

BCA 法蛋白含量测定试剂盒说明书

(分光法 96 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂 A	液体 50mL×2 瓶	4°C保存	依据实验用量, 临用前试剂 A:B=50:1 的比例混匀成 反应 mix
试剂 B	液体 2mL×1 支	4°C保存	
标准品	液体 1.5mL×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、恒温水浴锅、移液器。

四、蛋白含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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°C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°C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、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min, 调节波长到 562 nm, 蒸馏水调零。

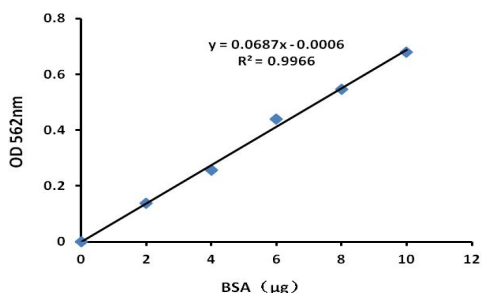
② **反应 mix** 置于 60°C水浴预热 30 min (仅煮一次即可)。

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
样本	20	
蒸馏水		20
反应 mix	800	800
混匀, 于 60°C保温 30min, 全部转移到 1mL 玻璃比色皿中, 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： $y = 0.0687x - 0.0006$ ；x 是标准品质量： μg ，y 是 ΔA 。



$$\begin{aligned} 2、\text{Cpr (mg/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0006) \div 0.0687 \times 10^{-3}] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.728 \times (\Delta A + 0.0006) \div W \times D \end{aligned}$$

$$3、\text{Cpr (mg/mL)} = [(\Delta A + 0.0006) \div 0.0687 \times 10^{-3}] \div V1 \times D = 0.728 \times (\Delta A + 0.0006) \times D$$

$$4、\text{Cpr } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0006) \div 0.0687] \div (V1 \div V \times 500) \times D = 1.46 \times (\Delta A + 0.0006) \times D$$

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（500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0,100, 200, 300, 400, 500. $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。