

BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYFA6-M48	BCA蛋白浓度测定试剂盒	48T	微量法
AYFA6-M96		96T	

一、测定原理：

碱性条件下，蛋白将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ， Cu^+ 与 BCA 试剂形成紫蓝色的络合物，测定其在 562nm 处的吸收值，并与标准曲线对比，即可计算待测蛋白的浓度。常用浓度的去垢剂 SDS, TritonX-100, Tween 不影响检测结果，但受螯合剂(EDTA, EGTA)、还原剂 (DTT, 巯基乙醇) 和脂类的影响。

二、试剂组成：

试剂名称	试剂装量 (48T)	试剂装量 (96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 120mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂 A	液体 15×1 瓶	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂 B	液体 0.3mL×1 支	液体 0.3mL×2 支	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	液体 1mL×2 支	-20℃保存

三、操作步骤：

样本前处理

- 1、组织：按照组织质量 (g) :提取液(mL)为1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 2、细菌、细胞：按照细胞数量 10^4 个：提取液体积 (mL) 500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min），5000 rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
- 3、血清（浆）等液体：直接测定。

测定步骤

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 562nm，蒸馏水调零。
- 2、测定前将试剂恢复至常温；

3、将1mg/mL标准品用蒸馏水依次稀释至0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1mg/mL;

4、操作表:

	空白管	标准管	测定管
标准品 (μL)	-	20	-
样品 (μL)	-	-	20
双蒸水 (μL)	20	-	-
工作液 (μL)	200	200	200
混匀后 37°C放置 30min, 恢复室温后, 于 562nm 进行测定			

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%