

改良型Lowry蛋白浓度测定试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P0401S	改良型Lowry蛋白浓度测定试剂盒	200次
P0401M	改良型Lowry蛋白浓度测定试剂盒	1000次

产品简介:

- 碧云天的改良型Lowry蛋白浓度测定试剂盒(Modified Lowry Protein Assay Kit)是根据目前世界上常用的蛋白浓度检测方法之一Lowry法研制而成,实现了蛋白浓度测定的简单、高稳定性、高灵敏度和高兼容性。
- 蛋白浓度测定有多种方法,如BCA法、Bradford法、Lowry法和双缩脲法等。Lowry法,又名Folin-Phenol法(福林酚法),操作简单,为蛋白质浓度测定最经典的高灵敏度方法之一。Lowry法检测原理与双缩脲法相同,但前者在后者的基础上加入了福林酚试剂,极大地增加了显色量,从而显著提高了检测灵敏度。
- Lowry法蛋白检测的基本原理如下。蛋白质分子含有与双缩脲相似的肽键,在碱性条件下,与铜离子反应,结合生成蛋白质-铜络合物。加入福林酚试剂后,试剂中的磷钼酸盐-磷钨酸盐被蛋白质-铜络合物所含的酪氨酸和色氨酸等还原,形成深蓝色磷钼蓝和磷钨蓝混合物,产生550-750nm之间提高吸光度的色原体,颜色深浅与蛋白质浓度成正比,故可用比色的方法测定蛋白质的含量。在不存在铜离子的情况下,颜色深浅主要取决于蛋白质中酪氨酸和色氨酸的含量,在较小程度上由半胱氨酸和组氨酸决定。铜离子对酪氨酸、色氨酸或组氨酸的颜色形成没有影响,但会减少半胱氨酸导致的颜色形成[1]。一般情况下,750nm或660nm处的吸光度用于定量较低的蛋白质浓度,而550nm处的吸光度用于定量更高的蛋白质浓度。
- 与碧云天的BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0009/P0010/P0011/P0012)相比,本试剂盒的兼容性略差一些,但灵敏度高,检测浓度下限达到约3.35 μ g/ml,最小检测蛋白量达到0.067 μ g,待测样品体积为1-20 μ l。本试剂盒无需37 $^{\circ}$ C孵育,显色速度更快,相同的样品孵育较短时间即可进行吸光度测定。本试剂盒显色稳定,2小时内吸光度几乎无变化,24小时下降8%以内。本试剂盒重复性好,同一批试剂在不同时间检测的平均变异系数(CV)<3%。
- 本试剂盒使用改良型Lowry检测方法,和普通的Lowry试剂盒相比,本试剂盒使用便捷,无需临用前配制工作液。本试剂盒检测速度极快,只需15分钟即可完成,大大缩短了检测时间。
- 本试剂盒从0到1.5mg/ml的标准曲线请参考图1。

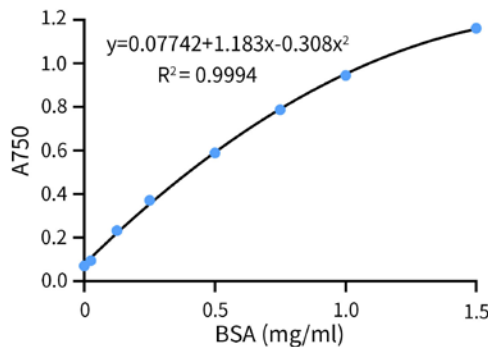


图1. 碧云天改良型Lowry蛋白浓度测定试剂盒(P0401) BSA标准曲线的效果图。图中拟合的标准曲线为2阶多项式。实际检测时,也可以根据样品的浓度范围,酌情仅选择使用例如0-0.5mg/ml范围内的标准曲线,此时标准曲线可以拟合为线性。图中数据仅供参考,实际的检测效果可能会略有不同。

- 本试剂盒测定蛋白浓度不受绝大部分样品中的化学物质的影响,但会受螯合剂和略高浓度的还原剂以及Triton X-100和Tween 20的影响,需确保EDTA低于1mM,EGTA低于16mM,无二硫苏糖醇(DTT)。还受略高浓度的去垢剂影响,需确保SDS低于8%,Triton X-100低于0.031%,Tween 20低于0.062%。含螯合剂和还原剂的样品推荐使用碧云天生产的Bradford蛋白浓度测定试剂盒(P0006)。含去垢剂的样品推荐使用碧云天生产的Bradford蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容型)(P0006C)或碧云天生产的BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0009, P0010, P0010S, P0011, P0012, P0012S)。本试剂盒对样品中各种物质的详细的兼容性如下表。

Substance	Compatible Concentration
Acetone	10%
Acetonitrile	10%
Ascorbic acid	1mM
DMSO	10%

DTT	Not compatible
EDTA	1mM
EGTA	16mM
Ethanol	10%
Glucose	100mM
Glycerol	5%
Glycine	100mM
HEPES, pH7.5	1mM
Hydrochloric acid	25mM
MES, pH6.1	125mM
SDS	8%
Sodium bicarbonate	100mM
Sodium chloride	1M
Sodium hydroxide	100mM
Sodium phosphate	100mM
Sucrose	7.5%
Tris	10mM
Triton X-100	0.031%
Tween-20	0.062%
Urea	3M

➤ 本试剂盒小包装可以检测200个样品，中包装可以检测1000个样品。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P0401S-1	Lowry Reagent A	40ml
P0401S-2	Lowry Reagent B	2ml
P0401S-3	Protein Standard (BSA)	20mg
P0401S-4	Protein Standard Preparation Solution	1ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0401M-1	Lowry Reagent A	200ml
P0401M-2	Lowry Reagent B	10ml
P0401M-3	Protein Standard (BSA)	30mg
P0401M-4	Protein Standard Preparation Solution	1.5ml
—	说明书	1份

保存条件：

4°C保存，一年有效。室温保存，至少两周内有效。Lowry Reagent B须避光保存。Protein Standard (BSA)配制成溶液后-20°C冻存。

注意事项：

- 需酶标仪一台，测定波长为650-750nm之间，750nm最佳。需96孔板。如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定，但测定时，需根据比色皿的最小检测体积，适当加大Lowry Reagent A和Lowry Reagent B的用量使不小于最小检测体积，样品和标准品的用量可相应按比例放大也可不变。使用分光光度计测定蛋白浓度时，每个试剂盒可以测定的样品数量可能会显著减少。
- 如发现样品稀释液或裂解液本身就有较高背景，请尝试使用碧云天生产的Bradford蛋白浓度测定试剂盒(P0006)、Bradford蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容型)(P0006C)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0009, P0010, P0010S, P0011, P0012, P0012S)、BeyoBCA蛋白浓度快速测定试剂盒(P0398)或BeyoBCA蛋白浓度测定试剂盒(高灵敏度)(P0399)。
- 如果Lowry Reagent B开封过久，由黄色变为绿色，可加入几滴液溴，稍加煮沸，试剂恢复至原色即可使用。
- Lowry Reagent B有腐蚀性，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或腐蚀其它物品。
- 所有试剂须平衡至室温后再使用，使用完毕后各试剂应立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 蛋白标准品的准备。

- 取适量Protein Standard Preparation Solution加入到一管Protein Standard (BSA)中，充分溶解后配制成25mg/ml BSA。例如20mg或30mg Protein Standard (BSA)中分别加入0.8ml或1.2ml Protein Standard Preparation Solution。配制后可立即使用，也可以-20°C长期保存。
- 取适量25mg/ml BSA，稀释至终浓度为1.5mg/ml。例如取60 μ l 25mg/ml BSA，加入940 μ l稀释液即可配制成1.5mg/ml BSA。蛋白样品在什么溶液中，标准品也宜用什么溶液稀释。但是为了简便起见，也可以用0.9% NaCl或PBS稀释标准品。稀释后的1.5mg/ml BSA可以-20°C长期保存。
- 按照下表配制0、0.025、0.125、0.25、0.5、0.75、1、1.5mg/ml蛋白标准。每次稀释时注意充分混匀。

Vial Number	Volume of Dilution Buffer	Volume of Protein Standard	Final Concentration
A	0 μ l	250 μ l BSA (1.5mg/ml)	1.5mg/ml
B	75 μ l	150 μ l of Vial A	1mg/ml
C	50 μ l	150 μ l of Vial B	0.75mg/ml
D	50 μ l	100 μ l of Vial C	0.5mg/ml
E	75 μ l	75 μ l of Vial D	0.25mg/ml
F	75 μ l	75 μ l of Vial E	0.125mg/ml
G	80 μ l	20 μ l of Vial F	0.025mg/ml
H	75 μ l	0 μ l	0mg/ml

2. 蛋白浓度检测。

- 取20 μ l不同浓度蛋白标准加入到96孔板的蛋白标准孔中。96孔板推荐使用碧云天的BeyoGold™ 96孔细胞培养板(FCP962)。
- 加入适当体积样品到96孔板的样品孔中。如果样品不足20 μ l，加稀释液补足到20 μ l。样品原体积记录为V μ l。
- 各孔加入200 μ l Lowry Reagent A，立即用移液器轻轻吹打混匀，注意避免产生气泡。
- 各孔再加入10 μ l Lowry Reagent B，立即用移液器轻轻吹打混匀，注意避免产生气泡。室温放置15分钟。
注：不能预混Lowry Reagent A和Lowry Reagent B。可以孵育15分钟测定吸光度，也可以在2小时内测定，2小时内检测数据无显著变化。

- 用酶标仪测定A₇₅₀，或650-750nm之间的波长的吸光度。
- 根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度B (mg/ml)。如果加入样品为20 μ l，则样品孔的蛋白浓度B即为样品浓度；如果加入样品不足20 μ l，原体积记录为V μ l，则样品浓度C (mg/ml)=B \times 20/V。

注1：如果样品的蛋白浓度在0-5mg/ml范围内，或者适当减少样品的用量后再加入的稀释后的20 μ l样品的蛋白浓度在0-5mg/ml范围内，可以仅检测0-5mg/ml范围内的标准曲线，此时标准曲线可以拟合成良好的线性。

注2：蛋白浓度较高时，标准曲线不是严格的直线形式。建议拟合二阶多项式标准曲线(也称二次多项式标准曲线)或四参数标准曲线，或者选用其它比较合适的曲线进行拟合，将提供比直线线性拟合更准确的结果。二阶多项式曲线拟合的方程为 $y=ax^2+bx+c$ ，四参数拟合的方程为 $y=(A-D)/[1+(x/C)^p]+D$ ，可以使用Excel、ELISA Calc、GraphPad Prism、Origin或其它比较合适的软件进行拟合。对于Excel，绘制标准曲线后，点击选中图中数据，单击右键选择添加趋势线，然后选择多项式、2阶并选择显示公式即可。对于ELISA Calc，选择回归/拟合模型(M)中的logistic曲线拟合2(四参数)或者二次曲线回归进行拟合。对于GraphPad Prism、Origin或其它软件，相对应的选择非线性拟合中的四参数或二次曲线进行拟合；大部分可进行曲线拟合的软件通常可在拟合完成后同时根据输入的已知变量对未知变量进行求解，不需要自行解高次方程(需根据软件使用说明进行确认)。例如，未知样品孔的吸光度值通常作为已知数y代入，软件会根据拟合方程求解出x，作为对应样品孔的浓度。

- 计算示例(以二阶多项式标准曲线为例)：

样品原体积V=14 μ l，加入样品孔中后再加6 μ l稀释液补足至20 μ l。参考以上步骤进行检测，用标准品吸光度值对标准品浓度进行作图并拟合标准曲线，得到标准曲线公式。例如，图1中的标准曲线拟合的公式为 $y=-0.308x^2+1.183x+0.07742$ 。如果检测的样品孔吸光度为0.845，作为y代入图1的标准曲线公式，计算出的x即样品孔的蛋白浓度B (mg/ml)=0.83mg/ml(这一步通常可以由软件计算得出)，则样品中的蛋白浓度为C (mg/ml)=0.83 \times 20/14=1.19mg/ml。

参考文献：

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. J Biol Chem. 1951. 193(1):265-75.

常见问题：

- 测定标准曲线时发现随着标准品浓度的增加吸光度或颜色没有明显变化。

可能的原因是样品中含有严重干扰Lowry法测定蛋白浓度的物质，可稀释样品或对样品进行适当纯化，详细的Lowry法的兼容性列表请参考产品简介部分各种物质的兼容性表格。

- 是否每次测定时都需要做标准曲线？

建议每次测定时都做标准曲线。因为Lowry法测定时颜色在2小时后会随着时间的延长不断变浅，所以除非精确控制显色反应的时间，否则如需精确测定宜每次都做标准曲线。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P0006	Bradford蛋白浓度测定试剂盒	1000次
P0006C	Bradford蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容型)	800次
P0009	BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)	5000次
P0010	BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)	500次
P0010S	BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)	200次
P0011	BCA蛋白浓度测定试剂盒	5000次
P0012	BCA蛋白浓度测定试剂盒	500次
P0012S	BCA蛋白浓度测定试剂盒	200次
P0398	BeyoBCA蛋白浓度快速测定试剂盒	200次/1000次 /5000次
P0399	BeyoBCA蛋白浓度测定试剂盒(高灵敏度)	200次/1000次 /5000次
P0401	改良型Lowry蛋白浓度测定试剂盒	200次/1000次
ST2070	福林酚试剂(1N)	100ml/500ml
ST2071	福林酚试剂(2N)	100ml/500ml

Version 2024.12.10