

康博®

BCA 全蛋白定量分析試劑組使用說明

CounPro® BCA Protein Quantitation Assay Instructions

快速使用指引

1. 存放條件：Package A：室溫避光/一年；Package B： $\leq -20^{\circ}\text{C}$ /一年。
2. 檢測吸收波長(nm)：562。
3. 工作液混合比例：組成 A/組成 B=50/1。
4. 樣品與工作液體積(比例)：10 μL / 200 μL (1/20)。
5. 孵育條件：在 37°C 下孵育 30 分鐘；或是在室溫下 2 小時。待測蛋白濃度低而呈色不明顯時，可改在 60°C 下孵育 30 分鐘。
6. 蛋白測量範圍：20~2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

原理介紹

如下圖一在鹼性環境下，蛋白質與 Cu^{2+} 結合，並將 Cu^{2+} 還原為 Cu^{+} 。喹啉甲酸離子 (BCA) 與 Cu^{+} 形成紫色的絡合物，這種絡合物在吸收光譜波長 562 nm 處產生吸收峰值，而此光吸收強度在蛋白質濃度範圍 (20-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 內與蛋白質含量呈線性關係。利用此比色法即可以對蛋白質進行檢測和定量。若未知濃度蛋白樣品體積較大時 (0.1 mL)，可使用比色皿(Cuvette)檢測；若體積較小 (~10 μL)，可使用 96 孔盤；或是選用 0.5 mL 薄壁離心管，搭配建議之專用光譜儀，進行測量，其操作方式請參閱使用步驟。



圖一 BCA 蛋白定量分析套組原理說明

套組組成

Package A

1. CounPro® BCA-A 劑(黑色塑膠瓶身)：500 ml X 1 瓶
2. CounPro® BCA-B 劑(白蓋玻璃瓶身)：11 ml X 1 瓶

Package B

3. 牛血清白蛋白(BSA)標準品：
 - A 瓶(2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：5.0 mL X 1 瓶 (藍蓋紅標塑膠瓶)
 - B 瓶(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：5.0 mL X 1 瓶 (藍蓋橙標塑膠瓶)
 - C 瓶(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：5.0 mL X 1 瓶 (藍蓋黃標塑膠瓶)
 - D 瓶(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：5.0 mL X 1 瓶 (藍蓋綠標塑膠瓶)
 - E 瓶(125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：5.0 mL X 1 瓶 (藍蓋藍標塑膠瓶)
 - F 瓶(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：5.0 mL X 1 瓶 (藍蓋靛標塑膠瓶)
 - G 瓶(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：5.0 mL X 1 瓶 (藍蓋紫標塑膠瓶)
 - H 瓶(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：5.0 mL X 1 瓶 (半透明蓋白標塑膠瓶)

套組運送與保存資訊

Package	組成	運送資訊	保存條件
A	CounPro [®] BCA-A 劑(黑色塑膠瓶身)	4~8 °C 冷藏運送	室溫避光下
	CounPro [®] BCA-B 劑(白色塑膠瓶身)		存放一年
B	牛血清白蛋白標準品(5 ml 塑膠瓶)		-20 °C下 存放一年

使用步驟

一、工作液的配製：

- 使用下述公式來確定所需的工作液的總體積：
使用比色皿，每個樣品需要 2.0 mL 的工作液；
使用 96 孔盤法，每個樣品需要 200 µl 工作液；
使用 0.5 mL 薄壁離心管，每個樣品需要 400 µl 工作液；
A. 工作液總體積計算方式：

$$(\text{標準品的個數} + \text{待測樣品的個數}) \times (\text{重複次數}) \times (\text{每個樣品工作液的體積}) \\ = \text{所需的工作液總體積}$$

- 舉例：使用比色皿檢測，檢測三個待測蛋白質樣品，且每個樣品進行兩次重複實驗，而標準品包含七個蛋白濃度，一個空白測試，總共八個：

$$(8\text{個標準品} + 3\text{個待測樣品}) \times (2\text{次重複實驗}) \times (2\text{ mL}) = 44\text{ mL的工作液}$$

- 將 50 份體積的 BCA-A 劑(黑色塑膠瓶身) 與 1 份體積的 BCA-B 劑(白色塑膠瓶身)混合 (試劑 A 與試劑 B 的比率 = 50 : 1)，製備工作液。如上述示例中，將 50 mL 試劑 A 和 1 mL 試劑 B 混合即可。

附註：當試劑B 加入到試劑A 中時，剛開始可觀察到有渾濁的情況，稍微攪拌後，渾濁會迅速消失，得到綠色澄清工作液。根據所要分析的樣品數量，配製足夠體積的工作液。雖然工作液儲存於密閉容器中，在室溫下可穩定保存數天，仍**不建議保存工作液到隔天再使用**。

二、比色皿(Cuvette) (樣品與工作液的比例=1:20)

- 取各個稀釋濃度的蛋白質標準品和待測蛋白質樣品各 0.1 mL，加入到做好標記的比色皿中。
- 在每個比色皿中加入 2.0 mL 工作液，稍微搖晃使其充分混合。
- 將比色皿密封，在 37 °C 下孵育 30 分鐘；或是在室溫下 2 小時(蛋白濃度範圍 20–2000 µg/mL)。待測蛋白濃度低而呈色不明顯時，可改在 60 °C 下孵育 30 分鐘(蛋白濃度範圍 5–250 µg/mL)。
- 將所有比色皿冷卻至室溫。
- 將分光光度計波長設定在 562 nm，使用一支僅裝有純水的比色管，將儀器

歸零。然後，在**10 分鐘**內，檢測所有樣品的吸光值。

附註：此時反應並沒有達到真正的終點，樣品冷卻至室溫後仍然會繼續反應顯色。但，在室溫時的顯色速率相對較慢，如果在10分鐘內完成所有樣品的檢測，不會產生明顯的誤差。

附註：該方法在波長 540-590 nm 範圍內均可得到成功的結果。

6. 將各個標準品和待測蛋白質樣品在562 nm處的吸光值減去空白標準品的平均吸光值。
7. 將BSA 標準品在562 nm處，經過空白校正的吸光值對其濃度 ($\mu\text{g/mL}$) 作圖，繪製標準檢量線。使用該檢量線來確定待測蛋白質樣品的蛋白質濃度。

三、96 孔盤 (樣品與工作液的比例=1:8)

1. 取各個稀釋濃度的蛋白質標準品和待測蛋白質樣品各 10 μL ，加入到 96 孔盤中。
2. 在每個孔中加入 200 μL 的工作液，並在震盪器上震盪 30 秒，使其充分混合。
3. 將孔盤密封，在 37 °C 下，孵育 30 分鐘；或是在室溫下 2 小時((蛋白濃度範圍 20–2000 $\mu\text{g/mL}$)。待測蛋白濃度低而呈色不明顯時，可改在 60 °C 下孵育 30 分鐘(蛋白濃度範圍 5–250 $\mu\text{g/mL}$)。
4. 將孔盤冷卻到室溫。使用孔盤讀數儀，測量樣品在 562 nm 或該波長附近的吸光值。

附註：該方法在波長 540-590 nm 範圍內均可得到成功的結果。

5. 將各個標準品和待測蛋白質樣品在562 nm處的吸光值減去空白標準品在 562nm處的平均吸光值。
6. 將 BSA 標準品在562 nm處，經過空白校正的平均吸光值對其濃度 ($\mu\text{g/mL}$) 作圖，繪製標準檢量線。使用該檢量線來確定待測蛋白質樣品的蛋白質濃度。

四、0.5 mL 薄壁離心管 (樣品與工作液的比例=1:20)

3. 取各個稀釋濃度的蛋白質標準品和待測蛋白質樣品各 20 μL ，加入到離心管中。
4. 在每一個孔中加入 400 μL 的工作液，蓋上離心管蓋，並在震盪器上震盪 30 秒，使其充分混合。
4. 在 37 °C 下，孵育 30 分鐘；或是在室溫下 2 小時。待測蛋白濃度低而呈色不明顯時，可改在 60 °C 下孵育 30 分鐘。
5. 將離心管冷卻到室溫。使用專用的讀數儀，測量樣品在 562 nm 或該波長附近的吸光值。

附註：該方法在波長 540-590 nm 範圍內均可得到成功的結果。

7. 將各個標準品和待測蛋白質樣品在562 nm處的吸光值減去空白標準品在 562nm處的平均吸光值。
8. 將 BSA 標準品在562 nm處，經過空白校正的平均吸光值對其濃度

($\mu\text{g/mL}$) 作圖，繪製標準檢量線。使用該檢量線來確定待測蛋白質樣品的蛋白質濃度。

注意事項

1. 請避免強光照射。
2. 開封後，樣品罐請勿橫放。
3. 操作時，請佩戴手套、安全眼鏡，並著實驗衣。避免直接接觸本產品，若不甚接觸，請立即以大量清水清洗接觸部位。
4. 待測蛋白濃度低而呈色不明顯時，可改在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育30分鐘，或是延長孵育時間，但，延長孵育時間或升高溫度將會增加背景吸光值，提高套組的最低檢測下限，縮小此方法的檢測範圍。若延長孵育時間或升高溫度仍無法在低蛋白濃度時，滿足您的檢測需求，可將A劑/B劑的比例調整為25/2，並調整樣品與工作液的比例為1/10，並在室溫下孵育15~30分鐘，根據我們的經驗，這樣的調整可改善套組的檢測靈敏度。
5. 若需要加熱，建議使用水浴來加熱樣品槽。細菌培養箱傳熱不均勻，可能會導致顯色上的明顯誤差。

問題排除

問題點	可能原因	解決方式
光譜在 562 nm 處完全沒有吸收強度	樣品中含有其他螯合劑，可螯合亞銅離子	1.將樣品透析純化。 2.將樣品稀釋，降低螯合劑的影響。
光譜在 562 nm 處吸收強度不如預期	pH 值受到樣品中強酸強鹼大幅度改變	1.將樣品透析純化。 2.將樣品稀釋，降低影響。
光譜在 562 nm 處吸收強度太高	樣品中的蛋白質含量太高	1.將樣品稀釋。
	樣品中含有脂質或是脂蛋白	1.加入 2%的 SDS 溶液，降低脂質或是脂蛋白的影響。
所有的試管或是孔槽皆呈現深紫色	樣品中含有還原劑	1.將樣品透析純化。
	樣品中含有硫醇	1.將樣品透析純化。

聚創新材料股份有限公司

IMT Formosa New Materials Co., Ltd.

電話 Phone: 0926-159317

電郵 Email: polycreatives@outlook.com

聯絡人 Contact: Peter Hsu

