

# Thermo Scientific Pierce BCA蛋白定量分析试剂盒

本指南介绍了通过微孔板方案测定总蛋白浓度的实验方法与注意事项。微孔板方案的操作更加简便，且需要的蛋白样本的体积较小（10-25 $\mu$ L）。如需了解完整的实验方案，请查阅试剂盒中的说明书或登录赛默飞官网下载电子版说明书。

## 标准品和工作液的制备

### A. 梯度稀释牛血清白蛋白 (BSA) 标准品

按照表 1 制备一组蛋白质标准品。将一安瓿的牛血清白蛋白标准品 (BSA) 稀释到几个干净的小瓶中，建议使用与待测样本相同的稀释液。

表 1. 梯度稀释牛血清白蛋白 (BSA) 标准品

管号	稀释液的体积( $\mu$ L)	BSA 的体积和来源( $\mu$ L)	BSA 终浓度( $\mu$ g/mL)
A	0	300 $\mu$ L 原液	2000
B	125	375 $\mu$ L 原液	1500
C	325	325 $\mu$ L 原液	1000
D	175	175 $\mu$ L B 管稀释液	750
E	325	325 $\mu$ L C 管稀释液	500
F	325	325 $\mu$ L E 管稀释液	250
G	325	325 $\mu$ L F 管稀释液	125
H	400	100 $\mu$ L G 管稀释液	25
I	400	0	0 =空白

注：用于标准的试管与微孔板检测方案的稀释方法（检测范围 20-2,000 $\mu$ g/mL）

### B. 制备 BCA 工作液

1. 计算所需的工作液总体积。公式：(标准品的个数 + 待测蛋白质样本的个数)  $\times$  (实验重复次数)  $\times$  (用于每个样本的工作液的体积)

注：在微孔板方案中，每个样本需要 200 $\mu$ l 工作液。

2. 将 50 份 BCA 试剂 A 与 1 份 BCA 试剂 B 混合 (试剂 A 与试剂 B 的比例=50:1)，制备工作液。

注：当试剂 B 加入试剂 A 中时，开始会观察到浑浊产生，经搅拌后浑浊会迅速消失，得到绿色澄清工作液。工作液储存于密闭容器中，在室温下可稳定保存数天。示例：如总共需要 7.2mL BCA 工作液，则混合 7.1mL 试剂 A 与 142 $\mu$ L 试剂 B。

扫一扫，了解如何绘制标准曲线并计算蛋白浓度



## 微孔板实验方案

**1 加入稀释的标准品与样本**

25µL/孔 梯度稀释的BSA  
25µL/孔 梯度稀释的样本

**2 加入BCA工作液**

200µL/孔 BCA工作液  
加入样本/标准品孔

**4 微孔板冷却到室温后, 使用微孔板读数仪测量 562nm 或该波长附近的吸光值**

• 该方法在波长 540-590nm 范围内均可成功得到结果。

**5 绘制标准曲线, 计算蛋白样本的浓度**

- 将各个标准品和待测蛋白质样本在 562nm 处的吸光值减去空白标准品在 562nm 处的平均吸光值
- 将 BSA 标准品在 562nm 处经过空白校正的平均吸光值对其浓度 (µg/mL) 作图, 绘制标准曲线。
- 使用该标准曲线确定每个待测蛋白质样品的蛋白质浓度

**3 震荡 30 秒以充分混合。将微孔板密封, 37°C 下孵育 30 分钟**

**注:** 如果样本有限, 可将样本和标准品的用量减少至 10µL (样本与工作液的比例为 1:20)。这种情况下, 定量分析的检测范围限制在 125-2000µg/mL。

**注:** 延长孵育时间或升高温度可以使检测下限降至 20µg/mL 以下, 但检测范围也会缩小。

**注:** 微孔板酶标仪的光路长度比使用比色皿的分光光度计短, 因此微孔板方案要求样本与工作液的比例更高, 才能获得与试管标准方案相同的灵敏度。如果想要得到较高的 562nm 处的吸光值, 则需将孵育时间增加到 2 小时。

## 常见问题

Q. 哪些物质会干扰BCA定量分析的结果?

A. 部分干扰 BCA 定量分析的物质包括还原性物质、整合剂以及强酸或强碱, 即使浓度很低也可能会影响定量的结果:

维生素 C	EGTA	铁离子	低纯度蔗糖
儿茶酚胺	低纯度甘油	脂类	色氨酸
肌酐	过氧化氢	蜜二糖	酪氨酸
半胱氨酸	酰肼	酚红	尿酸

另外, 一些物质对 BCA 定量分析方法的干扰程度较低, 当其在原始样本中含量低于某特定浓度时, 仅对结果造成微小影响 (可耐受)。此外, 多种干扰物质可能产生加和作用, 例如当样本缓冲液中含有多种干扰物质时, 即使其中单一干扰物质的浓度低于可兼容浓度, 总体仍有可能对蛋白质的定量分析产生干扰。

Q. BCA法与Bradford法应如何选择?

A. 主要由样本中的干扰物质决定。如果你的蛋白抽提试剂中含有大量去垢剂且不含有螯合剂、还原剂时, 可使用BCA法; 如果你的蛋白里含有EDTA等金属螯合剂或者含有还原型物质, 且不含有去垢剂时, 可使用Bradford法。

Q. 蛋白抽提完是否可以直蛋白定量?

A. 依据测试过的数据, Thermo Scientific M-PER, RIPA 蛋白抽提试剂, Mem-Per Plus膜蛋白抽提试剂, NE-PER核蛋白抽提试剂, 亚细胞组分分离试剂盒等均可直接使用BCA进行蛋白定量, T-PER抽提后的蛋白经过稀释可使用BCA进行定量。

Q. BCA法能检测多肽浓度吗?

A. 不能, 检测多肽浓度需要用专门的多肽浓度检测试剂盒, 如Pierce™ Quantitative Fluorometric Peptide Assay (货号23290), 或Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay (货号23275)

Q. BCA法需要孵育至少30分钟, 有没有更快的方法?

A. 全新Pierce 快速Gold BCA试剂盒 (货号A53225, A53226), 只需孵育5分钟, 室温下即可进行。此外, Gold BCA试剂盒保留了经典BCA法的高线性、高去垢剂兼容性和低蛋白差异性, 使用更加快捷、简便。



赛默飞  
官方微信

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982  
销售服务信箱: sales.china@thermofisher.com  
技术咨询信箱: LifeScience-CNTS@thermofisher.com

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC