

"闪测 BCA"-即用型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-5010	Quick BCA Protein Assay Kit	500T/500T×5 盒/500T×10 盒
EK-5010A	BCA 试剂 A	100mL/100mL×5 瓶/100mL×10 瓶
EK-5010B	BCA 试剂 B	5mL/5mL×5 瓶/5mL×10 瓶
EK-5010C	即用型 BSA 标准品① (0 µg/mL)	1mL/1mL×5 管/1mL×10 管
	即用型 BSA 标准品② (125 µg/mL)	1mL/1mL×5 管/1mL×10 管
	即用型 BSA 标准品③ (250 µg/mL)	1mL/1mL×5 管/1mL×10 管
	即用型 BSA 标准品④ (500 µg/mL)	1mL/1mL×5 管/1mL×10 管
	即用型 BSA 标准品⑤ (750 µg/mL)	1mL/1mL×5 管/1mL×10 管
	即用型 BSA 标准品⑥ (1000 µg/mL)	1mL/1mL×5 管/1mL×10 管
	即用型 BSA 标准品⑦ (1500 µg/mL)	1mL/1mL×5 管/1mL×10 管
	即用型 BSA 标准品⑧ (2000 µg/mL)	1mL/1mL×5 管/1mL×10 管
	使用说明书	1 份

【保存条件】

室温避光保存，有效期 12 个月。即用型 BSA 标准品①-⑧于-20℃保存。

【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：可检出蛋白质浓度范围为 20-2,000µg/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 > 0.1%) 敏感。若还原剂超标，建议改用耐还原剂的 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℃ 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)

分别取即用型 BSA 标准品①~⑧各 20 µL 加到 96 孔板中（BSA 标准品使用前须充分溶解摇匀）。

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8
添加物	标准品①	标准品②	标准品③	标准品④	标准品⑤	标准品⑥	标准品⑦	标准品⑧
体积 (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20
BSA 终浓度 (μg/mL)	0	125	250	500	750	1000	1500	2000

3. 蛋白浓度的检测

- ① **加样**: 用 1×PBS 或 0.9%生理盐水将样品适当稀释 (可以多作几个梯度, 如 2 倍、4 倍、8 倍稀释), 加 20 μL 到 96 孔板的样品孔中;
- ② **显色**: 在同一时间点, 将全部标准品孔与样品孔的 BCA 工作液一并配制并同步加入 (每孔 200 μL), 加液顺序应尽量缩短组内耗时 (建议使用排枪或多道移液器一次性加样, 避免逐孔手动加样导致组内孔间孵育时间产生数分钟级差异); 加毕后立即轻晃混匀。
- ③ **孵育**: 37℃放置 30 分钟 (标准法)。
注: 低浓度蛋白可 60℃孵育 30min; 普通定性可室温孵育 0.5-2h。
- 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 **绘制标准曲线**: 以 BSA 标准品①~⑧的已知浓度为横坐标 (X, 单位 μg/mL), 以对应孔的吸光度 OD 值为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得到标准曲线公式: $Y = kX + b$ 。

② **计算样品浓度**: 将样品的 OD 值 (多孔检测取平均值) 直接代入当次实验建立的标准曲线公式, 反算对应的 BSA 当量浓度 (若样品经过稀释, 需再乘以稀释倍数)。截距 b 已包含空白孔 (标准品①) 的本底吸光度, 代入原始 OD 即可, 无需再单独扣减空白值。注: 标准曲线须每次实验同步制作, 不可套用历史回归公式。

计算示例:

如标准曲线公式: $Y = 0.00058X + 0.05$ (X 为蛋白质浓度 (以 BSA 标准品拟合), 单位 μg/mL; Y 为吸光度 OD 值)

测得样品 OD = 0.60, 代入公式:

$$X = (0.60 - 0.05) / 0.00058 \approx 948 \mu\text{g/mL}$$

若样品此前经过 4 倍稀释, 则原始样品浓度 = $948 \times 4 \approx 3792 \mu\text{g/mL}$ (即约 3.79 mg/mL)。

注: 样品(稀释后)的 OD 值应落在标准曲线的线性范围内(即介于①~⑧标准品 OD 值区间内), 超出该范围的样品需重新调整稀释倍数后复测。

【注意事项】

- 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。
- 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)。
- 波长建议**: 建议使用最优 562nm, 若无此滤光片, 可选择 540-595nm 范围。
- 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。