天净沙系列

CAT#:220998

常温运输和保存，BSA 需低温运输

天净沙

蛋白浓度测定试剂盒（BCA 超敏法）

Protein Assay Kit (Hypersensitive BCA Method)

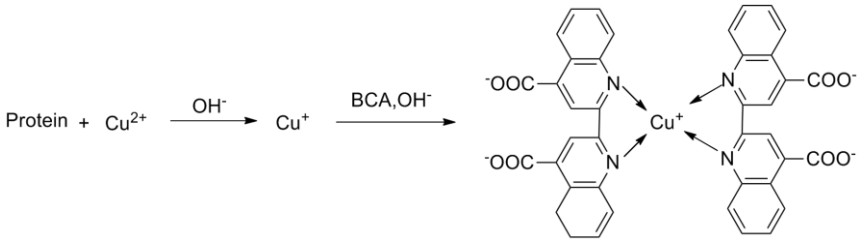
使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是在 BCA 法蛋白定量试剂盒基础上改进的超敏蛋白定量试剂盒，尤其适合对低浓度的蛋白质溶液进行定量分析。其原理是蛋白质分子在碱性条件下将二价 Cu 离子还原为一价 Cu 离子（双缩脲反应），一个一价 Cu 离子再与二个 BCA 分子螯合产生一种在吸收波长为 562 nm 的紫色水溶性产物，根据紫色水溶性产物的浓度反推出蛋白质的浓度。BCA 法原理示意图如下：



本产品具有下列特点。

1. 超敏感，最低检测浓度为 0.5 μg/mL。
2. 线性范围在 0.5～20 μg/mL，尤其适用于低浓度的样品。
3. 对大多数离子型和非离子型去污剂不敏感，但对 Cu 的还原剂和螯合剂敏感。
4. 比 Lowry 法更加简单快捷，45 分钟内完成测定。
5. 试剂稳定，但工作液 1 天内有效。
6. 终产物稳定，检测不同蛋白质分子的变异系数远小于考马斯亮蓝法蛋白定量。
7. 最短可以检测双肽，所以适合于分子量较小的蛋白质，而 Bradford 法需要一定大小的蛋白质。
8. 本产品不能用于测定含有 DTT 等还原剂的蛋白溶液。
9. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
超敏 BCA 蛋白定量溶液 A	220998a	50 mL	60 mL 本色瓶
超敏 BCA 蛋白定量溶液 B	220998b	50 mL	60 mL 本色瓶
超敏 BCA 蛋白定量溶液 C	220998c	2 mL	2 mL 棕色管
牛血清白蛋白（BSA）标准品 (2 mg/mL)	220565	1 mL	1.5 mL 本色管
使用手册	220998sc	1 份	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℃保存，有效期一年。

自备试剂

样品缓冲液

使用方法

1. 用合适的方法制备待测蛋白样品，并把蛋白质溶解在合适的样品缓冲液中。本检测方法受待测样品中螯合剂和还原剂的影响，所以需确保待测蛋白溶液中 EDTA 的终浓度不高于 10 mM、二硫苏糖醇不高于 1 mM、β-巯基乙醇不高于 1 mM，没有任何 EGTA。如果达不达上述要求，则需要稀释样品，使其浓度降低到上述浓度之下。
2. 将本试剂盒提供的 BSA 标准品（2 mg/mL）10 μL 和 490 μL 自备的样品缓冲液（用于溶解待测样品的溶液）混合，得到 500 μL 浓度为 0.04 μg/μL 的 BSA 工作液，放冰上待用，用于制备标准曲线。上述量足够一次实验使用。此 BSA 工作液每次实验均需要新鲜配制。
3. 配制超敏 BCA 工作液：先计算一次检测所需 BSA 工作液的体积。如果有 N 个样品，每个样品只做一次重复，再加上 7 个标准曲线样品，一般多准备 10%的量，故一次检测所需 BSA 工作液的体积为：0.15 mL×（N+7）×110%。配制时将超敏型 BCA 蛋白定量溶液 A、超敏型 BCA 蛋白定量溶液 B 和超敏型 BCA 蛋白定量溶液 C 按 50:48:2 的比例混合得到到所需体积即可。如果需要 10 mL，则三种溶液体积分别为 5 mL、4.8 mL、0.2 mL，所得溶液即超敏 BCA 工作液。
4. 取一块 96 孔板，按下表加入上步新鲜制备的 BSA 工作液、N 个待测蛋白样品和自备样品缓冲液：

编号	BSA 工作液 (μL)	N 个待测样品（μL)	样品缓冲液 (μL)	总体积 (μL)	蛋白含量 (μg)
0	0	0	150	150	0
1	5	0	145	150	0.2
2	10	0	140	150	0.4
3	20	0	130	150	0.8
4	40	0	110	150	1.6
5	60	0	90	150	2.4
6	80	0	70	150	3.2
7	100	0	50	150	4.0
N 个待测样品	0	？μL	补到 150	150	待测

5. 在每个孔中（总体积为 150 μL）加入等体积的超敏 BCA 工作液并混匀。如果用排枪加入并混匀则更好。也可把 96 孔板放在振荡器上振荡 30 秒混匀。
6. 60℃放置 1 小时。本试剂受温度和时间影响较大，故需要准确定时和定温，以保证精确定量。

7. 冷至室温，迅速在 562 nm 下比色测定所有样品的光吸收。如酶标仪没有 562 nm 的设定，可用接近的波长检测，如 570 nm。测定操作最好在 10 分钟内完成，否则化学反应还在继续进行，光吸收值每 10 分钟会升高 2.5%左右。
8. 处理数据：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，其读数变成零）中扣除。
9. 制作标准曲线：以 0-7 号样品的 BSA 含量（单位μg，见上表最右行）为横坐标，0-7 号样品吸光值（扣除背景读数的）为纵坐标，绘出 BSA 的标准曲线。
10. 再将 N 个待测样品的吸光值（减去 0 号样品的读数后）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 μL），乘以样品稀释倍数即为样品实际浓度，单位为μg/μL。

二：注意事项

11. 第 5 步加 BCA 工作液后也可以在室温放置 2 小时，或 60℃放置 30 分钟。超敏 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℃孵育 60 分钟。
12. 待测样品浓度在 20～2000 μg/mL 范围时有较好的线性关系。
13. 超敏 BCA 法测定蛋白浓度时，不受下列化学物质的影响：

名称	浓度小于下面数值时不受影响
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

关联产品 BCA 法蛋白定量试剂盒