



多莱泌生物科技（武汉）有限公司

项目名称	BCA 检测样本蛋白浓度		
检测样本	***（来源）外泌体		
客户姓名	001	实验室负责人	吴笛笛
报告撰写人	高小艳	报告复核人	刘丕菊
报告撰写日期	年-月-日		

BCA 检测样本蛋白浓度报告

1. 实验原理

碱性条件下，蛋白将 Cu^{2+} 还原为 Cu^{+} ， Cu^{+} 与 BCA 试剂形成紫颜色的络合物，吸光强度浓度。本产品蛋白质测定范围为 $15.6-2000\mu\text{gprot/mL}$ ，1 小时左右即可完成测定。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，可以兼容样品中高达 5% 的 SDS，5% 的 Triton X-100，5% 的 Tween 20。但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，二硫苏糖醇低于 1mM， β -巯基乙醇低于 0.01%。

2. 实验目的

通过 BCA 检测试剂盒，对样本中总蛋白含量进行定量。

3. 实验试剂

编号	名称	货号
BCA 试剂 A 液	多莱泌生物	DL22002-A
BCA 试剂 B 液	多莱泌生物	DL22002-B
蛋白标准品	多莱泌生物	DL22002-C
PBS	多莱泌生物	DL22020

4. 实验仪器

仪器名称	厂家	型号
酶标仪	KHB	ST-360
旋涡混合器	海门其林贝尔	QL-901

5. 操作步骤

1、配制工作液：根据标准品和样品数量，按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B（50:1）配制适量 BCA 工作液，充分混匀。

2、按照下表将标准品稀释至 $15.6-2000\mu\text{gprot/mL}$ 。稀释液应选取 PBS。

管号	稀释液体积(μL)	标准品体积(μL)	终浓度 (μgprot/mL)
1	150	100	2000
2	50	50 (从 1 管取)	1000
3	50	50 (从 2 管取)	500
4	50	50 (从 3 管取)	250
5	50	50 (从 4 管取)	125
6	50	50 (从 5 管取)	62.5
7	50	50 (从 6 管取)	31.3
8	50	50 (从 7 管取)	15.6
9	50	0	0

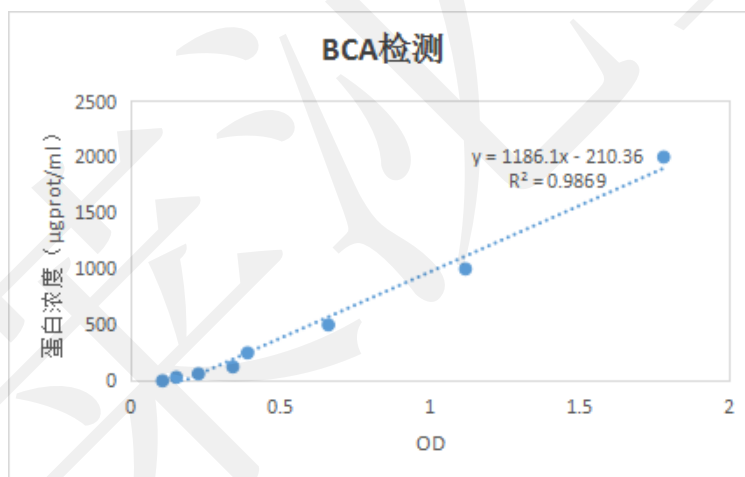
3、将 25uL 的标准品或合适浓度范围的样本分别加入 96 孔板的微孔中。

4、入 200μL BCA 工作液，充分混匀。

5、盖上 96 孔板盖，37℃孵育 30 分钟。

6、冷却到室温，用酶标仪测定 A562，根据标准曲线计算出蛋白浓度。

6. 实验结果



结果分析：

样本编号	OD1	OD2	OD平均	稀释倍数	蛋白浓度 (ugprot/uL)
*** 外泌体	***	***	***	*	***

附件：外泌体提取方法

1、血清外泌体提取

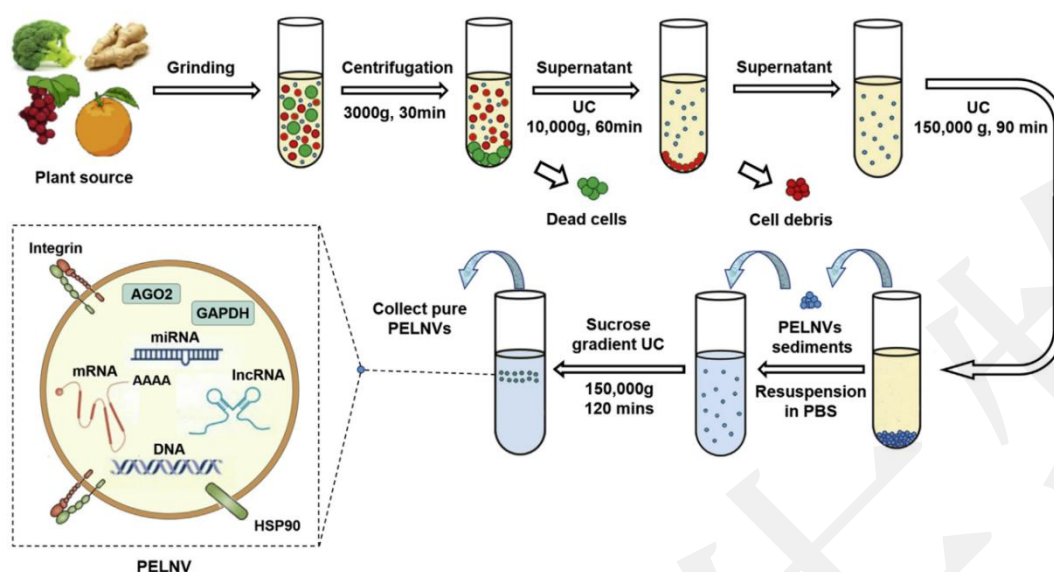
- (1) 血清通过 1500g 离心 10min，去除颗粒物；
- (2) 上清 4℃，10000g 离心 30min 去除小沉淀，吸取上清到新的离心管；
- (3) 0.22μm 滤器进行过滤，去除残渣；
- (4) 4℃，100000g 离心 1h；
- (5) 弃上清，将下层白红色沉淀使用 PBS 重悬后 4℃，100000g 离心 1h；
- (6) 弃上清，底部外泌体沉淀加入 100-200μl PBS 重悬收集后保存于-80℃。

2、细胞上清外泌体提取

- (1) 细胞上清 4℃，10000g 离心 30min 去除细胞碎片等沉淀，吸取细胞上清到新的离心管；
- (2) 样本量较大时需要浓缩，浓缩方法为 100KD 超滤管 3500×g 离心 15min，时间可根据样本调整；
- (3) 0.22 μm 滤膜过滤，收集过滤液；
- (4) 将过滤液移至新的离心管中，4℃，120,000 ×g 离心 90 min；
- (5) 去除上清，用 100-200 μl（适当体积）预冷的 1×PBS 重悬外泌体。

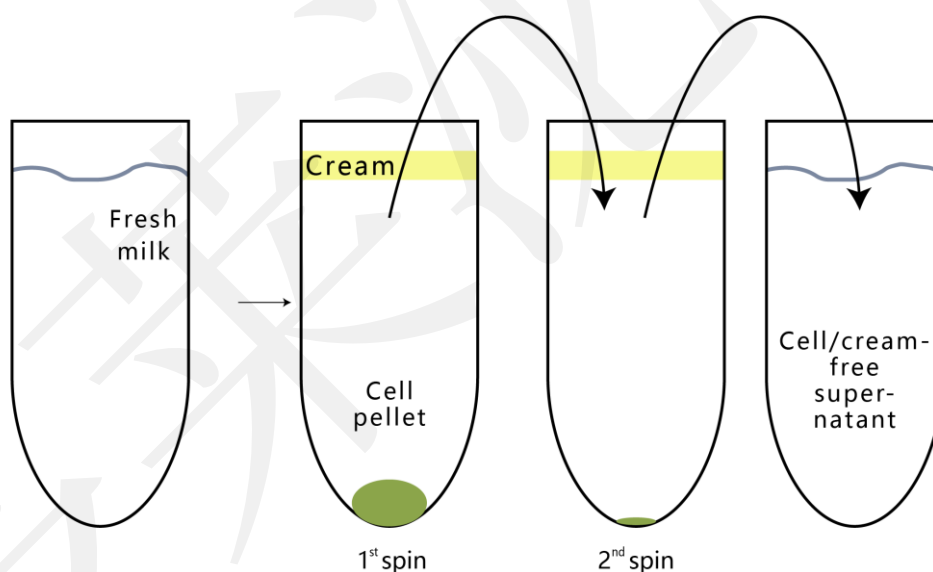
3、植物外泌体样纳米囊泡（PELNVs）提取

- (1) 将植物清洗干净后研磨；
- (2) 4℃，3000g 离心 30min 去除死细胞，取上清；
- (3) 4℃，10000g 离心 60min 去除细胞碎片，取上清；
- (4) 4℃，150000g 离心 90min，弃上清；
- (5) 为了进一步纯化，将匀浆悬浮液进行蔗糖梯度超离心（SGC）（8%、15%、30%、45%和 60%），150000g 离心 120 分钟；
- (6) 30%/45%层的蔗糖梯度作为 PELNVs 的主要来源。



4、牛奶外泌体提取

(1) 牛奶样本 4℃，5000g 离心 10min，取中间层乳清，上层脂肪和底部细胞都不要。示意图如下：



- (2) 乳清 4℃，16500g 离心 60min，得到澄清的上清液，底部掺杂不要，留上清；
- (3) 上清用 0.22μm 的滤器过滤，获取过滤后的牛奶澄清液；
- (4) 牛奶澄清液 4℃，100000g 超速离心 90min，弃上清；
- (5) 沉淀用 PBS 重悬后，4℃，100000g 离心 1h；
- (6) 去除上清，外泌体沉淀用适当体积预冷的 1×PBS 重悬。