



BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒

试剂盒组成	GK3000	GK3001	储存温度
Solution A	100 ml	250 ml	室温
Solution B	5 ml	15 ml	室温
BSA Standard (0.5mg/ml)	2 ml	5 ml	室温

原理:

蛋白质中的肽键、半胱氨酸、胱氨酸、色氨酸、酪氨酸将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ , Cu^+ 与 Solution A 中的 Bichoninic Acid (BCA) 形成有色复合物。通过测定有色复合物 562nm 的可见光吸收来确定溶液蛋白质的浓度。

注意:

1. 反应颜色的深浅除了与样品的蛋白质浓度相关外, 还与反应的温度有关。如果样品的浓度较高 ($>50\mu\text{g/ml}$), 反应温度一般采用 37 度, 但是色氨酸、酪氨酸和肽键在该温度下得不到彻底的氧化。如果样品蛋白质的浓度较低 ($<50\mu\text{g}$), 反应的温度为 60 度, 该温度下, 色氨酸、酪氨酸和肽键得到充分氧化, 大大提高检测灵敏度。
2. 37 度该方法检测的蛋白质浓度范围 $20\mu\text{g}-500\mu\text{g/ml}$; 60 度 (增强法) 可以检测的 $5\mu\text{g/ml}$ 。
3. Solution A 和 B 在室温的稳定期至少 1 年以上。
4. 化学兼容性 (下列物质如果低于指定浓度将不会干扰测定): 5% NP40、10mM EDTA、1 M NaCl、0.2M NaAc, pH5.5、5% SDS、5% Brij-35、5% CHAPS、0.1M HEPES、4M Guanidine-HCl、5% Triton X-100、3M Urea、250 mM Tris、100mM PIPES、50mM Imidazole、10mM Glucose、10% Glycerol(Fresh)、40% Sucrose、50mM NaOH、1mMDTT、1mMDTE、1.5mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
5. 下列化学试剂将干扰测定: Cysteine, EGTA, Phenol Red, Hydrazides 等。通过透析, 层析过滤, TCA 沉淀, 如果样品浓度高稀释等手段降低干扰。
6. Solution A 和 Solution B 按比例混匀后的混合物, 需要在 24 小时内使用。
7. 使用 0.5ml (玻璃) 或更小的比色杯, 可以节省试剂和增加检测的样品数。
8. 标准 BSA 的标定: 1mg/ml BSA 在 280nm 的吸收 0.66。

测定方法(试管法):

1. 据样品的数目和蛋白质的浓度, 准备 37C 或 60C 水浴; 按每给反应使用 0.5ml Solution A, 0.01ml Solution B 准备 A+B 混合液: 50 份 Solution A + 1 份 Solution B, 混匀后使用。该混合液需要在 24 小时内用完。注意: 每给测定要做 2-3 个平行反应, 即每个样品需要 1.5ml Solution A 和 0.03ml Solution B。注意: 本处采用的比色体系需要用 0.5ml 的比色杯; 如果没有 0.5ml 比色杯, 反应体系需要放大到实验将采用的比色杯准确读数所需要的体积。
2. BSA 标准品和样品的准备: 样品用水或其它不干扰显色反应的缓冲配置, 使待测定的浓度位于标准曲线的线性部分。每个反应准备 3 个平行测定。标准曲线一般 5-6 个点即可, 根据样品的浓度确定各点的具体浓度。稀释 BSA 时, 可以用水, 最好采用与样品一致或近似的溶液。如待测定的浓度为 $200\mu\text{g/ml}$ 左右, 按下表的次序加入 BSA 标准或样品及 Solution A+B 混合物, 混匀。

	1	2	3	4	5	6	7	待测样品 稀释 1	待测样品 稀释 2
BSA (μl)	0	2.5	5	10	15	20	25	25	25
H_2O (μl)	25	22.5	20	15	10	5	0	0	0
Mix(A+B)(μl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500
OD_{562}									
OD_{562} 平均值									
Con ($\mu\text{g/ml}$)	0	50	100	200	300	400	500		

未知样品浓度可以从标准曲线中查得, 实际浓度需要乘以样品的稀释倍数。

3. 可以在 1.5ml Eppendorf 管内做反应。在管壁上依次标上序列号, 按上表加样品, 注意: 每次反应都需

- 要做一个和未知样品溶液相同的空白做对照。
- 保温。对于蛋白质在 20ug-500ug/ml 采用标准反应：37 度保温 30 分钟；对于 5-20 μ g/ml 采用增强法反应：60 度保温 30 分钟。注意：保温前需要将离心管盖盖上。
 - 保温结束后，取出反应管，冷却到室温。
 - 测定 562nm 的光吸收。注意：OD 值的测定需要在保温接受后一小时内完成。60 度保温结束后需要离心将盖子上的水蒸汽收集到管内。
 - 标准曲线的绘制。注意：数据处理时需要去除明显错误的值。未知样品浓度可以从标准曲线中查得，实际浓度需要乘以样品的稀释倍数。如果是计算机绘制得曲线，可以从计算机给出的线性方程式计算出未知样品的浓度。注意：实际操作时不必每次都做标准曲线，可以做一两个标准样品，和标准曲线比较得出浓度系数。未知样品的实际浓度=从标准曲线中得到的浓度*浓度系数。

测定方法(96 孔板):

- 据样品的数目和蛋白质的浓度，准备 37C 或 60C 恒温箱；按每个反应使用 200ul Solution A, 4ul Solution B 准备 A+B 混合液：50 份 Solution A + 1 份 Solution B，混匀后使用。该混合液需要在 24 小时内用完。注意：每个测定要做 2-3 个平行反应，即每个样品需要 0.6ml Solution A 和 0.012ml Solution B。
- BSA 标准品和样品的准备：样品用水或其它不干扰显色反应的缓冲配置，使待测定的浓度位于标准曲线的线性部分。每个反应准备 3 个平行测定。标准曲线一般 5-6 个点即可，根据样品的浓度确定各点的具体浓度。稀释 BSA 时,可以用水，最好采用与样品一致或近似的溶液。如待测定的浓度为 200 μ g/ml 左右，按下表的次序加入 BSA 标准或样品及 Solution A+B 混合物，混匀。

	1	2	3	4	5	6	7	待测样品 稀释 1	待测样品 稀释 2
BSA (μ l)	0	2.5	5	10	15	20	25	25	25
H ₂ O (μ l)	25	22.5	20	15	10	5	0	0	0
Mix(A+B)(μ l)	200	200	200	200	200	200	200	200	200
OD ₅₆₂									
OD ₅₆₂ 平均值									
Con (μ g/ml)	0	50	100	200	300	400	500		

未知样品浓度可以从标准曲线中查得，实际浓度需要乘以样品的稀释倍数。

- 在每个孔中加入 25ul 样品，然后加入 200ul A+B 混合液,盖上盖子混合 30 秒。
- 盖上盖子，37 度保温 30 分钟。
- 冷却到室温，
- 测定 562nm 的光吸收。注意：OD 值的测定需要在保温接受后一小时内完成。
- 标准曲线的绘制。注意：数据处理时需要去除明显错误的值。未知样品浓度可以从标准曲线中查得，实际浓度需要乘以样品的稀释倍数。如果是计算机绘制得曲线，可以从计算机给出的线性方程式计算出未知样品的浓度。注意：实际操作时不必每次都做标准曲线，可以做一两个标准样品，和标准曲线比较得出浓度系数。未知样品的实际浓度=从标准曲线中得到的浓度*浓度系数。

官方网址: <http://www.genesion.com.cn>

订货热线: 4006169114、020-84224925

Email: whiga22@126.com

