

## BCA 法蛋白含量测定试剂盒说明书

(微板法 196 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  $\text{Cu}^{2+}$  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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂 A	液体 50mL×1 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 <b>反应 mix</b>
试剂 B	液体 1mL×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：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、恒温水浴锅、移液器和蒸馏水。

### 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 酶标仪预热 30min，调节波长到 562 nm。

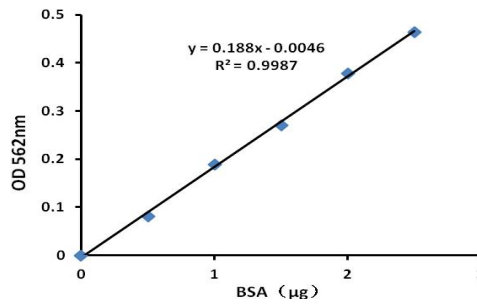
② **反应 mix** 置于 60°C水浴预热 30 min（仅煮一次即可）。

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	空白管（只做一次）
样本	5	
蒸馏水		5
<b>反应 mix</b>	200	200
混匀，于 60°C保温 30min，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： $y = 0.188x - 0.0046$ ； $x$  是标准品质量 ( $\mu\text{g}$ )， $y$  是  $\Delta A$ 。



$$2、\text{Cpr (mg/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0046) \div 0.188 \times 10^{-3}] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ = 1.06 \times (\Delta A + 0.0046) \div W \times D$$

$$3、\text{Cpr (mg/mL)} = [(\Delta A + 0.0046) \div 0.188 \times 10^{-3}] \div V1 \times D = 1.06 \times (\Delta A + 0.0046) \times D$$

$$4、\text{Cpr } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0006) \div 0.0687] \div (V1 \div V \times 500) \times D = 2.13 \times (\Delta A + 0.0006) \times D$$

V---提取液体积：1mL；

V1---加入粗提液体积：0.005mL；

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。