



BCA法蛋白含量测试说明书

微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定，确保蛋白浓度在20-2000 $\mu\text{g/ml}$ 内。

产品内容：

试剂A：液体 20ml×1瓶，4°C保存。

试剂B：液体 1ml×1支，4°C保存。

标准品0.5mg/mL：液体1ml×1支，-20°C保存。

产品说明：

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 Cu^{2+} 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。

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。

操作步骤：

一、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。（动物样品常常需要稀释）
3. 细菌、真菌：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。

二、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。

三、计算公式：

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

注意事项：

1. BCA 法蛋白含量测定试剂盒，适用于测定蛋白浓度在20-2000 $\mu\text{g/ml}$ 样品。测定前取1-2 个样做预实验，样品蛋白含量太高的话，请稀释至相应浓度范围内，以确保测定的准确性。
2. 待测样品蛋白提取可用生理盐水、蒸馏水或PBS 提取。
3. 由于受测定温度及时间等的影响，请严格按照给定条件测定。