

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Cu²⁺还原成Cu⁺；2分子的BCA与Cu⁺结合，生成紫色络合物，在540-595nm有吸收峰，562nm处吸收峰最强。

自备仪器和用品：

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：

1. 液体样品：澄清液体样品可以直接测定。
2. 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。

3. 细菌、细胞：按照细胞数量（10⁴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：

1. 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。
2. 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（μL）	4		
标准品（μL）		4	
待测液（μL）			4
工作液（μL）	200	200	200

混匀后置于60°C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。

注意：空白管和标准管只需要做一次。

计算公式：

$$\begin{aligned} \text{Cpr (mg/mL)} &= \text{C标准品} \times (\text{A测定管} - \text{A空白管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \\ &= 0.5 \times (\text{A测定管} - \text{A空白管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Cpr (mg/g 鲜重)} &= \text{C标准品} \times (\text{A测定管} - \text{A空白管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div W \\ &= 0.5 \times (\text{A测定管} - \text{A空白管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div W \end{aligned}$$

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20-5000 $\mu\text{g/ml}$ 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。