**增强型BCA试剂盒兼容物列表**

BCA蛋白定量试剂盒是一种基于二喹啉甲酸比色法的总蛋白检测和定量试剂盒，比Lowry法更为优越。BCA蛋白定量法以快速灵敏、稳定可靠且对不同种类蛋白质变异系数甚小而深受专业人士的青睐，样品中离子型和非离子型去污剂对其影响较小，检测不同蛋白质分子的变异系数远小于考马斯亮蓝。BCA法的原理：在碱性环境下，蛋白质将铜离子还原成亚铜离子，二喹啉甲酸（BCA）与亚铜离子形成紫色的络合物，这种络合物溶于水并在562nm处产生光吸收峰值，光吸收强度在一定范围内与蛋白质含量呈近似线性关系，因此使用比色法可以对蛋白质进行检测和定量。BCA法没有反应终点，反应会随着时间而持续进行；通过一段时间的孵育后，反应速度会变慢，从而可以对大量样品进行检测。

1. **BCA反应的干扰物**

一些物质可以干扰BCA反应，如还原剂、络合剂，以及强酸和强碱。样品中应避免含有这些物质：维生素C ，EGTA，铁，不纯的蔗糖，儿茶酚胺，不纯的甘油，脂类，色氨酸，肌酸酐，过氧化氢，蜜二糖，酪氨酸，半胱氨酸，酰肼类，酚红，尿酸。

还有一些物质对BCA反应干扰程度比较低，在一定浓度以下不会产生影响。下表列出了一些物质的最大兼容浓度。在列出的浓度下这些物质对试管法进行的BCA反应造成的误差不大于10%。提高样品与BCA工作液的比例会使得最大兼容浓度降低。不同物质对BCA反应的干扰可能会有叠加效应。

1. **如何去除干扰物或者将其干扰最小化**

可以使用以下方法中的一种去除干扰物或者降低干扰：

* 通过透析或凝胶过滤去除干扰物。
* 将样品稀释，直至BCA反应不再受到干扰。这个方法需要注意的是，稀释后的蛋白浓度须处于可检测范围内。
* 可参考本文的方法，用丙酮或三氯醋酸沉淀样品中的蛋白，去除含干扰物的上清后，将蛋白沉淀用水重新溶解，或者直接加入BCA工作液进行检测和定量。
* 提高工作液中铜离子的浓度，一些情况下可以消除铜离子络合剂的干扰。

**注意：**蛋白标准品应采用与待测样品同样的处理方式，这样可以使检测结果更准确。

1. **沉淀蛋白的方法**

TCA沉淀法

1、取500ul蛋白溶液，加入等体积预冷的20%TCA溶液，立刻混匀。

2、冰上放置30分钟。

3、4℃，13200r/min离心15分钟。

4、小心去除上清液，冷冻干燥沉淀，约1小时。

5、加入5ul PBS溶解沉淀。

三氯乙酸（TCA）沉淀蛋白质主要基于以下几个方面的作用：在酸性条件下TCA能与蛋白质形成不溶性盐；TCA作为蛋白质变性剂使蛋白质构象发生改变，暴露出较多的疏水性基团，使之聚集沉淀。

丙酮沉淀法

1、在-20℃预冷丙酮溶液。

2、500ul蛋白液放置于5ml管中，加入3ml预冷丙酮，迅速混匀，-20℃放置2小时以上或过夜。

3、4℃，13200r/min离心15分钟。

4、小心弃去上清液，注意勿接触沉淀。加入100ml冷的90%丙酮洗涤沉淀，4℃，13200r/min离心5分钟。

5、重复上一步再次洗涤沉淀。

6、弃去上清液，空气中干燥沉淀15-30分钟。

7、加入适量PBS溶解蛋白质沉淀。

丙酮沉淀蛋白质时，必须在0-4℃低温下进行。蛋白质被丙酮沉淀后，应立即分离，否则蛋白质会变性。

