

天
净
沙
系
列

CAT#:80815-500

常温运输及保存, BSA 需低温运输

TIANDZ

BCA 法蛋白定量试剂盒

BCA Protein Assay Kit

使用手册 V1.2

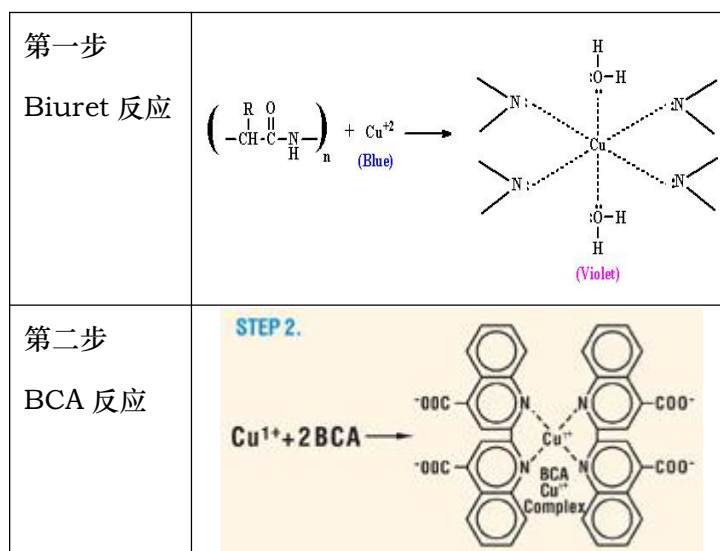
北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点

本产品是基于 BCA 法 (bicinchoninic acid, 二奎啉甲酸法) 蛋白检测原理开发的蛋白质浓度测定产品, BCA 法跟 Lowry 法的第一步完全相同, 就是在碱性条件下, 蓝色的 Cu^{2+} 被蛋白质还原成紫色的 Cu^+ 。此反应类似 Cu^{2+} 与 Biuret ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$, 双缩尿) 发生的反应, 故又叫 Biuret 反应 (Biuret 反应本省就可以测定蛋白质浓度, 目前仍然是医院血液蛋白定量的方法)。第二步, Cu^+ 与 BCA 发生反应形成水溶性的紫色化合物, 通过分光在 562 nm 处测定紫色化合物的量就可以精确量蛋白质浓度。BCA 检测灵敏度比 Biuret 反应高 100 倍左右。



此方法的特点如下。

1. 对各种常见的去污剂不敏感, 但对 Cu 的还原剂和螯合剂比较敏感。
2. 比 Lowry 法更加简单快捷, 45 分钟内完成测定。
3. 试剂稳定, 室温可以放置两年。工作液 1 天内有效。
4. 线性范围在 20~2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。如果需要范围在 0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 需要选用超敏 BCA。
5. 最小测量体积为 1-20 μL 。
6. 终产物稳定, 变异系数远小于考马斯亮蓝法蛋白定量。
7. 可以检测最短到双肽, 而 Bradford 法需要一定大小的蛋白质。
8. 有常规 (试管) 和微量 (96 孔板) 两种检测模式。

规格及成分

成份	编号	小扁盒包装
BCA 法蛋白定量试剂盒溶液 A	80815a	100 mL
BCA 法蛋白定量试剂盒溶液 B	80815b	2 mL
BSA 标准品 (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	131070	1 mL
使用手册	80815sc	1 份

运输及保存

常温运输和保存, 但 BSA 标准品需要低温运输, -20°C 保存, 有效期两年。

自备试剂	样品缓冲液																																																																		
使用方法	<p>一：96 板操作模式</p> <p>1、 取一块 96 孔板，先进行编号（编号可以根据样品数增加），并按照下表加入 BSA 标准，待测样品和溶解待测样品的缓冲液(可以用水替代)：</p> <table border="1" data-bbox="475 353 1453 1055"> <thead> <tr> <th>编号</th> <th>BSA 标准 (2ug/μL)</th> <th>待测样品 (μL)</th> <th>样品缓冲液 (μL)</th> <th>总体积 (μL)</th> <th>蛋白含量 (μg)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>20</td><td>20</td><td>0</td></tr> <tr><td>1</td><td>1</td><td>0</td><td>19</td><td>20</td><td>2.0</td></tr> <tr><td>2</td><td>2</td><td>0</td><td>18</td><td>20</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>4</td><td>0</td><td>16</td><td>20</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>4</td><td>8</td><td>0</td><td>12</td><td>20</td><td>16.0</td></tr> <tr><td>5</td><td>12</td><td>0</td><td>8</td><td>20</td><td>24.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>16</td><td>0</td><td>4</td><td>20</td><td>32.0</td></tr> <tr><td>7</td><td>20</td><td>0</td><td>0</td><td>20</td><td>40.0</td></tr> <tr><td>样品 1</td><td>0</td><td>X</td><td>补到 20</td><td>20</td><td>未知</td></tr> <tr><td>样品 N</td><td>0</td><td>Y</td><td>补到 20</td><td>20</td><td>未知</td></tr> </tbody> </table> <p>2、 计算 BCA 工作液需要量：根据样品数量（包括制备标准曲线的样品的数量）和每个样品需要 0.2 mL BCA 工作液的比例，计算所需 BCA 工作液的用量，然后加上 10%损耗作为实际需要配制的量。例如：计算出需要 5mL 工作液，实际按不少于 5.5 mL 的量配制。</p> <p>3、 配制 BCA 工作液：按 50 体积溶液 A 加 1 体积溶液 B (50:1) 的比例将二者充分混合，所得溶液即 BCA 工作液。比如：5 ml 溶液 A + 100 μl 溶液 B。注意：取用溶液 A 和溶液 B 前需要充分摇匀，溶液 B 非常容易形成沉淀，需要 65$^{\circ}$C 加热溶解后才能使用。当把溶液 B 刚加入到溶液 A 中时，最初会出现淡绿色沉淀，轻微晃动沉淀即会消失，工作液最后成绿色，可以室温放置 12 天，但需要将容器的盖子拧紧。</p> <p>4、 将 10 倍体积 (20μL 的 10 倍体积即 0.2 mL) 的 BCA 工作液加入到各孔中并混匀。也可把 96 孔板放在振荡器上振荡 30 秒混匀。</p> <p>5、 37$^{\circ}$C 放置 30 分钟。</p> <p>6、 冷至室温，10 分钟内完成后续测定，否则化学反应还在继续进行，使光吸收值慢慢升高，每 10 分钟会升高 2.5%左右。</p> <p>7、 在 562 nm 下比色测定样品的光吸收。如酶标仪没有 562 nm 的设定，可用接近的波长检测，如 570 nm。</p> <p>8、 将编号为 0 号的样品（对照）的读数从其余所有样品（包括 0 号样品，其读</p>	编号	BSA 标准 (2ug/ μ L)	待测样品 (μ L)	样品缓冲液 (μ L)	总体积 (μ L)	蛋白含量 (μ g)	0	0	0	20	20	0	1	1	0	19	20	2.0	2	2	0	18	20	4.0	3	4	0	16	20	8.0	4	8	0	12	20	16.0	5	12	0	8	20	24.0	6	16	0	4	20	32.0	7	20	0	0	20	40.0	样品 1	0	X	补到 20	20	未知	样品 N	0	Y	补到 20	20	未知
编号	BSA 标准 (2ug/ μ L)	待测样品 (μ L)	样品缓冲液 (μ L)	总体积 (μ L)	蛋白含量 (μ g)																																																														
0	0	0	20	20	0																																																														
1	1	0	19	20	2.0																																																														
2	2	0	18	20	4.0																																																														
3	4	0	16	20	8.0																																																														
4	8	0	12	20	16.0																																																														
5	12	0	8	20	24.0																																																														
6	16	0	4	20	32.0																																																														
7	20	0	0	20	40.0																																																														
样品 1	0	X	补到 20	20	未知																																																														
样品 N	0	Y	补到 20	20	未知																																																														

数变成零) 中扣除。

- 以 0-7 号样品的 BSA 含量 (μg , 见上表最右行) 为横坐标, 以样品的吸光值为纵坐标, 绘出 BSA 的标准曲线。
- 再将待测样品的吸光值 (减去 0 号样品的读数后的值) 标在标准曲线上, 其在横坐标上对应的蛋白含量 (μg) 就是待测样品中的蛋白质含量, 除以样品稀释液总体积 ($20\ \mu\text{L}$), 乘以样品稀释倍数即为样品浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。

二: 试管测定模式

- 基本操作同上, 只是操作改在编号的玻璃试管中进行, 同时 BSA 标准品 ($2\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 的使用量从低到高改为 0、5、10、20、40、60、80、100 μL , 样品的总体积从 20 μL 改为 100 μL , BCA 工作液的用量从每个样品 0.2 mL 改为 2 mL。

三: 注意事项

- BCA 法测定蛋白浓度时, 吸光度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。所以, 如果蛋白质浓度较低, 可以改在 60°C 孵育 30 分钟或更长。
- 待测样品浓度在 20~2000 微克/毫升浓度范围内有较好的线性关系。
- 在一定浓度范围内 BCA 法测定蛋白浓度不受下列化学物质的影响:

名称	在此浓度下不受影响
Ammonium Sulfate	1.5 M
Brij-35	5.0%
CHAPS	5.0%
EDTA	10 mM
Hepes	100 mM
Glycine, pH 2.8	100 mM
Guanidine HCl	4.0 M
Tween 20、60、80	5.0%
SDS	5.0%
Sodium Acetate pH 5.5	200 mM
Sodium Chloride (NaCl)	1.0 M
Sucrose	40%
Sodium Hydroxide (NaOH)	0.1 M
NP-40	5.0%
Triton X-100	5.0%
Urea	3.0 M

- 本方法受样品中螯合剂和还原剂的影响, 所以需确保 EDTA 浓度不高于 10mM, 二硫苏糖醇不高于 1mM, β -巯基乙醇不高于 1mM, 没有任何 EGTA, 否则建议使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (CAT#:80815)。

相关产品

超敏型 BCA 法蛋白定量试剂盒 (CAT#:80816)