



## 蛋白定量试剂盒 BCA 法（标准法）

产品编号：4001

BCA 法的原理是蛋白质在碱性条件下，将  $\text{Cu}^{2+}$  转化成  $\text{Cu}^{+}$ ， $\text{Cu}^{+}$  通过与 BCA 试剂的反应检测出。此法为一步法，反应产物呈紫色，最大吸收峰为 562nm，通过标准曲线测出未知蛋白的浓度。许多干扰因素对此法没有影响，特别是一定范围内的蛋白质变性剂如尿素和盐酸胍。

### 试剂组成

试剂 A: 250 mL、试剂 B: 5 mL、BSA 标准品 2.0mg/支，5 支

### 运输、储存和有效期

常温运输(勿超过 30°C)，2-8°C 储存，在有效期内使用。正常储存条件下自生产之日起有效期 2 年。

### 操作方法

1. 准备工作液：将 100 份试剂 A 与 2 份试剂 B 混合，混合液呈淡蓝色，室温稳定 1 周
2. 准备标准品：取样品相同的缓冲液 1.0ml，加入 BSA 冻干品中，配制成 2000  $\mu\text{g/ml}$ ，倍比稀释配制成：2000、1000、500、250、125、62.5、0  $\mu\text{g/ml}$ 。

### 测定步骤

1. 取标准品或待测样品溶液 100 $\mu\text{L}$  加入到 2 mL 工作液中（也可取 25 $\mu\text{L}$  样品加入到 500 $\mu\text{L}$  工作液中），混匀，60°C 孵育 30 min
2. 将温度降至室温，测 562 nm 吸光度（1 小时之内测定）。
3. 以浓度作为横坐标，吸光度作为纵坐标绘制标准曲线，根据样品的吸光度值在标准曲线上查样品的浓度值。

### 注意事项

1. 标准法的线性范围：1000  $\mu\text{g/ml}$ ~100  $\mu\text{g/ml}$ ，高于此范围，建议适当稀释后测定；低于此范围，建议使用微量法试剂盒检测。
2. 延长孵育时间可以增加灵敏度，颜色太深，可以缩短加热时间，注意采用相同的方法处理标准品和样品）
3. BCA 检测方法依赖蛋白质氨基酸的成分，不能测定蛋白质的绝对量，BSA 标准曲线仅用于比较相似蛋白质溶液的浓度。
4. 某些试剂会干扰 BCA 法的检测，脂类导致吸光度增高。含巯基的缓冲液可导致实验误差。
5. 螯合剂如 EDTA 等可能干扰检测，通过稀释样本可解决此问题，同时，稀释也可以减轻其它因素的干扰。

### 参考文献

1. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analyt. Biochem.* 150, 76–85.
2. Kessler, R. J. and Fanestil, D. D. (1986) Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Analyt. Biochem.* 159, 138–142.
3. Hill, H. D. and Straka, J. G. (1988) Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Analyt. Biochem.* 170, 203–208.
4. Morton, R. E. and Evans, T. A. (1992) Modification of the BCA protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Analyt. Biochem.* 204, 332–334.
5. Gates, R. E. (1991) Elimination of interfering substances in the presence of detergent in the bicinchoninic acid protein assay. *Analyt. Biochem.* 196, 290–295.
6. Fountoulakis, M., Juranville, J. F., and Manneberg, M. (1992) Comparison of the coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and lowry quantitation assays, using nonglycosylated and glycosylated proteins. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 24, 265–274.