

BCA蛋白定量

1.配置BCA工作液

1.1 A液和B液按照体积比50: 1配制BCA工作液并充分混匀。



2.稀释标准BSA

2.1 将25 mg/mL BSA蛋白标准溶液稀释至0.5 mg/mL配置BSA标准测定溶液，按0、1、2、4、8、12、16、20 μL 依次加入96孔酶标板，用稀释液补足各孔体积至20 μL 。



3.加入样本

3.1 加20 μL 体积样品到96孔酶标板的样品孔中。



4.孵育并测定吸光值

4.1 各孔加入200 μL BCA工作液，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。
4.2 在562nm波长下测定吸光值。



5.绘制标准曲线 计算蛋白浓度

5.1 以BSA浓度为横坐标， ΔA_{562} 为纵坐标，绘制标准曲线并拟合线性方程： $y=ax+b$ 。

常见问题解析

1. 标准曲线线性不佳 ($R^2 < 0.95$) 怎么办?

①验证标准品稀释步骤，推荐使用反向移液法；②确保移液器经过校准；③消除酶标板边缘效应（可避免使用外周孔位）；④确认工作液新鲜度（超过24 h应重新配制）。

2. 不同蛋白标准品测定结果差异大的原因?

①蛋白氨基酸组成差异导致 Cu^{2+} 还原能力不同；②推荐选用与样品特性匹配的标准品；③特定蛋白可能需要独立建立标准曲线。

3. 是否每次测定时都需要建立标准曲线?

①建议每次测定时都做标准曲线。由于BCA法的显色程度会随时间持续增强，且显色速率受温度影响，除非能严格把控反应时间和温度条件，否则为保证结果准确性应当每次测定都制作标准曲线。

参考文献

- [1] Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation [J]. *Methods Mol Biol*, 1994, 32: 5-8.
- [2] Labrou NE. Protein Purification Technologies [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2178: 3-10.
- [3] Krieg RC, Dong Y, Schwamborn K, et al. Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS PAGE [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2005, 65(1): 13-19.