

## BCA法蛋白含量测定试剂盒说明书

### 微量法100T/96S

正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定

#### 测定意义：

样品可溶性蛋白质含量常常用于酶活性计算。此外，可溶性蛋白质含量也用于食品等质量分析。

#### 测定原理：

碱性条件下，蛋白质中半胱氨酸、胱氨酸、色氨酸、酪氨酸以及肽键，能将 $\text{Cu}^{2+}$ 还原成 $\text{Cu}^+$ ；2分子的BCA与 $\text{Cu}^+$ 结合，生成紫色络合物，在540-595nm有吸收峰，562nm处吸收峰最强。

#### 自备仪器和样品：

台式离心机、恒温水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、移液器和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂A：液体25mL×1瓶，4°C保存。

试剂B：液体0.5mL×1支，4°C保存。

标准品：液体2mL×1支，4°C保存。

**工作液配制：**临用前请根据拟用工作液体积（样本数×0.2mL），将试剂A和B按照50：1的比例混合，盖紧后充分混匀。

样品中可溶性蛋白质提取：

- 液体样品：澄清液体样品可以直接测定。
- 组织样品：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液（自备，根据需要选用酶提取缓冲液或者蒸馏水或者生理盐水）  
冰浴匀浆，10000rpm，4°C离心10min，取上清，即待测液。
- 细菌、细胞：按照细胞数量（ $10^4$ 个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后10000rpm，4°C，离心10min，取上清置于冰上待测。

测定操作：

- 可见分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到562 nm，蒸馏水调零。
- 工作液置于60°C水浴预热30 min。

	空白管	标准管	测定管
蒸馏水（ $\mu\text{L}$ ）	4		
标准品（ $\mu\text{L}$ ）		4	
待测液（ $\mu\text{L}$ ）			4

工作液 (μL)	200	200	200
混匀后置于60℃保温30min, 于微量玻璃比色皿/96孔板, 于562nm处测定吸光值A, 分别记为A空白管、A标准管、A测定管。			

**BCA法蛋白含量测定试剂盒说明书** 注意: 空白管和标准管只需要做一次。

计算公式:

$$C_{pr} (\text{mg/mL}) = C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}})$$

$$= 0.5 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}})$$

$$C_{pr} (\text{mg/g 鲜重}) = C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div W$$

$$= 0.5 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div W$$

W: 样本质量, g

注意事项:

BCA法蛋白含量测定试剂盒, 适用于测定蛋白浓度在20-5000μg/ml样品。测定前取1-2个样做预实验, 若A测定管 - A空白管 > 1.5, 需将样本用提取液稀释后再测定, 以确保测定的准确性。