BCA 法蛋白含量测定试剂盒说明书

(微板法 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 25mL×1 瓶	4℃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 0.5mL×1 支	4℃保存	
标准品	液体 1.5mL×1 支	4℃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℃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、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℃水浴预热 30 min（**仅煮一次即可**）。

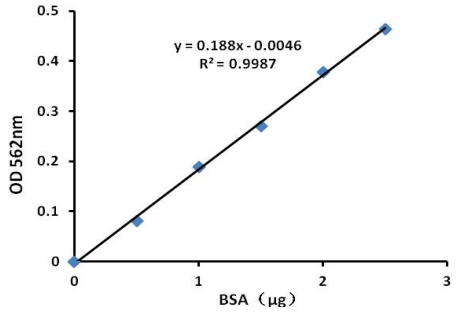
③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	空白管（只做一次）
样本	5	
蒸馏水		5
反应 mix	200	200
混匀，于 60℃保温 30min， 于 562nm 处测定吸光值 A，△A= A 测定-A 空白。		

【注】：若△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（μg），y 是△A。



2、Cpr (mg/g 鲜重)=[(△A+0.0046)÷0.188×10^{-3}]÷(V1÷V×W) ×D

=1.06×(△A+0.0046) ÷W×D

3、Cpr (mg/mL)=[(△A+0.0046)÷0.188×10^{-3}]÷V1×D=1.06×(△A+0.0046)×D

4、Cpr (μg/10^4 cell))=[(△A+0.0046)÷0.188]÷(V1÷V×500)×D=2.13×(△A+0.0046)×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（500μg/mL）。

2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0,100, 200, 300, 400, 500. μg/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。