

## BCA 法蛋白含量测定试剂盒说明书

(货号: G0418W 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  $\text{Cu}^{2+}$  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 25mL×1 瓶  | 4°C 保存 | 依据实验用量, 临用前试剂 A:B=50:1 的比例混匀成反应 mix |
| 试剂 B | 液体 0.5mL×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)。

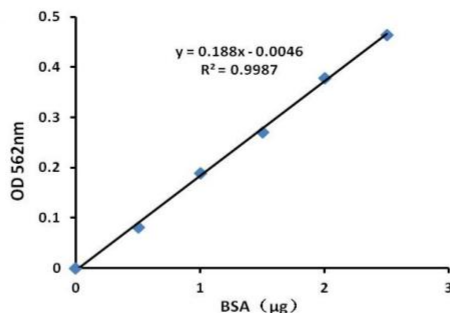
##### ③ 在 96 孔板中依次加入:

| 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°C 保温 30min,<br>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 $\Delta A$ 。



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

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

$$4、\text{Cpr (}\mu\text{g}/10^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0046) \div 0.188] \div (V1 \div V \times 500) \times D = 2.13 \times (\Delta A + 0.0046) \times D$$

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 ( $500\mu\text{g/mL}$ )。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 100, 200, 300, 400, 500.  $\mu\text{g/mL}$ 。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。