

# 蛋白定量 (BCA) 检测试剂盒

(货号: BC016 微板法)

## 一、测定意义及原理

碱性条件下, 蛋白将 $Cu^{2+}$ 还原为 $Cu^+$ ,  $Cu^+$ 与 BCA 试剂形成紫色的络合物, 562 nm 处有最大吸收峰, 依据吸光度与浓度成正比, 通过吸光度即可计算待测蛋白的浓度。

## 二、试剂组成及配制 (500T)

|   | 组分  | 500T       | 保存条件           |
|---|---|------------|----------------|
| 试剂一   | 粉剂  | 粉剂*2 瓶     | 4°C密封保存 6 个月   |
|   | 稀释液   | 12.5ml*2 瓶 | 4°C密封保存 6 个月   |
|   | 试剂一应用液的配制: 取试剂一粉剂 1 支与试剂一稀释液混匀, 溶解完全后 4°C待用 |            |                |
| 试剂二   | 液体  | 250ul*2 瓶  | 4°C密封保存 6 个月   |
| 工作液的配制: 按试剂一应用液: 试剂二 = 50:1 的比例配制, 用多少配多少, 现用现配 |   |            |                |
| 试剂三   | 524 $\mu$ g/ml 蛋白标准液                        | 0.2ml*1 瓶  | -20°C冷冻保存 6 个月 |

## 三、操作过程:

### 1、样本处理:

①、血清 (浆): 直接测定, 如超过线性范围用生理盐水稀释后测定。

②、培养液样本: 吸取培养液, 1000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清测定。[注]: 一般建议细胞密度在 100 万个/mL 以上。

③、组织样本: 准确称取组织重量,按重量 (g): 体积 (mL) =1: 9 的比例, 加入 9 倍体积的匀浆介质, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。[注]: 如组织样本为非高脂样本, 匀浆介质用磷酸盐缓冲液 (0.1mol/L pH 7.4) 或生理盐水 (0.9%) 进行提取: 如组织样本为高脂样本或部分为高脂样本, 匀浆介质可统一用无水乙醇进行提取。

### ④、细胞样本:

A、细胞收集: 将制备好的细胞悬液取出, 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 用等渗缓冲液 (推荐 0.1mol/L、pH7~7.4 磷酸盐缓冲液) 清洗 1~2 次, 同样 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀;

B、细胞破碎:加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质 (推荐 0.1mol/L、pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水) 进行匀浆, 冰水浴条件下超声破碎 (功率: 300W, 3~5 秒/次, 间隔 30 秒, 重复 3~5 次) 或手动匀浆, 制备好的匀浆液不离心直接测定。也可采用裂解液裂解 (推荐



TritonX-100, 1-2%,裂解 30~40 分钟), 裂解好的液体不离心直接测定。[注]:建议细胞密度在 100 万个/mL 以上。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全

## 2、所需设备仪器



单通道移液器: 可进行单孔的加样操作

多通道移液器: 8 通道或是 12 通道移液器



酶标仪: 用于微量样品比色分析, 吸光度值测定

恒温水浴箱或气浴温箱: 用于孵育反应

## 3, 操作表:

|          | 空白孔 | 标准孔 | 样本孔 |
|----------|-----|-----|-----|
| 双蒸水 (μl) | 10  |     |     |
| 标准品 (μl) |     | 10  |     |
| 样本 (μl)  |     |     | 10  |
| 工作液 (μl) | 250 | 250 | 250 |

混匀, 37°C 孵育 30 分钟, 波长 562nm, 酶标仪测定各孔吸光度值。

## 四: 计算公式:

$$\text{总蛋白浓度} (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{样本OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准品OD值} - \text{空白OD值}} \times C_{\text{标准}} \times \text{样本测试前稀释倍数}_{N\text{倍}}$$

$C_{\text{标准}}$ : 标准品浓度, μg/ml (具体浓度见标签)。

