

微量蛋白质定量试剂盒 (BCA 法) 使用说明 P1513

描述: Bicinchoninic acid (BCA)法是近来广为应用的蛋白定量方法。其原理与Lowery法蛋白定量相似，即在碱性环境下蛋白质与Cu²⁺络合并将Cu²⁺还原成Cu¹⁺。BCA与Cu¹⁺结合形成稳定的紫蓝色复合物，在562 nm处有高的光吸收值并与蛋白质浓度成正比，据此可测定蛋白质浓度。与Lowery法相比，BCA蛋白测定方法灵敏度高，操作简单，试剂及其形成的颜色复合物稳定性俱佳，并且受干扰物质影响小。与Bradford法相比，BCA法的显著优点是不受去垢剂的影响。

组成与储存:

- (1) BCA Reagent 100 ml, 室温保存;
- (2) Cu Reagent 2.5ml, 室温保存;
- (3) BSA standard 4 mg/ml 1 ml, -20°C 冻存。1.5 年有效。
可进行 500 次微板(microplate)测定或 100 次 1 ml 比色杯测定。

所需设备: 比色计、酶标仪、或微板比色仪，最佳工作波长 562 nm，可在 540-590 nm 之间。

工作溶液(Working Reagent, WR)配制: 将 50 体积 BCA Reagent 与 1 体积 Cu Reagent 混合即为 WR 工作试剂，呈嫩绿色，立即使用或者 4°C 保存不超过一天。

标准蛋白溶液配制: 用双蒸水、0.9%生理盐水、PBS、或与待测蛋白样品匹配之缓冲液进行倍比稀释,得到 BSA 标准溶液 80、40、20、10、5、2.5、1.25 µg/ml。

蛋白测定

微量蛋白质浓度线性检测范围为 1-100 µg/ml。标准测定用 1 cm 光程玻璃或塑料比色皿，反应终体积 1.2 ml，用比色计测定。微板测定用 96 孔板，反应终体积 240 µl，用酶标仪、微板比色仪测定。

1. 标准测定：将 0.2 ml 标准品或待测样本与 1 ml WR 工作溶液混合。微板测定：将 40 µl 标准品或待测样本与 200 µl WR 工作溶液混合。
2. 37°C 反应 30min；也可 25°C 室温 2 小时或过夜。
3. 将反应管温度冷却至室温。测定 562 nm (可在 540-590 nm 之间) 光密度(OD)值。
4. 绘制标准曲线。X 轴为 BSA 标准蛋白浓度(mg/ml 或 µg/ml)，Y 轴为各标准管对应的 OD562 值。用 Excel 拟合曲线并计算蛋白浓度。

表 1 标准测定和微板测定方案的加样量和比例

		微板(microplate)测定方案		标准比色杯测定方案	
标号	蛋白浓度 (µg/ml)	标准或待测蛋白体 积 (µl)	WR 工作试剂(µl)	标准或待测蛋 白体积 (ml)	WR 工作试剂 (ml)
1	0	40	200	0.2	1
2	1.25	40	200	0.2	1
3	2.5	40	200	0.2	1
4	5	40	200	0.2	1
5	10	40	200	0.2	1
6	20	40	200	0.2	1
7	40	40	200	0.2	1
8	80	40	200	0.2	1
待测样品		40	200	0.2	1

注意事项

1. 37°C 30min 或 25°C 室温反应 2 小时对测量较为便利，但严格来讲此时反应尚未达到终点，通常每 10 min OD562 值升高约 2.3%。然而，通常在 10min 内可以测定 30 管而不明显影响测定精度。
2. 微量蛋白质定量试剂盒 (BCA 法) 检测范围为 1~100 µg/ml。
3. BCA 法在样品含有脂类时光吸收值偏高。样品中 EDTA 或葡萄糖浓度大于 10 mM 不能使用 BCA 方法，葡萄糖浓度大于 10 mM 时可用改良 Lowry 法蛋白定量试剂盒 #P1512，EDTA 大于 10 mM 的样品可用 Bradford 法蛋白定量试剂盒 (# P1510)。另外，蛋白质样品经液体样品蛋白抽提试剂 (#P1255) 沉淀后，可彻底去除干扰 BCA 法、Bradford 法、和 Lowry 法蛋白测定的物质。
4. 欲使测量能耐受下面表 2 所提示的最大干扰物质浓度，并保持测量精度，应在蛋白标准管中加入相应浓度的干扰物质，但会给操作带来不便。
5. 可测量吸附于固相支持物乳酶标板、琼脂糖、亲和层系凝胶上的蛋白。
6. 每次测定应该制备单独的标准曲线。

表2 BCA法物质干扰及耐受的最大浓度

Buffer Systems	Sodium phosphate 25 mM
Bicine, pH 8.4 20 mM	Sucrose 40%
Bis-Tris, pH 6.5 33 mM	Sodium ortho-Vanadate in PBS, pH 7.2, 1 mM
Calcium chloride in TBS, pH 7.2 10 mM	Urea 3 M
CHES, pH 9.0 100 mM	Chelating agents
Cobalt chloride in TBS, pH 7.2 0.8 M	EDTA 10 mM
Ferric chloride in TBS, pH 7.2 10 mM	EGTA, any level, not compatible
HEPES 100 mM	Sodium citrate 200 mM
MOPS, pH 7.2 100 mM	Detergents
Nickel chloride in TBS 10 mM	Brij-35 5%
PBS; no interference	Brij-52 1%
NaCl (0.15 M), pH 7.2, no interference	CHAPS 5%
PIPES, pH 6.8 100 mM	CHAPSO 5%
Sodium acetate, pH 4.8 200 mM	Deoxycholic acid 5%
Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4 200 mM	Nonidet P-40 (Igepal CA-630) 5%
Tricine, pH 8.0 25 mM	SDS 5%
Triethanolamine, pH 7.8 25 mM	Span 20 1%
Tris 250 mM	Triton X-100 5%
TBS buffer, no interference	Triton X-114 1%
1 x SDS-PAGE loading buffer, no interference	Tween-20 5%
Zinc chloride (10 mM) in TBS, pH 7.2, 10 mM	Tween-60 5%
Buffer Additives	Tween-80 5%
Ammonium sulfate 1.5 mM	Zwittergents 1%
Aprotinin 10 mg/L	Reducing & Thiol Containing Agents
Glucose 10 mM	Dithioerythritol (DTE) 1 mM
Glycerol 10%	Dithiothreitol (DTT) 1 mM
Guanidine•HCl 4 M	2-Mercaptoethanol 1 mM
HCl 100 mM	Tributyl Phosphine 0.01%
Imidazole 50 mM	Solvents
Leupeptin 10 mg/L	Acetone 10%
PMSF 1 mM	Acetonitrile 10%
Sodium azide 0.20%	DMF 10%
Sodium bicarbonate 100 mM	DMSO 10%
Sodium chloride 1 M	Ethanol 10%
Sodium hydroxide 100 mM	Methanol 10%

参考文献:

Smith P et al, 1995, Measurment of protein using bicinchiconic acid, Anal. Biochem. 150, 76-85