



蛋白定量（TP）测定试剂盒说明书

（货号：A045-4 BCA法 微板法）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书，预试后再进行批量实验，否则由此导致的后果用户自行承担！

一、试剂组成与配制：（试剂盒有效期6个月）

	组份	48T A045-4-1	96T A045-4-2	保存条件
试剂一	粉剂	粉剂×1支	粉剂×2支	4℃
	稀释液	12.5mL×1瓶	12.5mL×2瓶	4℃
试剂一应用液的配制：取试剂一粉剂1支与1瓶试剂一稀释液混合，充分振荡混匀，完全溶解后4℃待用(用不完的4℃可保存一个月)。				
试剂二	液体	250μL×1支	250μL×2支	4℃
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	524μg/mL 蛋白标准液	0.2mL×1支	0.2mL×1支	-20℃
附送96孔透明平底酶标板一块				

二、所需仪器及试剂：

可调562nm（或530nm~580nm）波长的酶标仪及96孔板（附送一块），涡旋混匀器，37℃水浴锅或恒温箱，蒸馏水，生理盐水。

三、样本前处理：

- 动物组织样本：**准确称取组织重量，按重量（g）：体积（mL）=1:9的比例，加入9倍体积的生理盐水，冰水浴条件下机械匀浆，2500转/分，离心10分钟，取上清液再用生理盐水按1:9稀释成1%组织匀浆，或按1：19稀释成0.5%的组织匀浆，待测。
- 植物组织样本：**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（匀浆介质推荐0.01mol/L pH7.4磷酸盐缓冲液或生理盐水），冰水浴条件下机械匀浆，3500转/分，离心10分钟，取上清液再用生理盐水按1:9稀释成1%组织匀浆，或按1：19稀释成0.5%的组织匀浆，待测。
- 培养细胞样本前处理：**将收集好的细胞用等渗缓冲液（推荐0.01mol/L pH7~7.4磷酸盐缓冲液或生理盐水）清洗1~2次；1000转/分，离心10分钟，弃上清，留细胞沉淀，加入匀浆介质（推荐加入0.01mol/L pH7~7.4磷酸盐缓冲液或生理盐水），冰水浴条件下超声破碎（功率300W，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，待测。

注：组织或细胞的匀浆介质不仅可用上述所列的生理盐水和磷酸盐缓冲液，其它的提取液（原则上不干扰试剂反应的都可以）提取的匀浆液也可以检测。若是蛋白用于其它指标的计算，则样本无需再进行前处理，直接使用该指标预处理制备的匀浆上清检测即可。

- 血清（浆）样本：**按血清（浆）：生理盐水=1：49的比例稀释（或1:99稀释），待测。
- 其它液体样本：**按比例稀释，测定范围为20~2000μg/mL，（不同的样本稀释度不一样），请在批量测试前先做1~2个样本的预实验（选择测定孔吸光值接近标准孔吸光值对应的样本稀释倍数来做正式实验）。

注：本试剂盒所测为样本中可溶性蛋白总量。

四、操作步骤：（在96孔板中操作）

	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水（μL）	10		
524μg/mL标准液（μL）		10	
待测样本（μL）			10
工作液（μL）	250	250	250
轻轻震荡孔板混匀，37℃孵育30分钟，562nm波长，酶标仪读取各孔吸光度值A。			

五、计算公式：

$$\text{蛋白浓度} (\mu\text{g/mL}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

C_{标准}：标准液浓度，524μg/mL；N：样本测试前稀释倍数。

六、计算举例：

例1：10%大鼠肾组织匀浆上清液用生理盐水20倍稀释成0.5%的浓度，取样10μL按操作表检测，结果如下：空白孔OD值0.044，标准管OD值为0.336，测定管OD值为0.422，标准管浓度为524μg/mL，计算结果为：

$$\begin{aligned} 0.5\% \text{大鼠肾匀浆} &= \frac{0.422 - 0.044}{0.336 - 0.044} \times 524 \\ \text{蛋白浓度} (\mu\text{g/mL}) &= 678.3 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 10\% \text{大鼠肾匀浆} &= \frac{0.422 - 0.044}{0.336 - 0.044} \times 524 \times 20 \\ \text{蛋白浓度} (\mu\text{g/mL}) &= 13566.6 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

例2：10%小鼠脑组织匀浆上清液用生理盐水10倍稀释成1%的浓度，取样10μL按操作表检测，结果如下：空白孔OD值0.044，标准管OD值为0.336，测定管OD值为0.268，标准管浓度为524μg/mL，计算结果为：

$$\begin{aligned} 1\% \text{大鼠脑匀浆} &= \frac{0.268 - 0.044}{0.336 - 0.044} \times 524 \\ \text{蛋白浓度} (\mu\text{g/mL}) &= 402.0 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 10\% \text{大鼠脑匀浆} &= \frac{0.268 - 0.044}{0.336 - 0.044} \times 524 \times 10 \\ \text{蛋白浓度} (\mu\text{g/mL}) &= 4019.7 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

例3：10%对虾肌肉组织匀浆上清液用生理盐水10倍稀释成1%的浓度，取样10μL按操作表检测，结果如下：空白孔OD值0.044，标准管OD值为0.336，测定管OD值为0.328，标准管浓度为524μg/mL，计算结果为：

$$\begin{aligned} 1\% \text{对虾肌肉匀浆} &= \frac{0.328 - 0.044}{0.336 - 0.044} \times 524 \\ \text{蛋白浓度} (\mu\text{g/mL}) &= 509.6 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 10\% \text{对虾肌肉匀浆} &= \frac{0.328 - 0.044}{0.336 - 0.044} \times 524 \times 10 \\ \text{蛋白浓度} (\mu\text{g/mL}) &= 5096.4 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

例4：取10%小麦根匀浆上清液10μL（50mmol/L PBS作为匀浆介质），按操作表检测，结果如下：空白孔OD值0.044，标准管OD值为0.336，测定管OD值为0.386，标准管浓度为524μg/mL，计算结果为：

$$\begin{aligned} 10\% \text{小麦根匀浆} &= \frac{0.386 - 0.044}{0.336 - 0.044} \times 524 \\ \text{蛋白浓度} (\mu\text{g/mL}) &= 613.7 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

例5：六孔板培养肝细胞，胰酶消化细胞并终止，1000转/分离心5分钟，弃上清，再加入1mL生理盐水轻轻吹打混匀（将胰酶及部分培养液洗去），1000转/分离心5分钟弃上清，留沉淀细胞加入0.3mL生理盐水，冰水浴下电动研磨，每次5~10秒，间隔20秒，总共研磨4次，不离心直接取样检测，测得空白孔吸光度为0.044，标准孔吸光度为0.336，测定孔吸光度为0.293，标准管浓度为524μg/mL，计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{破碎后细胞} &= \frac{0.293 - 0.044}{0.336 - 0.044} \times 524 \\ \text{蛋白浓度} (\mu\text{g/mL}) &= 446.8 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$



例 6: 用生理盐水将人血浆 100 倍稀释,充分混匀,取 10 μ L 稀释后的血清用微板测定,测得空白孔吸光度为 0.044,标准孔吸光度为 0.336,测定孔吸光度为 0.428,标准管浓度为 524 μ g/mL,计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{人血浆蛋白浓度} (\mu\text{g/mL}) &= \frac{0.428 - 0.044}{0.336 - 0.044} \times 524 \times 100 \\ &= 68909.6 \mu\text{g/mL} \\ &= 68.91 \text{mg/mL} \end{aligned}$$

七、测定原理:

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

八、所需仪器设备:

单道移液器:可进行单孔的加样工作

多道移液器:8 道或 12 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

九、技术参数:

项目序号	指标名称	指标要求
1	试剂盒检出限	20 μ g/mL
2	试剂盒批内 CV	1.81%
3	试剂盒批间 CV	4.51%
4	试剂盒回收率	98.5%
5	线性范围 20~2000 μ g/mL	$R^2=0.999$
6	波长选择范围	530nm~580nm

十、产品特点:

- 快速简单:比经典的 Lowry 法快 4 倍而且更加方便;
- 经济实用:既可用试管也可用微板进行测定,测定在微孔板中进行,需样本量极微;
- 灵敏度高:检测浓度下限达到 20 μ g/mL,最小检测蛋白量达到 0.5 μ g,待测样品体积为 1~20 μ L,在 20~2000 μ g/mL 浓度范围内有良好的线性关系;
- 本法测定蛋白浓度不受绝大部分化学物质的影响,包括不受离子型和非离子型去污剂影响,可以兼容样品中高达 5% 的 SDS,5% 的 Triton X-100,5% 的 Tween 20,60,80,所以大部分不同种类的样本提取液(匀浆介质)不影响本法蛋白测定;
- 检测不同蛋白质分子的变异系数远小于考马斯亮蓝法蛋白定量;
- BCA 蛋白质定量检测试剂在蛋白质的表达纯化,结构和功能的研究工作中,蛋白质的定量随处可见。BCA (bicinchoninic acid) 蛋白质检测试剂是当前比 Lowry 法更优越的专用于检测总蛋白质含量的产品。该方法以快速灵敏、稳定可靠且对不同种类蛋白质变异系数甚小而深受专业人士的青睐,是目前国际上最流行的蛋白质定量检测方法。
- 鉴于试剂盒灵敏度高,实验所用器皿必须无蛋白污染。

附录 I: 标准曲线的制作 (选做)

1、前处理:

将 52.4g/L (52400 μ g/mL) 蛋白标准液用蒸馏水稀释成不同浓度:50、100、250、500、1000 μ 、2000 μ g/mL,然后按操作表进行操作。[注]:52.4g/L 高浓度蛋白标准液需另购(本公司有售)或可用自有的高浓度蛋白标准液,此标准曲线客户可以不做,直接用计算公式进行计算即可。

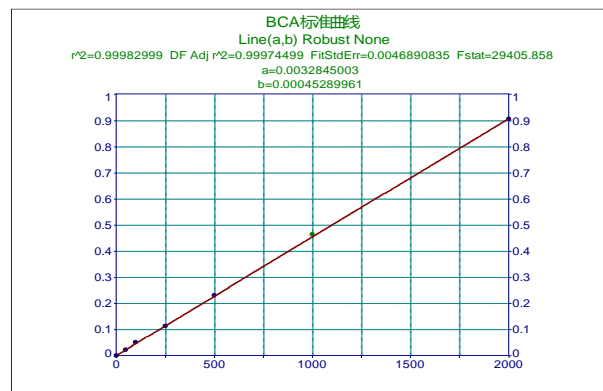
2、操作表:

	空白孔	标准孔
蒸馏水 (μ L)	10	
不同浓度的标准液 (μ L)		10
工作液 (μ L)	250	250

轻轻震荡孔板混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟,562nm 波长,酶标仪读取各孔吸光度值 A。

3、测定结果:

标准液浓度 (μ g/mL)	吸光度值	绝对吸光度 (OD) 值
0	0.044	0
50	0.067	0.023
100	0.095	0.051
250	0.158	0.114
500	0.275	0.231
1000	0.508	0.464
2000	0.949	0.905



注:若是制作标准曲线,则可将测定管绝对吸光值(A 测定-A 空白)代入标曲计算得到的值,再乘以样本测试前稀释倍数,即可得到样本(或匀浆液)中蛋白浓度。