

## 蛋白浓度（BCA法）检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHA6-M200	蛋白浓度（BCA法）检测试剂盒	200T	微量法

### 一、测定原理：

在碱性条件下，蛋白质将  $\text{Cu}^{2+}$  还原为  $\text{Cu}^+$ ， $\text{Cu}^+$  与 BCA 相互作用形成紫色的络合物，该水溶性络合物在波长 562nm 处有强烈的吸收峰，吸光度和蛋白质浓度在一定范围内呈线性关系，根据吸光度值可以推算出蛋白浓度。

### 二、试剂组成：

试剂名称	试剂装量（200T）	保存条件
试剂 A	液体 50mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂 B	液体 1mL×1 瓶	2-8℃ 保存
工作液的配制：临用前按照试剂 A:试剂 B=50:1 比例配制，充分混匀，现用现配		
标准品（1mg/mL）	液体 1mL×1 支	-20℃ 保存

### 三、操作步骤：

#### 样本前处理

细菌或培养细胞：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 200W，超声 3s，间隔 9s，重复 30 次）；8000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

#### 测定步骤

- 1、测定前将试剂恢复至常温；
- 2、标准曲线的绘制：

孔号	0	1	2	4	8	12	16	20
1mg/mL 标准品 ( $\mu\text{L}$ )	0	1	2	4	8	12	16	20
双蒸水 ( $\mu\text{L}$ )	20	19	18	16	12	8	4	0
工作液 ( $\mu\text{L}$ )	200	200	200	200	200	200	200	200
对应的蛋白浓度 (mg/mL)	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0

- 3、样本测定：将待测样本用双蒸水稀释至适当浓度，取 20 $\mu\text{L}$  样品，加入工作液 200 $\mu\text{L}$ ；

---

4、充分振荡混匀，37℃放置 20-30 分钟；

5、用酶标仪测 562 nm 处的光吸收值。

#### 四、蛋白浓度计算：

以吸光度为横坐标，以蛋白浓度为纵坐标，绘制标准曲线，并求出标准线性方程  $y=kx+b$ ， $y$ ：mg/mL。将样本吸光度值带入公式计算出样本中的蛋白浓度。若样本进行稀释，乘以相应的稀释倍数即可。

#### 五、注意事项：

- 1、不同样本中蛋白含量差异较大，需先做预实验确认样本浓度。
- 2、标准品可以分装保存，尽量避免反复冻融。
- 3、该反应颜色会随着时间的延长不断加深，并且显色反应的速度和温度有关。每次蛋白定量都需要重新做新的标准曲线，因为显色反应的颜色与温度和时间有关。
- 4、BCA 工作液需新鲜配制后立即使用。
- 5、BCA 试剂如果发现有细菌污染，则不能再使用。
- 6、BCA 法测定蛋白浓度不受绝大部分样品中的化学物质的影响，可以兼容样品中 SDS 3%，Triton X-100 5%，Tween20、60、80 5%。但本试剂盒受螯合剂和略高浓度的还原剂的影响，需确保 EDTA 低于 10mM，无 EGTA，二硫苏糖醇(DTT) 低于 0.5mM，β-巯基乙醇(β-Mercaptoethanol)低于 0.05%

## 附录 I 可溶性蛋白标准曲线制备

1、取适量完全融化的标准品用蒸馏水稀释至 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1mg/mL，制作标准曲线。

2、操作表

	空白管	标准管
双蒸水 (mL)	0.02	-
标准品 (mL)	-	0.02
试剂一 (mL)	1	1

混匀放置 2min 后，以空白管调零，在 595nm 波长下测其吸光度。

