

BCA 法蛋白质含量检测试剂盒（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。

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 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。

试剂组成和配制：

试剂 A：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂 B：液体 0.5mL×1 支，4℃ 保存。

标准品：液体 2mL×1 支，4℃ 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℃ 离心 10min，取上清，即待测液。
3. 细菌、细胞：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℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

测定步骤:

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℃ 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℃ 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:

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

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

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 20-5000μg/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。