天净沙系列

CAT#:220168

常温运输和保存

天净沙

改良 Lowry 法蛋白定量试剂盒

Modified Lowry Protein Assay Kit

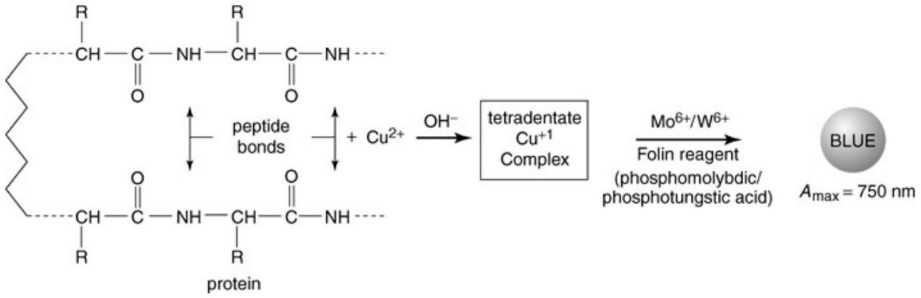
使用手册 V1.02

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

Folin 酚（福林酚）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+形成复合物，此复合物再使 Folin 酚试剂还原，发生显色反应，产物在 500 nm-750 nm 之间均可检测。Lowry 法可以同时检测含芳香环基团氨基酸和肽键，故灵敏度是单独使用 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 法检测原理图如下：



Lowry 法检测是基于还原反应，故极易受还原剂（DTT、巯基乙醇、半胱氨酸和谷胱甘肽等）、糖（果糖、蔗糖等）、含芳香环基团的氨基酸（酪氨酸和色氨酸）、甘油、钾离子、尿素、硫酸铵（铵离子具有还原性）、EDTA 这些常见试剂的干扰，为此本公司对 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. 可以直接测定水溶性细胞成份和非水溶性细胞成份（如细胞膜系制备物，细胞膜蛋白，脂蛋白，酸沉淀物，冻干粉等）的蛋白含量。
3. 能抵抗部分干扰物（如 0.1 M 蔗糖、2.5 mM EDTA、4 M 尿素和 1%去污剂）的干扰。如需进一步去除还原剂等其他干扰物质，需要按附录方法处理。
4. 检测线性范围广，在 2-100 μg，检测上限比经典 Lowry 法高 30%-40%。
5. 本试剂盒足够 100 次 1 mL 体系的比色皿测定或 400 次 0.25 mL 的微孔板测定。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成分	编号	规格	包装
改良 Lowry 法溶液 A	220168a	75 mL	100 mL 棕塑瓶
改良 Lowry 法溶液 B	220168b	1 mL	1.5 mL 本色瓶
福林酚	221147	50 mL	50 mL 棕玻瓶
BSA 标准品，2 mg/mL	220565	1 mL	1.5 mL 本色管

	使用手册	220168sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，但收到货后 BSA 标准品需要放-20℃保存，福林酚需要放 4℃保存，有效期 12 个月。

自备试剂

去离子水，蛋白样品，样品缓冲液。

使用方法

一、比色皿测定法

1. 制备标曲液：先用去离子水将 BSA 标准品 2 mg/mL 稀释到 50 μg/mL，然后标记 1－6 个 1.5 mL 离心管，分别加入 200、175、150、100、50 和 0 μL 去离子水，然后再加入 0、25、50、100、150 和 200 μL 浓度为 50 μg/mL 的 BSA 溶液，震荡半分钟混匀。1-6 号管中 BSA 的浓度分别为 0、6.25、12.5、25.0、37.5 和 50.0 μg/μL。
2. 假设有 N 个待测样本，每个样本做一次重复，则再标记 N 个 1.5 mL 的离心管，分别加入 200 μL 待测样本。如果重复数不止一个，则标记的试管数需要相应的调整。
3. 新鲜配制本次实验所需的两种溶液。根据每个样本需要 600 μL 改良 Lowry 染色液的比例计算所需体积并按下列方法新鲜配制（以配制 10 mL 为例）：将 10 mL 溶液 A 和 0.1 mL 溶液 B 充分混匀即得改良 Lowry 染色液。根据每个样本需要 60 μL 福林酚工作液的比例计算所需该液的体积并按下列方法新鲜配制（以配制 10 mL 为例）：将 5 mL 福林酚和 5 mL 去离子水充分混匀即得福林酚工作液。
4. 每管中加 600 μL 上步制备的改良 Lowry 染色液，振荡混匀后室温反应 10-60 分钟。
5. 每管中加入 60 μL 福林酚工作液，振荡混匀后室温反应 45 分钟。
6. 用容量为 1 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（由于显色物质光谱比较广，也可以选择 660 nm），以下简称 A 值。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。
7. 以标曲样本的浓度为横轴，以其 A 值为纵轴，绘制标准曲线，得到线性回归方程式，然后代入待测样品的 A 值计算得到其对应的浓度。

二、96 微孔板测定法

8. 同上，只是反应用 96 微孔板设置，各成份用量减少 4-5 倍（反应体积从 1

	mL 减低到 250 - 200 μL），用酶标测试仪 750 nm 测定光吸收。 **附录：样品中干扰物质的去除** 9. 如果样品中有干扰 Lowry 法蛋白定量的其他物质，可用自备试剂按下法去除：用水将样品调到体积为 250 μL，加入 25 μL 的 0.15%去氧胆酸钠，混匀，室温放置 10 分钟。加入 25 μL 的 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 μL 水溶解蛋白沉淀后以用于改良 Lowry 法测定。
关联产品	总蛋白含量测定试剂盒（双缩脲法）