

蛋
白
质
系
列

CAT#:101102-1000

常温运输和保存 (BSA 需-20℃保存)

TIANDZ

改良 Lowry 法蛋白定量试剂盒

Modified Lowry Protein Assay Kit

使用手册 V1.1

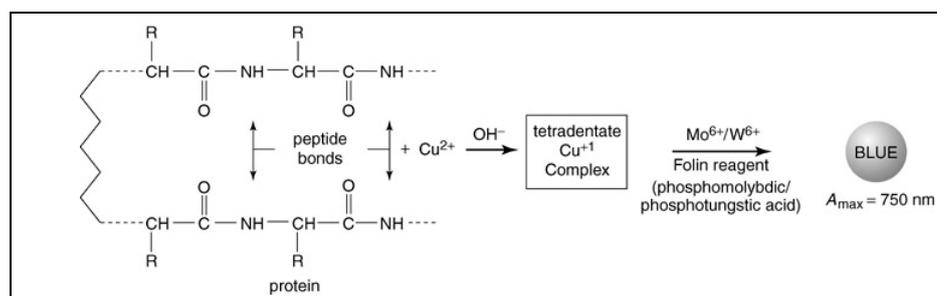
北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点

Folin 酚试剂（磷钼酸和磷钨酸混合物）跟蛋白质中含酚氨基酸（色氨酸和酪氨酸）发生颜色反应，可用于测定蛋白质浓度，但灵敏度较低。Lowry 在此基础上加入 Biuret（双缩脲）反应步骤，即先在碱性条件下使蛋白质和 Cu^{2+} 形成复合物，再使其与 Folin 酚试剂发生显色反应，产物在 750nm 检测。Lowry 法使不含酚的蛋白质也能被检测出来，灵敏度是单独使用 Folin 酚的 10 倍左右，是双缩脲反应的 200 倍，因此成为早期检测蛋白浓度的主要方法。Lowry 检测原理图如下：



传统 Lowry 法受到很多常用的试剂（如 DTT、糖、甘油、Triton 等）干扰，步骤繁琐。本公司对 Lowry 法进行改良，具有下列特点：

1. 即开即用，不需要单独购买每个成分再配制。
2. 能抵抗部分干扰物（如一定浓度 SDS 或其他去污剂）的干扰。
3. 检测线性范围广，在 2-100 μg ，检测上限比经典 Lowry 法高 30%-40%。

规格及成分

| 成份 | 编号 | 1000 次包装 |
|---------------------------|----------|----------------------|
| 溶液 A 成分一 | 101102A1 | 208 mL |
| 溶液 A 成分二 | 101102A2 | 16 mL |
| 溶液 A 成分三 | 101102A3 | 16 mL |
| 溶液 B | 101102B | 80 mL |
| 溶液 C | 101102C | 80 mL |
| 福林酚 | 100939 | 10 mL (用 100 mL 棕色瓶) |
| BSA 标准品 (2 mg/mL in 水) | 101102D | 1 mL |
| 使用手册 | | 1 份 |

运输及保存

常温运输和保存（但 BSA 标准品需要 -20°C 保存），有效期一年。

自备试剂

去离子水、蛋白样品、样品缓冲液

使用方法

一：准备工作

- 1、 制备溶液 A：将 16 mL 溶液 A 成分二和 16 mL 溶液 A 成分三加入到装溶液 A 成分一的塑料瓶中，混合均匀得到 240 mL 溶液 A。注意：溶液 A 各成分分开提供更加稳定。
- 2、 制备 Lowry 工作液：将溶液 A、溶液 B 和溶液 C 按 3：1：1 的体积比混

合得到 Lowry 工作液。此工作液可以室温放置 2-3 周，所以最好用多少配多少。如果发现溶液 B 或溶液 C 有沉淀，需 37℃溶解并摇匀后再使用。

- 3、制备福林酚工作液：在装有 10 mL 福林酚的棕色塑料瓶中加入 90 mL 去离子水，摇晃混匀待用。此工作液在避光条件下可以放置 6 个月。

二：试管法

- 4、先用去离子水将 BSA 标准 (2 mg/mL) 稀释到 50 ug/mL，然后在标记的试管中加入下列成分 (单位：uL)。注意：每个样品最好做三个稀释度，每个稀释度最好设置三次重复，阴性对照和标准品也最好做三次重复。

| 标准品 (每个做三次重复，此处只列出一个) | | | |
|---|----------------------------|-----|-----|
| 编号 | BSA 标准 (50 ug/mL) | 水 | 总体积 |
| 阴性对照 | 0 | 0 | 200 |
| 1 | 0 | 200 | 200 |
| 2 | 25 | 175 | 200 |
| 3 | 50 | 150 | 200 |
| 4 | 100 | 100 | 200 |
| 5 | 150 | 50 | 200 |
| 6 | 200 | 0 | 200 |
| 样品 (以 1 个样品、3 个稀释度为例，每个稀释度三个重复，此处只列出一个) | | | |
| 编号 | 样品 | 总体积 | |
| 1 | 200 (稀释度 1) | 200 | |
| 阴性对照 1 | 200 (用稀释度 1 稀释的溶解蛋白样品的缓冲液) | 200 | |
| 2 | 200 (稀释度 2) | 200 | |
| 阴性对照 2 | 200 (用稀释度 2 稀释的溶解蛋白样品的缓冲液) | 200 | |
| 3 | 200 (稀释度 3) | 200 | |
| 阴性对照 3 | 200 (用稀释度 3 稀释的溶解蛋白样品的缓冲液) | 200 | |

- 5、每管中加入 200 uL Lowry 工作液，振荡混匀后室温反应 10 分钟。
- 6、每管中加入 100 uL 福林酚工作液，振荡混匀后室温反应 30 分钟。
- 7、用容量为 0.5 mL、光径为 1 cm 的玻璃比色杯或聚苯乙烯比色杯测定 750 nm 的光吸收。测定时，先空白 (即阴性对照) 后样品，测定样品和 BSA 标准品时，先低浓度后高浓度。测定未知样品前需要将杯子清洗干净，必要时可以用甲醇清洗吸附到比色杯壁上的染料。
- 8、根据标准品三个重复的平均值绘制标准曲线，然后根据未知样品的光吸收

从标准曲线中查得其对应的浓度。

三：96 微孔板法

9、同上，只是反应用 96 微孔板设置，用酶标测试仪 750 nm 测定光吸收。

四、样品中干扰物质的去除（本产品不含相关产品，

如果样品中有干扰 Lowry 法蛋白定量的物质（见附表），可另购本公司的微量蛋白质沉淀试剂盒（CAT#:81217-50）去除，也可以用自备试剂按下法去除：用水将样品调到体积为 200 uL，加入 20 uL 0.15% 去氧胆酸钠，混匀，室温放置 10 分钟。加入 20 uL 72% 的 TCA，室温放置 5 分钟。3000 g 离心 15 分钟，小心去除上清。用 200 ul 水溶解蛋白沉淀后以用于 Lowry 法测定。

附：常见 Lowry 法蛋白定量干扰物（低于所列浓度不干扰，高于所列浓度则会干扰，需要按上法去除。不能含任何浓度的 DTE，DTT 和硫酸胺）。

| 干扰物 | 浓度 | 干扰物 | 浓度 |
|-----------|----------|-------------------|--------|
| Acetone | 10% | 2-Mercaptoethanol | 1 mM |
| Aprotinin | 10 mg/mL | NaCl | 1 M |
| CHAPS | 0.05% | NaOH | 100 mM |
| DMF | 10% | NaPi | 100 mM |
| DMSO | 10% | NP40 | 0.02% |
| EDTA | 1 mM | PMSF | 1 mM |
| EGTA | 1 mM | SDS | 1% |
| Ethanol | 10% | Sodium Citrate | 100 mM |
| Glucose | 100 mM | Sucrose | 7% |
| Glycin | 100 mM | Tris | 10 mM |
| HEPES | 1 mM | Triton X-100 | 0.03% |
| Imidazole | 25 mM | Tween 20 | 0.05% |
| Methanol | 10% | Urea | 3M |

疑难解答

1. 该方法检测的蛋白质浓度范围 1ug-50ug/ml。
2. 由于 Lowry 法测定的是蛋白质中酪氨酸残基，对于那些酪氨酸残基数高于或低于 BSA，其测定的蛋白质含量将偏低或偏高。如果遇到该情况，需要采用 BCA 或 Bradford 法测定。
3. 阅读测定方法后化学试剂对测定方法的影响。

相关产品

微量蛋白质沉淀试剂盒（CAT#:81217-50），
超敏型 BCA 法蛋白定量试剂盒（CAT#:80816）