进行 500 次反应。

➤ 保存及运输

保存温度: Package 2-1: 室温 ($15 \sim 30^\circ\text{C}$) 保存;

Package 2-2: 4°C 保存;

运输温度: Package 2-1: 常温运输;

Package 2-2: 4°C 运输。

➤ 产品优势

1. 本产品灵敏度高, 线性范围广泛, 吸光值在 $5 \sim 2000 \mu\text{g/ml}$ 蛋白浓度范围内具有良好的线性关系, 但是不同蛋白检测的浓度下限可能会有区别。
2. 本产品兼容性强, 可同时兼容常量和微量蛋白样品的测定。
3. 本产品具有较强的抗干扰性能, 对多种化学物质的耐受性强。

➤ 使用注意事项

1. 测定蛋白浓度时，微孔板法（200 μ l 反应体系）可做 500 次反应，比色皿法（1 ml 反应体系）可做 100 次反应。
2. 最佳测定波长为 562 nm，可使用酶标仪或分光光度计进行测定。
3. 本产品中 BCA Reagent A、BCA Reagent B 低温下可能会产生沉淀，使用前轻轻上下颠倒混匀使沉淀溶解，或 37°C 水浴加热使沉淀完全溶解后再使用。
4. 本产品中 BSA Standard Solution 使用时，需要打开安瓿瓶将试剂及时转移至洁净的 1.5 ml 离心管中，混匀后使用，使用完后放于 4°C 保存。
5. 蛋白样品检测时，色素残留在比色皿上会影响样品的测定，需要用水充分冲洗干净后再使用。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

微孔板（搭配酶标仪使用）或比色皿（搭配分光光度计使用）、15 ml 或 50 ml 离心管、1.5 ml 或 2 ml 离心管等；

2. 仪器：

酶标仪或分光光度计、水浴锅或恒温培养箱、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机等。

➤ 操作方法

步骤一、测定方法与测定模式选择

本产品提供两种测定模式，分别为标准测定模式（50 ~ 2000 μ g/ml）与微量测定模式（< 50 μ g/ml），两种测定模式均可使用酶标仪或分光光度计进行蛋白浓度测定，可以根据实验的需求进行选择，具体测定参数如下：

测定方法	测定模式	标准测定模式	微量测定模式
微孔板法	蛋白：BCA 工作液（v/v）	1 : 8	1 : 1
（搭配酶标仪）	反应条件 ^{*1}	37°C，30min ^{*2}	60°C，60min
比色皿法	蛋白：BCA 工作液（v/v）	1 : 20	1 : 1
（搭配分光光度计）	反应条件 ^{*3}	37°C，30min ^{*2}	60°C，60min

*1：微孔板法反应条件：建议使用恒温培养箱进行反应。

*2：当蛋白样品浓度为 50 ~ 250 μ g/ml 时，**建议反应条件为：60°C，60min。**

*3：比色皿法反应条件：可以使用恒温培养箱或者水浴锅进行反应。

步骤二、配制标准曲线

1. 标准测定模式 BSA 标准曲线制备 (测定范围: 50 ~ 2000 $\mu\text{g/ml}$)

- a) **标准曲线一**、当蛋白样品浓度为 250 ~ 2000 $\mu\text{g/ml}$ 时^{*1}, 按照下表进行 BSA Standard Solution 的稀释, BSA Standard Solution 可使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS 进行稀释。

编号	稀释液 (μl)	BSA Standard Solution (2mg/ml) (μl)	BSA 终浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
A	120	0	0 (Blank)
B	117	3	50
C	105	15	250
D	90	30	500
E	75	45	750
F	60	60	1000
G	30	90	1500
H	0	120	2000

*1: 此时反应条件为 37°C, 30min。

- b) **标准曲线二**、当蛋白样品浓度为 50 ~ 250 $\mu\text{g/ml}$ 时^{*2}, 首先需预先配制 250 $\mu\text{g/ml}$ BSA Standard Solution: 取 200 μl BSA Standard Solution (2 mg/ml), 加入 1400 μl 稀释液充分混合, 然后按照下表进行 BSA Standard Solution 的稀释, BSA Standard Solution 可使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS 进行稀释。

编号	稀释液 (μl)	250 $\mu\text{g/ml}$ BSA Standard Solution (μl)	BSA 终浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
A	500	0	0 (Blank)
B	480	20	10
C	460	40	20
D	400	100	50
E	300	200	100
F	200	300	150
G	100	400	200
H	0	500	250

*2: 此时反应条件为 60°C, 60min。

2. 微量测定模式 BSA 标准曲线制备 (测定范围: 0 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$)

首先需预先配制 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA Standard Solution: 取 100 μl BSA Standard Solution (2 mg/ml), 加入 1900 μl 稀释液充分混合, 然后按照下表进行 BSA Standard Solution 的稀释, BSA Standard Solution 可使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS 进行稀释。

编号	稀释液 (μl)	100 $\mu\text{g/ml}$ BSA Standard Solution (μl)	BSA 终浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
A	1000	0	0 (Blank)
B	990	10	1
C	975	25	2.5
D	950	50	5
E	900	100	10
F	800	200	20
G	600	400	40
H	500	500	50

步骤三、配制 BCA 工作液

- 按照 BCA Reagent A : BCA Reagent B = 50 : 1 的比例进行混合 (例如: 配制 5 ml 的工作液时, 在 5 ml 的 BCA Reagent A 中添加 0.1 ml 的 BCA Reagent B) 充分振荡混匀, 配制后的 BCA 工作液可 4°C 保存 3 天。

所需反应液的计算方法如下:

BCA 工作液总体积(μl):

【(BSA 标准蛋白 8 份+检测样品) $\times$ 平行数 $n+1$ 余量】 $\times$ 1 个样品所需工作液体积
例:

a) 如果使用微孔板法 (200 μl 反应体系) 进行测定:

- 1) 采用标准测定模式检测 2 个样品, 平行数 $n = 2$ 时:

$$\text{BCA 工作液总体积} = [(8+2) \times 2+1] \times 200 \mu\text{l}^{*1} = 4200 \mu\text{l}$$

注*1: 200 μl BCA 工作液中加入 25 μl 蛋白样品。

- 2) 采用微量测定模式检测 2 个样品, 平行数 $n=2$ 时:

$$\text{BCA 工作液总体积} = [(8+2) \times 2+1] \times 100 \mu\text{l}^{*2} = 2100 \mu\text{l}$$

注*2: 100 μl BCA 工作液中加入 100 μl 蛋白样品。

b) 如果使用比色皿法 (1ml 体系) 进行测定:

- 说明: 该体系是使用 1ml 比色皿进行实验, 也可选择其他比色皿, 此时 BCA 工作液的体积等比例放大或者缩小即可。

- 1) 采用标准测定模式检测 2 个样品，平行数 $n = 2$ 时：

$$\text{BCA 工作液总体积} = [(8+2) \times 2+1] \times 1 \text{ ml}^3 = 21 \text{ ml}$$

注*3: 1 ml BCA 工作液中加入 50 μl 蛋白样品。

- 2) 采用微量测定模式检测 2 个样品，平行数 $n = 2$ 时：

$$\text{BCA 工作液总体积} = [(8+2) \times 2+1] \times 0.5 \text{ ml}^4 = 10.5 \text{ ml}$$

注*4: 0.5 ml BCA 工作液中加入 0.5 ml 蛋白样品。

步骤四、测定蛋白质浓度

说明：待测蛋白进行浓度测定时，需要同时检测待测蛋白的保存液用于扣除空白，待测蛋白如果使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS 稀释后进行浓度测定，其蛋白保存液也需使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS 稀释同样的倍数后进行测定用于扣除空白。

1. 使用微孔板法（200 μl 反应体系）进行测定

a) 标准测定模式（蛋白：BCA 工作液体积比为 1:8）

- 1) 在微孔板各孔中加入 25 μl 稀释好的不同浓度 BSA 标准品蛋白、待测蛋白样品与待测蛋白保存液（用于待测蛋白浓度计算时扣除空白）；
- 2) 加入 200 μl 上述“步骤三”配制的 BCA 工作液，立即使用移液枪吹打或振荡器振荡混匀，注意尽量不要产生气泡，盖上微孔板盖；
- 3) 参考“步骤一”测定方法与测定模式选择合适的设备及反应条件进行反应；
- 4) 反应结束后，将样品放置室温至温度稳定（ $\sim 5 \text{ min}$ ），用酶标仪测定 562 nm 处样品的吸光值；
 - 注意：尽可能在 20 分钟内检测完所有样品。
- 5) 将各浓度 BSA 标准品的吸光度值减去“Blank”吸光度值的平均值，绘制 BSA 标准品的标准曲线；
- 6) 待测蛋白样品溶液的吸光度值减去待测蛋白保存液的吸光度值的平均值，根据 BSA 标准曲线可计算出检测样品的蛋白浓度。

b) 微量测定模式（蛋白：BCA 工作液体积比为 1:1）

- 1) 在微孔板各孔中加入 100 μl 稀释好的不同浓度 BSA 标准品蛋白、待测蛋白样品与待测蛋白保存液（用于待测蛋白浓度计算时扣除空白）；
- 2) 加入 100 μl 上述“步骤三”中配制的 BCA 工作液，立即使用移液枪吹打或振荡器振荡混匀，注意尽量不要产生气泡，盖上微孔板；
- 3) 参考“步骤一”测定方法与测定模式选择合适的设备及反应条件进行反应；
- 4) 反应结束后，将样品放置室温至温度稳定（ $\sim 5 \text{ min}$ ），用酶标仪测定 562 nm 处样品的吸光值；
 - 注意：尽可能在 20 分钟内检测完所有样品。

- 5) 将各浓度 BSA 标准品的吸光度值减去 “Blank” 吸光度值的平均值，绘制 BSA 标准品的标准曲线；
- 6) 待测蛋白样品溶液的吸光度值减去待测蛋白保存液的吸光度值的平均值，根据 BSA 标准曲线可计算出检测样品的蛋白浓度。

2. 如果使用比色皿法（1ml 体系）进行测定

a) 标准模式检测（蛋白：BCA 工作液体积比为 1：20）

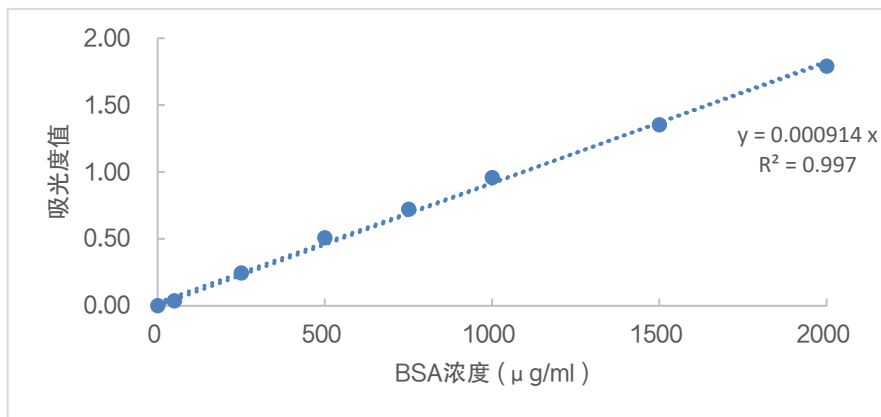
- 1) 在反应管中加入 50 μ l 稀释好的不同浓度 BSA 标准品蛋白、待测蛋白样品与待测蛋白保存液（用于待测蛋白浓度计算时扣除空白）；
- 2) 加入 1ml 上述“步骤三”中配制的 BCA 工作液，立即使用移液枪吹打或振荡器振荡混匀，注意尽量不要产生气泡；
- 3) 参考“步骤一”测定方法与测定模式选择选择合适的设备及反应条件进行反应；
- 4) 反应结束后，将样品放置室温至温度稳定（ ~ 5 min），用分光光度计测定 562 nm 处样品的吸光值；
 - 注意：尽可能在 20 分钟内检测完所有样品。
- 5) 将各浓度 BSA 标准品的吸光度值减去 “Blank” 吸光度值的平均值，绘制 BSA 标准品的标准曲线；
- 6) 待测蛋白样品溶液的吸光度值减去待测蛋白保存液的吸光度值的平均值，根据 BSA 标准曲线可计算出检测样品的蛋白浓度。

b) 微量模式检测（蛋白：BCA 工作液体积比为 1：1）

- 1) 在微孔板各孔中加入 0.5 ml 稀释好的不同浓度 BSA 标准品蛋白、待测蛋白样品与待测蛋白保存液（用于待测蛋白浓度计算时扣除空白）；
- 2) 加入 0.5 ml 上述“步骤三”中配制的 BCA 工作液，立即使用移液枪吹打或振荡器振荡混匀，注意尽量不要产生气泡；
- 3) 参考“步骤一”测定方法与测定模式选择合适的设备及反应条件进行反应；
- 4) 反应结束后，将样品放置室温至温度稳定（ ~ 5 min），用酶标仪测定 562 nm 处样品的吸光值；
 - 注意：尽可能在 20 分钟内检测完所有样品。
- 5) 将各浓度 BSA 标准品的吸光度值减去 “Blank” 吸光度值的平均值，绘制 BSA 标准品的标准曲线；
- 6) 待测蛋白样品溶液的吸光度值减去待测蛋白保存液的吸光度值的平均值，根据 BSA 标准曲线可计算出检测样品的蛋白浓度。

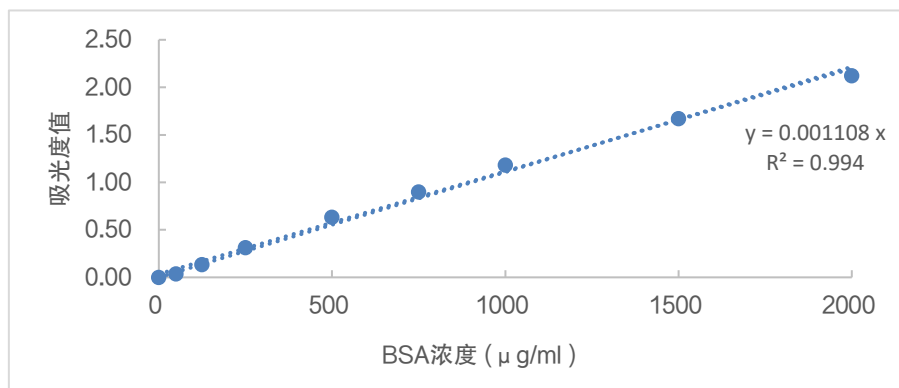
➤ 实验例

实验例一、使用微孔板法标准测定模式(测定范围：250 ~ 2000 $\mu\text{g/ml}$) 对不同 BSA 浓度进行测定 (反应条件：37°C, 30 min)，并绘制标曲，标曲如下图所示：



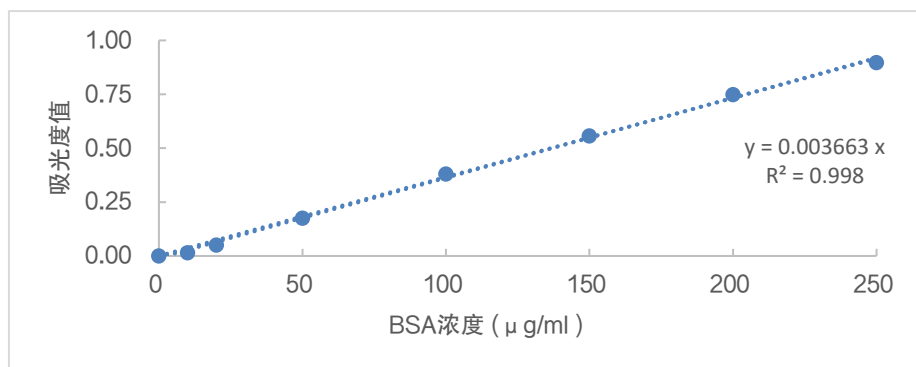
结果如上图所示：使用微孔板法标准测定模式进行 BSA 标曲测定，BSA 在 250 ~ 2000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内呈现良好的线型关系。

实验例二、使用比色皿法标准测定模式(测定范围：250 ~ 2000 $\mu\text{g/ml}$) 对不同 BSA 浓度进行测定 (反应条件：37°C, 30 min)，并绘制标曲，标曲如下图所示：



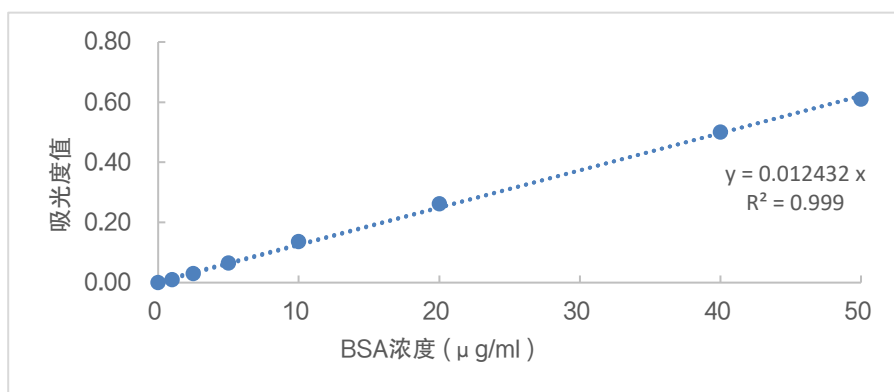
结果如上图所示：使用比色皿法标准测定模式进行 BSA 标曲测定，BSA 在 250 ~ 2000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内呈现良好的线型关系。

实验例三、使用微孔板法标准测定模式(测定范围：50 ~ 250 $\mu\text{g/ml}$) 对不同 BSA 浓度进行测定 (反应条件：60°C, 60 min)，并绘制标曲，标曲如下图所示：



结果如上图所示：使用微孔板法标准测定模式进行 BSA 标曲测定，BSA 在 50 ~ 250 μg/ml 浓度范围内呈现良好的线型关系。

实验例四、使用微孔板法微量测定模式(测定范围：0 ~ 50 μg/ml) 对不同 BSA 浓度进行测定（反应条件：60℃，60 min），并绘制标曲，标曲如下图所示：



结果如上图所示：使用微孔板法微量测定模式进行 BSA 标曲测定，BSA 在 0 ~ 50 μg/ml 浓度范围内呈现良好的线型关系。

➤ 产品注意事项

- ❖ 本产品测定蛋白时，反应的颜色与反应温度和反应时间均相关，因此需注意定时和控温，为准确定量建议每次测定都需做标准曲线。
- ❖ 蛋白样品中含有干扰物质导致测定的背景值较高时，可将蛋白样品稀释合适的倍数后进行测定，或选择 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒进行测定。
- ❖ 蛋白浓度较高时，建议将蛋白使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS 进行稀释后测定，其对应的用于扣除空白的蛋白保存液也需使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS 稀释同样的倍数后进行测定。
- ❖ 本产品中 BCA Reagent A、BCA Reagent B 如发现细菌污染，则应丢弃，避免对实验结果造成影响。
- ❖ 标准测定模式下“标准曲线一”稀释的不同浓度 BSA 可 4℃ 暂存 1 周，标准测定模式中“标准曲线二”与微量测定模式下稀释的不同浓度 BSA 建议现稀释现用。

➤ 附录 1

- ❖ 本产品一般不受表面活性剂及各种缓冲液的影响，但各种兼容试剂浓度过高可能会影响其测定结果。下表为标准测定浓度模式下（蛋白：BCA 工作液体积比为 1：8）使用比色皿法测定干扰物质最大耐受浓度。

化合物	耐受浓度*1	化合物	耐受浓度
盐离子及 buffer 类		螯合剂	
Calcium chloride	10 mM	EDTA	10 mM
Sodium chloride	1 M	还原剂	
Magnesium chloride	10 mM	Dithiothreitol (DTT)	1 mM
Ammonium sulfate	0.15 M	Glucose	10 mM
NaPB, pH7.0	100 mM	有机试剂	
Sodium citrate	100 mM	Glycerol	50%
Tris-HCl	50 mM	DMSO	10%
MOPS	100 mM	Methanol	10%
Sodium borate	50 mM	Ethanol	10%
HEPES-KOH, pH7.5	100 mM	其他试剂	
Imidazole	50 mM	Glycerol	50%
表面活性剂		Hydrochloric acid	100 mM
IGEPAL CA-630	5%	Urea	3 M
Triton X-100	5%	PMSF	1 mM
Tween-20	5%		

注*1：此耐受浓度指蛋白样品所含干扰物质浓度。