

Code No. T9300A

研究用

TaKaRa

TaKaRa BCA Protein
Assay Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒以外必备的主要试剂及仪器	1
● 使用注意	1
● 操作方法	1
● 附 录	6
● 关联产品	7

● 制品说明

本制品是一种对蛋白质溶液进行高灵敏度比色定量的试剂盒，可用于含有表面活性剂蛋白质溶液的定量。BCA 蛋白质定量包括两步反应，首先，二价铜离子 (Cu^{2+}) 在碱性条件下被蛋白质的肽键还原成一价铜离子 (Cu^+)，还原后的铜离子浓度与溶液中所含蛋白质浓度成正比。其次，两个分子的 bicinchoninic acid (BCA) 络合一个一价铜离子 (Cu^+)，形成一种在 562 nm 处有强吸收值的紫色复合物。本制品依此为原理，根据测定 562 nm 处光吸收值，与标准曲线对比，获得待测蛋白的浓度定量。使用 BCA 法进行蛋白质定量具有以下特点：1. 不受蛋白质种类的影响，在 0.02~2 mg/ml 浓度范围内蛋白质浓度与吸光度值成线性关系；2. 对表面活性剂的干扰影响小。但由于还原剂和螯合剂对反应有阻害性，因此本制品不适用于含有还原剂或者螯合剂的蛋白质样品的定量。详细信息见“附录”的表 1。

使用本制品进行样品定量时，可使用试剂盒中附带的 BSA Standard Solution 制备标准曲线。使用本制品时，1 ml 标准反应体系可进行 500 次反应，使用微孔板的 200 μl 微量反应体系可进行 2,500 次反应。

● 制品内容

1. BCA Reagent A	250 ml × 2 支
2. BCA Reagent B	20 ml × 1 支
3. BSA Standard Solution (2 mg/ml) *	1 ml × 10 支

*：BSA Standard Solution (牛血清白蛋白标准品溶液) 保存在 0.9% NaCl 和 0.05% NaN_3 溶液中。

● 保 存

BCA Reagent A、BCA Reagent B：室温保存

BSA Standard Solution：4℃

* 该试剂盒在 4℃ 下运输收货后，BCA Reagent A、BCA Reagent B 请于室温保存。

● 试剂盒外必备的主要试剂及仪器

1. 分光光度计及适配的 1 ml 比色皿 (1 ml 反应体系时使用)
2. 酶标仪及适配的 0.2 ml 微型比色皿及微孔板 (200 μl 反应体系时使用)
3. Microtube (2 ml 或 1.5 ml)
4. 水浴槽 (37℃)
5. 恒温箱 (60℃) (低浓度蛋白质样品测定时使用)

● 使用注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前请一定认真阅读。

1. BSA Standard Solution 使用前室温放置，恢复至室温或在 20~50℃ 的水浴中复温。轻弹混匀，轻微离心后使用。
2. 稀释检测样品和标准品时，可使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS。
3. BCA Reagent A 和 BCA Reagent B 在低温下可能会产生沉淀物。使用前于 20~37℃ 保温，轻轻振荡混合，使沉淀物完全溶解后再使用。
4. 如果没有配备 562 nm 滤光片，可选择 540~570 nm 的滤光片进行测定，不会对蛋白定量产生影响。
5. 高浓度样品测定之后，用水充分冲洗比色皿后再使用。色素残留在比色皿上会影响低浓度样品的测定。

● 操作方法

本制品共提供了五种操作流程，请根据样品情况选择相应操作流程。

- a. 标准操作流程 (定量范围：50~2,000 $\mu\text{g/ml}$) 【1 ml 反应体系】
- b. 标准操作流程 (定量范围：50~2,000 $\mu\text{g/ml}$) 【0.2 ml 反应体系】

- c. 低浓度蛋白质样品的操作流程（定量范围：0~50 μg/ml）【1 ml 反应体系】
- d. 低浓度蛋白质样品的操作流程（定量范围：0~50 μg/ml）【0.2 ml 反应体系 使用 Microtube】
- e. 低浓度蛋白质样品的操作流程（定量范围：0~200 μg/ml）【0.2 ml 反应体系 使用微孔板】

【工作液的配制】

测定前，按照 BCA Reagent A : BCA Reagent B = 100 : 1 的比例混合后配制工作液。例如配制 30 ml 的工作液时，在 30 ml 的 BCA Reagent A 中添加 0.3 ml 的 BCA Reagent B 后，充分振荡混匀。配制后的工作液可在 4℃ 保存三天使用。

所需工作液量的计算方法如下：

所需工作液总体积 (ml) = [(BSA 标准溶液 8 份或 7 份 + 检测样品数) × 平行样本数 (n) + 1] × 1 个样品所需的工作液体积

例) 标准操作流程【1 ml 反应体系】检测样品数为 12 个、平行样 (n=2) 时：

$$[(8 + 12) \times 2 + 1] \times 1 \text{ ml} = 41 \text{ ml}$$

例) 标准操作流程【200 μl 反应体系】、检测样品数为 20 个、平行样 (n=2) 时：

$$[(8 + 20) \times 2 + 1] \times 0.2 \text{ ml} = 11.4 \text{ ml}$$

例) 低浓度蛋白质样品测定的操作流程【1 ml 反应体系】、检测样品数为 12 个、平行样 (n=2) 时：

$$[(7 + 12) \times 2 + 1] \times 0.5 \text{ ml} = 19.5 \text{ ml}$$

a. 标准操作流程（定量范围：50~2,000 μg/ml）【1 ml 反应体系】

1. BSA 标准品溶液的稀释方法见下表。BSA 标准品溶液的稀释可使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS。

2 mg/ml BSA Standard (μl)	稀释液 (μl)	BSA 终浓度 (μg/ml)
120	0	2,000
90	30	1,500
60	60	1,000
45	75	750
30	90	500
15	105	250
10	150	125
0	120	0 (Blank)

2. BSA 标准曲线的制备

- 1) 分别取 50 μl 稀释后的 BSA 标准品溶液加入到 1.5 ml microtube 中，每个浓度取 2 个平行样。
- 2) 在每管中各加入 1 ml 工作液后，立即混匀。
- 3) 37℃ 水浴槽中反应 30 分钟后，冷却至室温。
- 4) 使用分光光度计测定 562 nm 处的吸光度值。测定时，使用 1 ml 比色皿，用水校零。尽可能在 20 分钟内检测完毕所有样品。
- 5) 各浓度 BSA 标准品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值，绘制 BSA 标准品溶液的标准曲线。

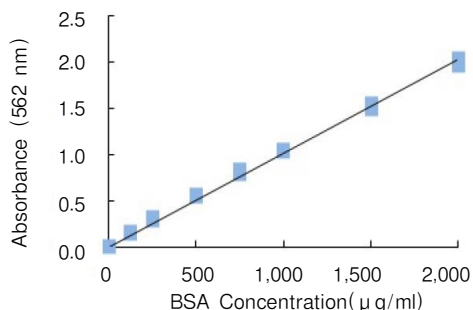


图 1. 0~2,000 μg/ml BSA 的标准曲线

3. 检测样品的测定

检测样品测定时，建议与 BSA 标准品溶液同时进行测定。

- 1) 分别取 50 μl 检测样品溶液加入到 1.5 ml microtube 中，每个样品取 2 个平行样。
(如果必要，也可选择与 BSA 标准品溶液相同的稀释方法稀释检测样品后测定。)
- 2) 在每个 1.5 ml microtube 中加入 1 ml 工作液后，立即混匀。
- 3) 37°C 水浴槽中反应 30 分钟后，冷却至室温。
- 4) 使用分光光度计测定 562 nm 处的吸光值。测定时，使用 1 ml 比色皿，用水校零。尽可能在 20 分钟内检测完毕所有样品。
- 5) 各样品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值，根据 BSA 标准曲线可计算出检测样品的蛋白浓度。

b. 标准操作流程（定量范围：50~2,000 $\mu\text{g/ml}$ ）【0.2 ml 反应体系】

1. BSA 标准品溶液的稀释同 a-1。BSA 标准品溶液的稀释可使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS。
2. BSA 标准曲线制备
 - 1) 将稀释后的 BSA 标准品溶液加入到 microtube 或微孔板中，每个浓度取 2 个平行样。使用微型比色皿测定时，BSA 标准品溶液的添加量为 10 μl ；使用微孔板测定时，BSA 标准品溶液的添加量为 25 μl 。
 - 2) 加入 200 μl 工作液后，立即混匀。
 - 3) 37°C 水浴槽中反应 30 分钟后，冷却至室温。
 - 4) 使用分光光度计测定 562 nm 处的吸光值。测定时，使用光程 1 cm，体积为 0.2 ml 的微型比色皿；微孔板测定时使用酶标仪，波长设定在 562 nm 处进行测定。用水校零。尽可能在 20 分钟内检测完毕所有样品。
 - 5) 各浓度 BSA 标准品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值，绘制 BSA 标准品溶液的标准曲线。

3. 检测样品的测定

检测样品测定时，建议与 BSA 标准品溶液同时进行测定。

- 1) 分别将检测样品溶液加入到 microtube 或微孔板中，每个样品取 2 个平行样。使用微型比色皿测定时，检测样品溶液的添加量为 10 μl ；使用微孔板测定时，检测样品溶液的添加量为 25 μl (如果必要，也可选择与 BSA 标准品溶液相同的稀释方法稀释检测样品后测定)。
- 2) 加入 200 μl 工作液后，立即混匀。
- 3) 37°C 水浴槽中反应 30 分钟后，冷却至室温。
- 4) 使用分光光度计测定 562 nm 处的吸光值。测定时，使用光程 1 cm，体积为 0.2 ml 的微型比色皿；微孔板测定时使用酶标仪，波长设定在 562 nm 处进行测定。用水校零。尽可能在 20 分钟内检测完毕所有样品。
- 5) 各样品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值，根据标准曲线可计算出检测样品的蛋白浓度。

c. 低浓度蛋白质样品测定的操作流程（定量范围：0~50 $\mu\text{g/ml}$ ）【1 ml 反应体系】

1. BSA 标准品溶液的配制。
 - 1) 0.2 mg/ml BSA 标准品溶液的制备：取 100 μl BSA Standard Solution (2 mg/ml)，加入 900 μl 稀释液后充分混合。
 - 2) 按照下表所示在 1.5 ml microtube 中稀释 BSA 标准品溶液 (2 个平行样) (7 个浓度 \times 2=14 管)。
BSA 标准品溶液和检测样品的稀释可使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS。

0.2 mg/ml BSA 标准品溶液 (μ l)	稀释液 (μ l)	BSA 终浓度 (μ g/ml)	终体积 (μ l)
125	375	50	500
100	400	40	500
75	425	30	500
50	450	20	500
25	475	10	500
12.5	487.5	5	500
0	500	0 (Blank)	500

2. BSA 标准品溶液的测定

- 1) 在稀释后的 BSA 标准品溶液中直接加入 500 μ l 工作液后, 立即混匀。
- 2) 60°C 水浴或恒温箱中反应 60 分钟后, 冷却至室温。
- 3) 使用分光光度计测定 562 nm 处的吸光值。测定时使用 1 ml 比色皿, 用水校零。尽可能在 20 分钟内检测完毕所有样品。
- 4) 各浓度 BSA 标准品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值, 绘制 BSA 标准品溶液的标准曲线。

3. 检测样品的测定

检测样品测定时, 建议与 BSA 标准品溶液同时进行测定。

- 1) 取 500 μ l 检测样品加入到 1.5 ml microtube 中, 每个样品取 2 个平行样。
(如果必要, 也可选择与 BSA 标准品溶液相同的稀释方法稀释检测样品后测定)
- 2) 加入 500 μ l 工作液后, 立即混匀。
- 3) 60°C 水浴或恒温箱中反应 60 分钟后, 冷却至室温。
- 4) 使用分光光度计测定 562 nm 处的吸光值。测定时测定时使用 1 ml 比色皿, 用水校零。尽可能在 20 分钟内检测完毕所有样品。
- 5) 各样品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值, 根据标准曲线可计算出检测样品的蛋白浓度。

d. 低浓度蛋白质样品的操作流程 (定量范围: 0~50 μ g/ml) 【0.2 ml 反应体系】

1. BSA 标准品溶液的配制。

- 1) 0.2 mg/ml BSA 标准品溶液的制备: 取 100 μ l BSA Standard Solution (2 mg/ml), 加入 900 μ l 稀释液后充分混合。
- 2) 按照下表所示在 1.5 ml microtube 中稀释 BSA 标准品溶液 (2 个平行样) (7 个浓度 \times 2=14 管)。
BSA 标准品溶液和检测样品的稀释可使用去离子水、0.9%NaCl 或 PBS。

0.2 mg/ml BSA 标准品溶液 (μ l)	稀释液 (μ l)	BSA 终浓度 (μ g/ml)
125	375	50
100	400	40
75	425	30
50	450	20
25	475	10
12.5	487.5	5
0	500	0 (Blank)

2. BSA 标准品溶液的测定

- 1) 分别取 100 μ l 系列稀释后的 BSA 标准品溶液加入 microtube 中, 每个浓度取 2 个平行样。
- 2) 加入 100 μ l 工作液后, 立即混匀。
- 3) 60°C 水浴或恒温箱中反应 60 分钟后, 冷却至室温。

- 4) 使用分光光度计测定 562 nm 处的吸光值。测定时使用光程 1 cm，体积为 0.2 ml 微型比色皿，用水校零。尽可能在 20 分钟内检测完毕所有样品。
- 5) 各浓度 BSA 标准品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值，绘制 BSA 标准品溶液的标准曲线。

3. 检测样品的测定

检测样品测定时，建议同 BSA 标准品溶液同时进行测定。

- 1) 取 100 μ l 检测样品加入到 microtube 中，每个样品取 2 个平行样。
(如果必要，也可选择与 BSA 标准品溶液相同的稀释方法稀释检测样品后测定)
- 2) 加入 100 μ l 工作液后，立即混匀。
- 3) 60℃水浴或恒温箱中反应 60 分钟后，冷却至室温。
- 4) 使用分光光度计测定 562 nm 处的吸光值。测定时使用光程 1 cm，体积为 0.2 ml 微型比色皿，用水校零。尽可能在 20 分钟内检测完毕所有样品。
- 5) 各样品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值，根据标准曲线可计算出检测样品的蛋白浓度。

e. 低浓度蛋白质样品的操作流程 (定量范围: 0~200 μ g/ml) 【0.2 ml 反应体系·使用微孔板测定】

1. BSA 标准品溶液的配制。

- 1) 0.2 mg/ml BSA 标准品溶液的制备: 取 120 μ l BSA Standard Solution (2 mg/ml)，加入 1,080 μ l 稀释液后充分混合。
- 2) 按照下表稀释 BSA 标准品溶液。BSA 标准品溶液和检测样品的稀释可使用去离子水、0.9% NaCl 或 PBS。

0.2 mg/ml BSA 标准品溶液 (μ l)	稀释液 (μ l)	BSA 终浓度 (μ g/ml)
400	0	200
300	100	150
200	200	100
100	300	50
40	360	20
20	380	10
10	390	5
0	400	0 (Blank)

2. BSA 标准品溶液的测定

- 1) 分别取 100 μ l 稀释后的 BSA 标准品溶液加入到微孔板中，每个浓度取 2 个平行样。
- 2) 加入 100 μ l 工作液后，立即混匀。
- 3) 37℃水浴中反应 60 分钟后，冷却至室温。
- 4) 酶标仪波长设定在 562 nm 处进行测定。用水校零。尽可能在 20 分钟内检测完毕所有样品。
- 5) 各浓度 BSA 标准品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值，绘制 BSA 标准品溶液的标准曲线。

3. 检测样品的测定

检测样品测定时，建议同 BSA 标准品溶液同时进行测定。

- 1) 分别取 100 μ l 检测样品加入到微孔板中，每个样品取 2 个平行样进行测定。
(如果必要，也可选择与 BSA 标准品溶液相同的稀释方法稀释检测样品后测定)
- 2) 加入 100 μ l 工作液后，立即混匀。
- 3) 37℃水浴中反应 60 分钟后，冷却至室温。
- 4) 酶标仪波长设定在 562 nm 处进行测定。用水校零。尽可能在 20 分钟内检测完毕所有样品。
- 5) 各样品溶液的吸光度值减去 Blank 值的平均值，根据标准曲线计算出检测样品的蛋白浓度。

● 附录

兼容试剂的影响

BCA 法一般不受表面活性剂及各种缓冲液的影响，但各种兼容试剂浓度过高会影响其测定结果。下表列举了使用本试剂盒检测时，不影响检测结果的各种兼容试剂的最大浓度。

表 1. 标准操作流程中所使用的各种兼容试剂的浓度上限

试剂名称	兼容试剂的浓度上限
Salt/Buffers	
Ammonium sulfate	0.15 M
Borate pH9.5	50 mM
Calcium chloride	10 mM
Glycine	100 mM
Guanidine-HCl	4 M
HEPES,pH7.5	100 mM
Imidazole pH7.0	50 mM
KPB,pH7.0	100 mM
Magnesium chloride	10 mM
MES,pH6.1	100 mM
MOPS,pH7.2	100 mM
NaPB,pH7.0	100 mM
Nickel chloride	10 mM
PIPES,pH6.8	100 mM
Sodium acetate,pH5.0	200 mM
Sodium azide	0.20%
Sodium chloride	1 M
Sodium citrate,pH6.4	100 mM
Tricine,pH8.0	25 mM
Tris-HCl,pH8.0	50 mM
Zinc chloride	10 mM
Detergents	
Brij-35	5%
CHAPS	5%
NP-40	5%
Triton X-100	5%
Tween-20	5%
SDS	5%

试剂名称	兼容试剂的浓度上限
Chelating agents	
EDTA	10 mM
EGTA	1 mM
Reducing agents	
Cysteine	1 mM
Dithiothreitol	1 mM
Glucose	10 mM
2-Mercaptoethanol	0.01%
Organic solvents	
Acetone	10%
DMSO	10%
Ethanol	10%
Methanol	10%
Misc. Reagents	
Glycerol	50%
Hydrochloric Acid	100 mM
PMSF	1 mM
Sodium Hydroxide	100 mM
Urea	3 M

蛋白质种类的影响

BCA 法受蛋白种类影响相对较小。BSA（牛血清白蛋白）和 BGG（ γ -球蛋白）的标准曲线见图 2，大多数蛋白测定方法使用 BSA 或 BGG 作为标准品。表 2 列举了以 BSA 为标准测定的 15 种蛋白质吸光度值的差异。

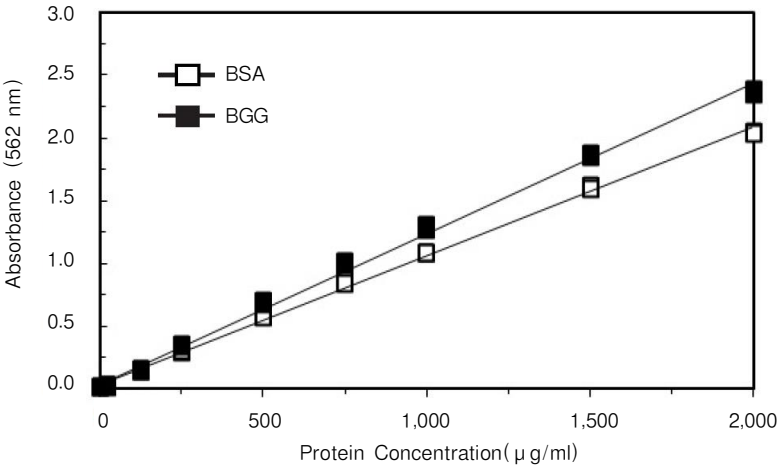


图 2. 0~2,000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内的 BSA 和 BGG 的标准曲线

表 2. 各种蛋白质相对于 BSA 吸光度值的差异性

Protein	Ratio*
Albumin, bovine serum (BSA)	1.00
Alcohol Dehydrogenase, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.54
Aldolase, rabbit muscle	0.89
Carbonic Anhydrase, bovine erythrocytes	0.77
α -Chymotrypsin, bovine pancreas	1.06
Cytochrome C, bovine heart	0.90
Gamma globulin, bovine (BGG)	1.16
Hemoglobin, bovine	0.66
IgG, rabbit	1.29
IgG, mouse	1.15
Insulin, human	1.28
Lysozyme, chicken egg white	1.19
Ovalbumin, chicken egg white	0.95
Transferrin	0.85
Trypsin	0.98

* Ratio = (各种蛋白吸光度的平均值) / (BSA 吸光度的平均值)

● 关联产品

TaKaRa Bradford Protein Assay Kit (Code No. T9310A)

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考Takara Bio Inc.网站。为正确使用Takara产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>