

## BCA 法蛋白含量测定试剂盒说明书

(货号：ADS-W-SP002-196 微板法 196 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  $\text{Cu}^{2+}$  还原成  $\text{Cu}^+$ ；BCA 可与  $\text{Cu}^+$  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. 临用前提取液：纯水，1:1 稀释待用； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂 A	液体 50mL×1 瓶	4℃ 避光保存	1. 依据实验用量，临用前试剂 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 B	液体 1mL×1 支	4℃ 避光保存	
标准品	液体 1.5mL×1 支	4℃ 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。

### 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。

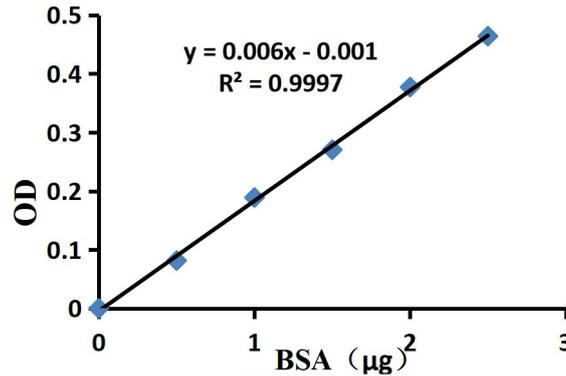
试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
样本	20	
蒸馏水		20
反应 mix	200	200

混匀，于 37°C 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 ( $\mu\text{g}$ )，y 是  $\Delta A$ 。



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 ( $\mu\text{L}$ )	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°C 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。		

