

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 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 在碱性条件下被蛋白质的肽键还原成一价铜离子 ( $\text{Cu}^+$ )，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 biconchonic acid (BCA) 络合一个一价铜离子 ( $\text{Cu}^+$ )，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  $\mu\text{l}$  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%  $\text{NaN}_3$  溶液中。

## ● 保 存

BCA Reagent A、BCA Reagent B：室温保存

BSA Standard Solution：4°C

\* 该试剂盒在 4°C 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  $\mu\text{l}$  反应体系时使用)
3. Microtube (2 ml 或 1.5 ml)
4. 水浴槽 (37°C)
5. 恒温箱 (60°C) (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°C 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°C 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  $\mu\text{g/ml}$ ) 【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  $\mu\text{g/ml}$ ) 【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  $\mu\text{g/ml}$ ) 【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°C 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)  $\times$  平行样本数 (n) + 1 ]  $\times$  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  $\mu\text{l}$  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 $\mu\text{g/ml}$ ) 【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 ( $\mu\text{l}$ ) | 稀释液 ( $\mu\text{l}$ ) | BSA 终浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|--|-----------------------|------------------------------|
| 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  $\mu\text{l}$  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°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。

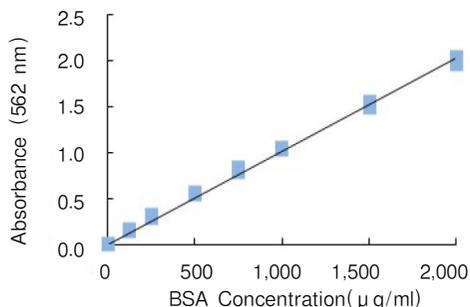


图 1. 0~2,000  $\mu\text{g/ml}$  BSA 的标准曲线

### 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$ ；使用微孔板测定时，BSA 标准品溶液的添加量为 25  $\mu\text{l}$ 。
- 2) 加入 200  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$ ；使用微孔板测定时，检测样品溶液的添加量为 25  $\mu\text{l}$  (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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  BSA Standard Solution (2 mg/ml) ,加入 900  $\mu\text{l}$  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 ( $\mu$ l ) | 稀释液 ( $\mu$ l ) | BSA 终浓度 ( $\mu$ g/ml ) | 终体积 ( $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ 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  $\mu$ l BSA Standard Solution (2 mg/ml), 加入 900  $\mu$ 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 ( $\mu$ l ) | 稀释液 ( $\mu$ l ) | BSA 终浓度 ( $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ 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  $\mu$ l BSA Standard Solution (2 mg/ml)，加入 1,080  $\mu$ 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 ( $\mu$ l) | 稀释液 ( $\mu$ l) | BSA 终浓度 ( $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l 工作液后，立即混匀。
- 3) 37°C 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  $\mu$ 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  $\mu$ l 工作液后，立即混匀。
- 3) 37°C 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。

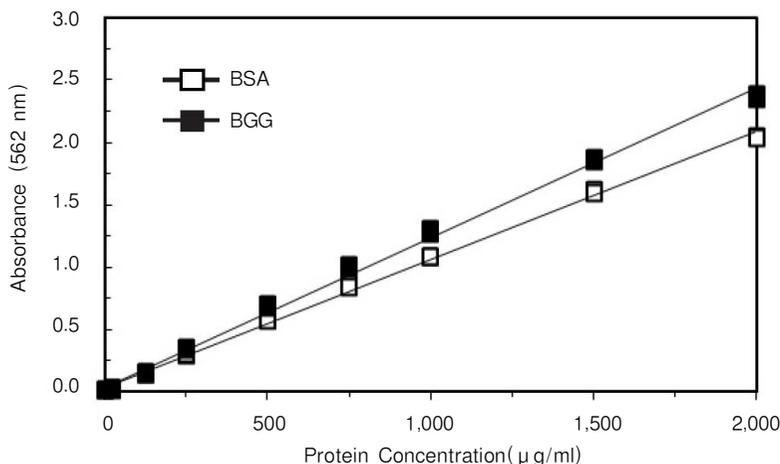


图 2. 0~2,000 μg/ml 浓度范围内的 BSA 和 BGG 的标准曲线

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](http://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>