

BCA 法蛋白含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-SP002 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

BCA 蛋白含量试剂盒提供一种简单, 快速, 耐去污剂 (最多 5%) 的检测蛋白质浓度的方法。由于蛋白质能将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ ; BCA 可与 Cu^+ 结合生成紫蓝色复合物, 在 562nm 处有最大光吸光值, 颜色的深浅与蛋白含量成正比, 因此可根据吸光值测定蛋白质浓度。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	1. 依据实验用量, 临用前试 A:B=50:1 的比例混匀成反应 mix; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同
试剂 A	液体 25mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂 B	液体 0.5mL×1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。
标准品	液体 1.5mL×1 支	4℃保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 (提取液可选用酶提取缓冲液、蒸馏水、生理盐水) 冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 即待测液。

【注】: 依据研究经验, 一般需将样本粗提液稀释到适当倍数再进行测定, 如 10 倍。实验前可以先选 2 个样本测定, 摸索确定适合本次实验的稀释倍数。

② 细菌或细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 即待测液。

【注】: 依据研究经验, 一般需将样本粗提液稀释到适当倍数再进行测定, 如 10 倍。实验前可以先选 2 个样本测定, 摸索确定适合本次实验的稀释倍数。

③ 液体样本: 澄清无色液体样品可以直接测定。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

酶标仪预热 30min, 调节波长到 562 nm。

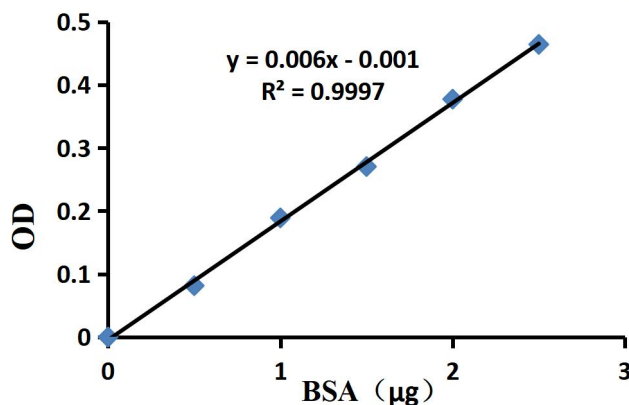
试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
样本	20	
蒸馏水		20
反应 mix	200	200
混匀, 于 37℃保温 15min, 全部转移到 96 孔板,		

于 562nm 处测定吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。

【注】：若 $\Delta A > 1.5$, 需将样本用提取液稀释后再测定。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.006x - 0.001$; x 是标准品质量 (μg) , y 是 ΔA 。



2、 $\text{Cpr (mg/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.001) \div 0.006 \times 10^{-3}] \div (V1 \div V \times W) \times D$
 $= 8.333 \times (\Delta A + 0.001) \div W \times D$

3、 $\text{Cpr (mg/mL)} = [(\Delta A + 0.001 \div 0.006 \times 10^{-3}) \div V1 \times D = 8.33 \times (\Delta A + 0.001) \times D$

4、 $\text{Cpr } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.006] \div (V1 \div V \times 500) \times D = 16.667 \times (\Delta A + 0.001) \times D$

V---提取液体积: 1mL;

V1---加入粗提液体积: 0.02mL;

W---样本质量: g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

500---细菌或细胞总数, 万。

附：标准曲线制作过程：

1 标准品母液浓度为 $1000 \mu\text{g/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 200, 400, 600, 800, $1000 \mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 $\mu\text{g/mL}$	0	200	400	600	800	1000
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0

各标准管混匀待用。

3 依据测定管加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20

反应 mix	200	200
混匀，于 37℃保温 15min，全部转移到 96 孔板， 于 562nm 处测定吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		

