

BCA 蛋白定量试剂盒使用说明书

【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
EK-5001	BCA Protein Assay Kit	200/500/1000T
EK-5001A	BCA 试剂 A	40mL/100mL/200mL
EK-5001B	BCA 试剂 B	2mL/5mL/10mL
EK-5001C	5mg/mL BSA 溶液（蛋白标准品）	1mL
	使用说明书	1 份

【保存条件】

室温避光保存，有效期 12 个月

【概述】

BCA 法是实验室最常用的蛋白定量方法之一。其原理是在碱性条件下，蛋白将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ， Cu^+ 与 BCA 试剂结合形成紫色的络合物，在 562 nm 处有强吸收峰。

高灵敏度：检出限低至 25 $\mu\text{g/mL}$ 。

高兼容性：可兼容 5% 浓度的 SDS、Triton X-100、Tween 20/80。

干扰因素：BCA 技术对螯合剂（EDTA > 10mM）和还原剂（DTT > 1mM、 β -ME > 0.01%）敏感。若还原剂超标，建议改用 EK-5004 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒（去垢剂兼容型）。

【使用方法】

1. 准备 BCA 工作液 (Working Reagent)

配制：按 50:1 的比例混合 A 液与 B 液（例如：5 mL A 液 + 100 μL B 液）。

观察：若 A 液有结晶析出，请 37°C 水浴溶解后使用。混匀后的工作液应为苹果绿色，室温 24 小时内稳定。

2. 蛋白标准曲线的建立 (微孔板法)

建议使用与待测样品相同的缓冲液（如 PBS、0.9% NaCl）稀释标准品。

编号	稀释液体积	蛋白标准液体积	最终浓度
A	70 μL	5mg/mL BSA 30 μL	1.5mg/mL
B	30 μL	从 A 管取 60 μL	1mg/mL
C	20 μL	从 B 管取 60 μL	0.75mg/mL

D	30 μ L	从 C 管取 60 μ L	0.5mg/mL
E	60 μ L	从 D 管取 60 μ L	0.25mg/mL
F	60 μ L	从 E 管取 60 μ L	0.125mg/mL
G	60 μ L	0 μ L	0mg/mL

3. 蛋白浓度的检测

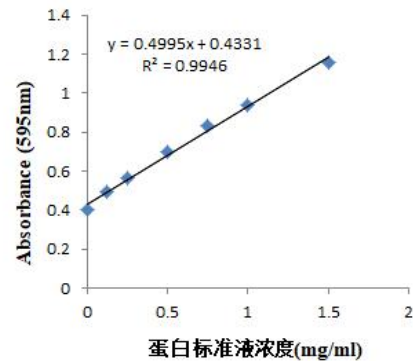
- ① **加样:** 向 96 孔板中加入 5 μ L 标准品或待测样品。(若样品体积不足 5 μ L, 请用稀释液补足)
- ② **显色:** 每孔加入 195 μ L BCA 工作液, 轻晃混匀。
- ③ **孵育:** 37 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟 (标准法)。
注: 低浓度蛋白可 60 $^{\circ}$ C 孵育 30min; 普通定性可室温孵育 2h。
- ④ **测定:** 冷却至室温, 使用酶标仪测定 562 nm (或 540-595 nm 之间) 的吸光度。

4. 数据计算

① **绘图:** 以标准品浓度为横坐标 (X), 吸光度 OD 值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。

② **计算:** 根据样品的 OD 值 (多孔则为平均 OD) 在曲线上计算对应浓度 (若样品有稀释则留意最后乘以稀释倍数)。

例: 公式 $Y = 0.4995X + 0.4151$, 若测得样品 $OD = 0.6$, 则浓度 $X = (0.6 - 0.4151) / 0.4995 = 0.37 \text{ mg/mL}$ 。



【注意事项】

1. **显色时间控制:** BCA 反应不是“终点反应”, 颜色会随时间加深。
优化: 标准品和样品必须同时加液、同时孵育、同时读数, 以确保数据的可比性。
2. **耗材选择:** 请使用底部透明的平底 96 孔板 (如普通细胞培养板)。若背景值异常升高, 请检查稀释液本身是否含有强还原剂 (如高浓度 DTT)。
3. **波长建议:** 建议使用最优 562nm, 若无此滤光片, 可选择 540-590nm 范围。
4. **安全防护:** 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
5. BSA 溶液 (蛋白标准品) 长时间不用可 -20 $^{\circ}$ C 保存, 短时间 (一个月内) 室温保存。