BCA蛋白定量试剂盒

Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 货号 | 组份A | 组份B | BSA标准品 |  |
| PD-BCA-500 | 500 ml | 12 ml | 2 X 1 ml | 可供250个试管，或25块96孔板测试用 |

BSA标准品为5 mg/ml BSA，溶于水中，含0.05%叠氮钠。

**室温运输和储存。如因温度低或长时间放置出现沉淀，将其摇匀即可使用。BSA标准品保存在-20度，如出现微生物污染则应丢弃。**

**产品简介**

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。

在蛋白质的大分子结构中，与BCA反应颜色形成相关的是肽键和四种氨基酸（半胱氨酸，胱氨酸，色氨酸，以及酪氨酸）。对二肽、三肽和四肽的研究表明，反应颜色的形成不仅仅是单个的功能基团效果叠加的结果。因此，蛋白浓度通常是根据标准对照蛋白（常用牛血清白蛋白BSA）推测而来的，即：将标准对照蛋白的光吸收值做一个浓度梯度标准曲线，未知样品的光吸收值参照曲线方程计算出蛋白浓度值。

**标准蛋白和工作液的配制**

1. **配制牛血清白蛋白梯度：可参考下表来配制BSA浓度梯度，最好使用与待测样品相同的溶剂。可按比例放大或缩小，根据实际需要计算所需用量。**



1. **BCA工作液的配制**
	1. 根据需要测定的未知样品和蛋白标准品的数量以及复孔数来计算所需的BCA工作液体积。如使用试管进行测试，每管需2.0 mL工作液, 而使用96孔板进行测试则每孔需200 µl 工作液。
	2. 按 **组份A:组份B=50:1** 的比例配制BCA工作液。组份B加入组份A的时候，开始会出现浑浊并随着混匀很快消失，最终混匀后溶液呈苹果绿色。配置好的工作液在室温密闭的条件下24小时内稳定。

**操作步骤**

1. 如在试管中进行反应，取100 μL的BSA蛋白梯度或者待测样品，放入标记好的试管中，再每管加入2.0mL 工作液，充分混匀， 盖上盖子，并在选定的温度条件下孵育：
	* 室温: 室温孵育 2 hours (检测范围： 20-2000 g/mL)
	* 37度: 37°C 孵育30 minutes (检测范围： 20-2000 g/mL)
	* 60度： 60°C 孵育30 minutes (检测范围： 5-250 g/mL)

延长孵育时间会增加光吸收值；应使用水浴法加热，以使得温度均衡上升；用鼓风法升温会导致温度不均衡，使实验误差增大。

1. 如需在96孔板中进行反应，则每孔放入10 μL的BSA蛋白梯度或者待测样品，再加入200 μL工作液，充分混匀，37度孵育30分钟，检测范围为125-2000μg/mL；也可以将BSA蛋白梯度和待测样品提高到每孔25 μL，再加入200 μL工作液，充分混匀，37度孵育30分钟，此时检测范围为20-2000μg/mL，但是可能会较多受到样品中的干扰物质的干扰；应使用水浴法加热。
2. 将试管或96孔板冷却至室温。
3. 用分光光度计或酶标仪在562nm处读取光吸收值, 所有样品应在10分钟内读完。因为BCA反应没有终点，随着时间的推移光吸收值会继续上升，在10分钟内读完所有样品可以避免产生明显的误差。
4. 将BSA蛋白标准品和待测样品的光吸收值减去空白对照值，以得到的蛋白标准品光吸收值对蛋白浓度作标准曲线，根据这个曲线方程计算待测样品的蛋白浓度。

**注意事项：**

* + 测定蛋白浓度时，最好使未知样品的蛋白浓度处于标准拟合曲线的接近中间位置，这样获得的结果更准确。
	+ 通过增加孵育时间或者提高样品比例，可以提高光吸收值，从而检测更低的蛋白量，但是会缩小检测范围，可根据实际需要进行调整，同时注意不要超过仪器的检测上限。
	+ 最适检测波长为562nm。在540nm到590nm区间也可进行检测, 但标准曲线斜率和检测灵敏度都会有所降低。
	+ 酶标仪的检测光径比分光光度计的比色杯短，因而检测灵敏度有所降低。
	+ 对酶标仪的读数进行曲线拟合时， 采用four-parameter (quadratic) 或 best-fit curve 进行拟合可以获得比线性拟合更准确的结果；手工拟合时可采用线性拟合法。
	+ EDTA浓度必须小于10mM，不兼容EGTA。不适用BCA法时，请使用Bradford蛋白浓度测定法。
	+ 每种常用的总蛋白测定方法测定不同的蛋白时都有一些偏差。导致产生这些偏差的原因有：蛋白质的氨基酸序列，等电点，蛋白的结构，特定种类的氨基酸侧链和辅基。有些种类的氨基酸侧链和辅基能对显色反应产生很大的影响。大部分蛋白测定方法都使用牛血清白蛋白（BSA）或免疫球蛋白(IgG)作为标准品来制作标准曲线。如果需要特别精确的检测结果，可以使用待测蛋白的纯品来制作标准曲线。
	+ 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。还有一些物质干扰较小，只要不超过最大兼容浓度即不影响反应的进行。详见<http://www.biothrive.cn/Product/016975434.html>
	+ 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
	+ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**常见问题**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **问题** | **可能原因** | **解决办法** |
| 没有颜色 | 样品中含有铜离子络合剂 | 1，透析，脱盐，或稀释样品；或2，提高工作液中铜离子的浓度，如提高A:B至50:2；或3，使用蛋白沉淀法去除干扰物 |
| 空白对照孔光吸收值正常，但是蛋白标准品和待测样品光吸收值低于预期 | 样品所用溶剂是强酸碱性缓冲液，改变了工作液的pH值 | 透析，脱盐，或稀释样品 |
| 光吸收波长选择错误 | 在562nm读取光吸收值。 |
| 待测样品孔光吸收值高于预期 | 蛋白浓度过高 | 稀释样品 |
| 样品中含有脂类或脂蛋白 | 向样品中加入2% SDS以除去脂类干扰 |
| 使用蛋白沉淀法去除干扰物 |
| 所有孔，包括空白对照孔，呈暗紫色 | 缓冲液中含有还原剂 | 1,透析或稀释样品;或2，使用蛋白沉淀法去除干扰物 |
| 缓冲液中含有硫醇 |
| 缓冲液中含有生物胺(儿茶酚胺) |
| 需要用不同的波长读取光吸收值 | 酶标仪或分光光度计没有562nm滤光片 | 可以读取540nm到590nm区间的光吸收值, 但是标准曲线的斜率和检测灵敏度都会降低。 |