



## 使用LAMBDA UV/Vis 分光光度计测定 总蛋白: Lowry法

### 介绍

Lowry和Biuret法是蛋白定量的标准方法。尽管后者的灵敏度更高,并在探索性工作中使用,但由于其(1)组合试剂的稳定性差,(2)颜色重复性差(低蛋白浓度时尤其明显),且(3)蛋白浓度和颜色响

应的关系非线性,制约了其应用。Ohnishi和Barr<sup>1</sup>为Lowry过程改进并简化了Biuret组合溶液,同时提高了其稳定性。本应用报告描述了改进的Lowry过程,进行蛋白分析。

### 原理

Lowry方法中出现的蓝色是由于(1)  $\text{Cu}^{2+}$ 和肽键的反应,和(2)螯合剂(酚试剂, Folin试剂, Lowry试剂, 或者Folin-Ciocalteu试剂)的还原,这包括络氨酸和色氨酸中的磷钼酸在蛋白上的沉淀。

试剂和仪器

- 1、蛋白标准物 (BSA) 1mg/ml
- 2、Biuret试剂: 硫酸铜75mmol/L, 氯化钠94mmol/L, 酒石酸钠, 碘, 碳酸盐
- 3、Folin-Ciocalteu’s酚试剂: 2.0N
- 4、未知蛋白
- 5、氯化钠溶液 (0.85%)
- 6、LAMBDA 465 UV/Vis分光光度计
- 7、UV Lab软件
- 8、比色皿 (10mm光程)

实验过程

- 1、准备蛋白溶液: 依照表1, 在6个试管中混合蛋白和盐溶液。
- 2、加入2.2ml Biuret试剂到标准溶液和未知样品中, 混匀并静置10分钟。
- 3、在每个试管中加入0.1ml Folin-Ciocalteu’s酚试剂。在加入后马上彻底混合均匀。
- 4、在软件的定量模式的方法文件中, 选择Lowry方法。
- 5、在定量标准模式, 测量标准品2到5相对标准品1在725nm的吸光度。
- 6、在定量样品模式, 测量未知样品 (样品6)。
- 7、制作标准品吸光度相对浓度的曲线。
- 8、计算未知样品的浓度。

表1、蛋白标准品的浓度

Reagent	Test Tube No.					
	1	2	3	4	5	6
1 mg/ml Standard Protein (ml)	-	0.05	0.1	0.15	0.2	-
Unknown Protein (ml)	-	-	-	-	-	0.2
Saline Solution (ml)	0.2	0.15	0.1	0.5	-	-
Concentration (mg/dl)	0	25	50	75	100	-

仪器参数

LAMBDA 465的仪器参数如下设置:

实验设置

数据类型: 吸光度

采样: 单池

模式: 快速 (光谱数: 1/扫描数: 50/积分数: 1/增益数: 1)

实验方法

定量方法: Lowry方法

使用波长: 725nm

曲线维度: 2

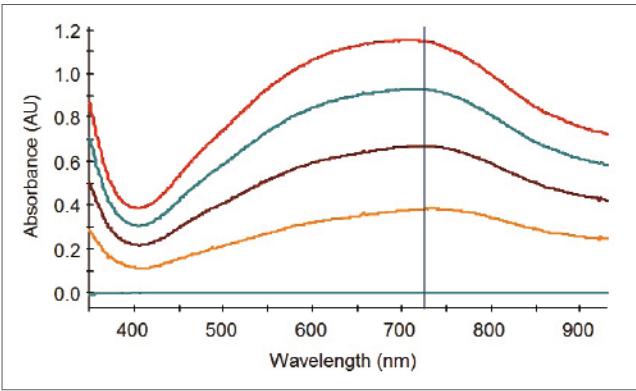


图1、Lowry方法的谱图

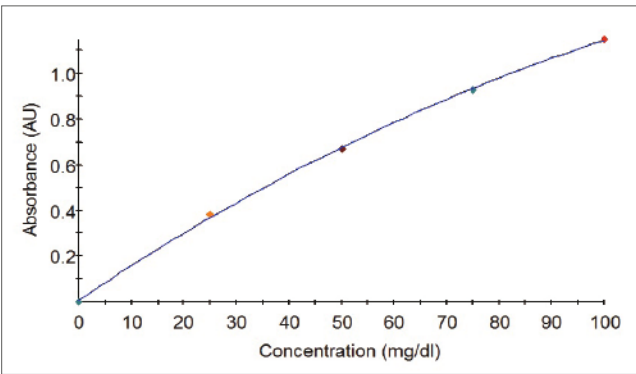


图2、Lowry方法的校准曲线

结果

1、校准曲线

图1显示了蛋白标准溶液的光谱。它们在700-750nm范围有强吸收, 测量725nm吸光度值。图2显示了得到的二阶 (二次) 校准曲线。曲线的相关系数R<sup>2</sup>是0.9995。

2、未知蛋白样品

未知样品的浓度计算结果为74.23mg/ml, 见表2。

表2、未知样品的计算浓度

Name	Concentration (mg/dl)	Au (725.00 nm)
Unknown	74.23	0.9288

## 结论

使用LAMBDA 465 UV/Vis分光光度计和UV Lab软件, 进行了蛋白的定量分析。光谱快速采集, 并且灵敏度很高。UV Lab软件的定量模式有效的进行了数据处理和定量分析。

## 参考文献

1. Ohnishi ST, Barr JK : A simplified method of quantifying proteins using the Biuret and phenol reagent. Anal Biochem 86: 193, 1978

珀金埃尔默企业管理（上海）有限公司  
地址：上海 张江高科技园区 张衡路1670号  
邮编：201203  
电话：021-60645888  
传真：021-60645999  
[www.perkinelmer.com.cn](http://www.perkinelmer.com.cn)



要获取全球办事处的完整列表, 请访问[http:// www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs](http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs)

版权所有 ©2014, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自持有者或所有者的财产。