



蛋白定量（TP）测定试剂盒说明书(精简版)

(货号：A045-4 BCA 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、试剂组成及配制：（本试剂盒按保存条件保存有效期 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℃密封
	稀释液	12.5mL×1 瓶	12.5mL×2 瓶	4℃密封
	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合，溶解完全后 4℃待用			
试剂二	液体	250μL×1 支	250μL×2 支	4℃密封
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℃

二、所需仪器耗材及试剂：

含 530-580nm 波长的酶标仪及 96 孔板（附送一块）、37℃ 水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水（0.9%）或 PBS（0.1M）、涡旋混匀器、试管或离心管。

三、样本前处理：

- 1、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。
- 2、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 0.1mol/L pH 7.4 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。
- 3、培养细胞样本前处理：将收集好的细胞用等渗缓冲液（推荐 0.1mol/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 0.1mol/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：组织或细胞提取液不局限于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）提取的匀浆液一样可以检测。

- 4、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。
- 5、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。

四、操作步骤：

	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水（μL）	10		
524μg/mL 标准品（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。			

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}：标准品浓度，524μg/mL；N：样本测试前稀释倍数。

六、测定原理：

碱性条件下，蛋白将 Cu²⁺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。

七、技术参数：

项目序号	指标名称	指标要求
1	试剂盒检出限	20μg/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 20~2000μg/mL	R ² =0.999
6	波长选择范围	530nm~580nm

八、产品特点：

- 1、快速简单：比经典的 Lowry 法快 4 倍而且更加方便；
- 2、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；
- 3、灵敏度高：检测浓度下限达到 20μg/mL，最小检测蛋白量达到 0.5μg，待测样品体积为 1~20μL，在 20~2000μg/mL 浓度范围内有良好的线性关系；
- 4、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；
- 5、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；
- 6、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。
- 7、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

1、前处理：

将 52.4g/L（52400μg/mL）蛋白标准品用蒸馏水稀释成不同浓度：50、100、250、500、1000μ、2000μg/mL，然后按下表进行操作。

[注]：52.4g/L 高浓度蛋白标准品老师需自备（本所有售），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（μL）	10	
不同浓度的标准品（μL）		10
工作液（μL）	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。		

3、测定结果：

标准品浓度（μg/mL）	测定 OD 值	绝对 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

