

Angewandte Chemie (ANC 5)
Praktikum Biochemie
Prof. Dr. Schmelter / Dipl. Ing. Löscher

Protokoll

Versuch: C (Proteinbestimmung mit LOWRY-Methode)
Datum: 07.12.2020

1. Aufgabenstellung

Es soll mit Bovine Serum Albumin (BSA) eine Kalibrierreihe für die Proteingehaltsbestimmung erstellt werden. Anschließend sollen mithilfe dieser Kalibrierreihe die Proteinkonzentrationen in zwei unbekannten Proben bestimmt werden. Der Versuch sowie das Protokoll werden nach den Vorgaben des TH-internen Praktikums-Skripts (Skript Biochemie Praktikum 2020) bearbeitet. Es wird mit einem diskreten Multiwellenlängen-Photometer (Eigenbau) eine Referenzmessung durchgeführt. ⁽¹⁾

2. Geräte und Materialien

Geräte: Bechergläser; Pipetten; Mikrotubes (13 x 1,5 ml und 1 x 2,0 ml);
Eppendorf-Photometer; 14 x Halbmikroküvetten (Kunststoff);
Diskretes Multiwellenlängen-Photometer (Eigenbau)

BSA–Standard (Std): (Rinderserum Albumin, Fraktion V): 1 mg/ml in Deionat

Proben (P): zwei Proteinproben unbekannter Konzentration
(BSA: P1 oder P2 und Chymotrypsinogen P3 oder P4)

Farbstofflösung:

Stammlösung A: 2 % Lösung von Na_2CO_3 + K-Na-Tartrat in 0.1N NaOH

Stammlösung B: 0.5 % Lösung von $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Folin (Ciocalteu) Reagenz:

Merck 1090001

(enthält Lithiumsulfat, Wolframsäure-Di-Natriumsalz, Phosphorsäure, Salzsäure)

3. Ergebnisse

Proben: P2 = BAS
P3 = Chymotrypsinogen

Wellenlänge (Eppendorf-Photometer): 750 nm

Tabelle1: Kalibriergerade

C (mg/ml)	Extinktion
0	0
0,1	0,051
0,2	0,107
0,4	0,189
0,6	0,292
0,8	0,477
1,0	(1,102)*

Tabelle2: Ergebnisse der Probenmessungen

Probe:	Verdünnung:	Extinktion:	Konzentration: [mg/ml]
P2 M1	1:100	0,355	64,9
P2 M2	1:100	0,326	59,8
P2 M3	1:100	0,355	64,9
Mittelwert (P2):		0,345	63,2
P3 M1	1:25	0,193	9,06
P3 M2 *	1:25	-	-
P3 M3	1:25	0,184	8,66
Mittelwert (P3):		0,189	8,86

***Anmerkung:**

Der Extinktionswert für 1,0 mg/ml wurde als Ausreißer eingestuft und in der Kalibrierung nicht berücksichtigt. Für die Probe P3 M2 wurde keine Messung durchgeführt, da eine vorangegangene mangelhafte Durchmischung eine photometrische Auswertung nicht möglich machte.

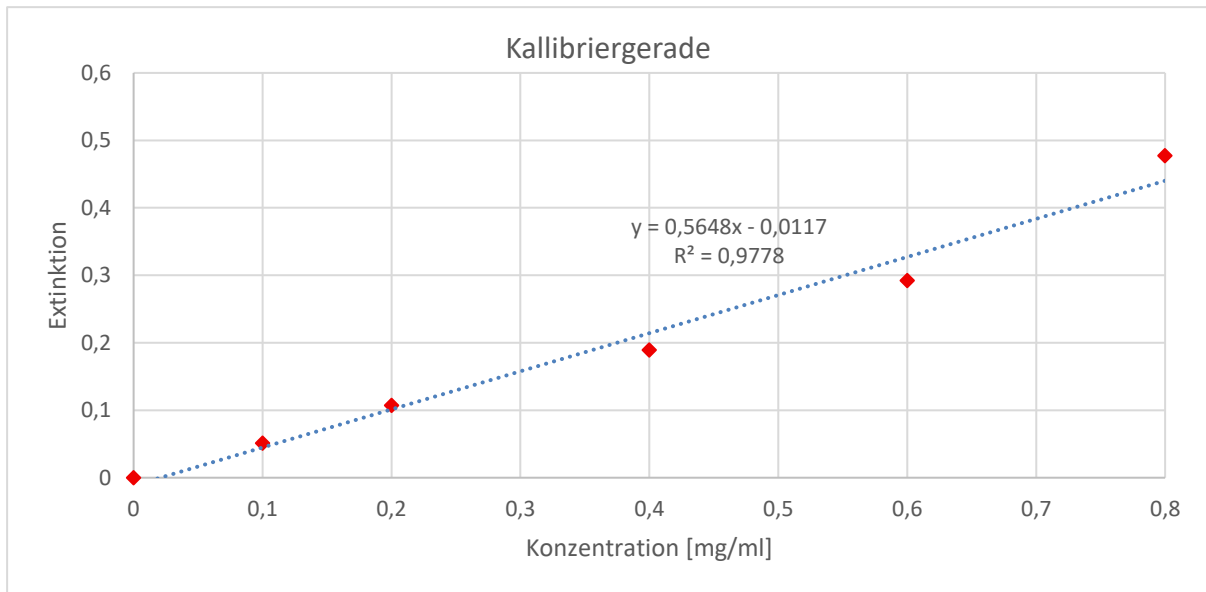


Abbildung1: Kalibriergerade für die Konzentrationsbestimmung (Eppendorf-Photometer)

4. Auswertung der Ergebnisse

Aus der Gradengleichung lässt sich der molare Extinktionskoeffizient des Photometers bei 750 nm ablesen, dieser entspricht der Steigung und beträgt 0,5648.

Durch umstellen der Geradengleichung lassen sich die Konzentrationen der Proben berechnen, x entspricht hierbei der Konzentration und y der Extinktion.

Da die Proben verdünnt wurden ist für das finale Ergebnis der Verdünnungsfaktor [f] mit ein zu berechnen.

$$x = \frac{y + 0,0117}{0,5648} * f$$

Beispielrechnung:

$$C_{P2 M1} = \frac{0,355 + 0,0117}{0,5648} * 100 = 64,9 \frac{mg}{ml}$$

Die weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 2 hinterlegt.

Die ermittelte durchschnittliche Konzentration der Proben ist:

P2: 63,2 mg/ml [BSA]

P3: 8,86 mg/ml [Chymotrypsinogen]

Auswertung mit diskreten Multiwellenlängen-Photometer (Vergleichsmessung)

Mit einem selbstentwickelten Photometer wurden die erhaltenen farbigen Lösungen der Messreihe ein zweites Mal vermessen. Das Photometer misst standardmäßig jede Probe dreimal, bei 7 verschiedenen Wellenlängen. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Messungen wurden dabei auf einer SD-Karte gespeichert und in Excel ausgewertet. Es wurden nur die erhaltenden Daten aus dem Kanal 6 (Rot – 625 nm) des Photometers zur Auswertung genutzt. Die Proben P2 und P3 wurden nur einmal vermessen. Die Bestimmung der Konzentrationen der Probe erfolge analog zur regulären Messung.

Tabelle3: Kalibriergerade (Prototyp)

Konzentration [mg/ml]	Extinktion [625 nm]
0	0
0,1	0,053
0,2	0,096
0,4	0,177
0,6	0,291
0,8	0,468
1	1,052

Tabelle4: Probenmessungen (Prototyp)

Probe:	Extinktion [625 nm]	Konzentration [mg/ml]
P2 M1	0,351	65,5
P3 M1	0,189	9,10

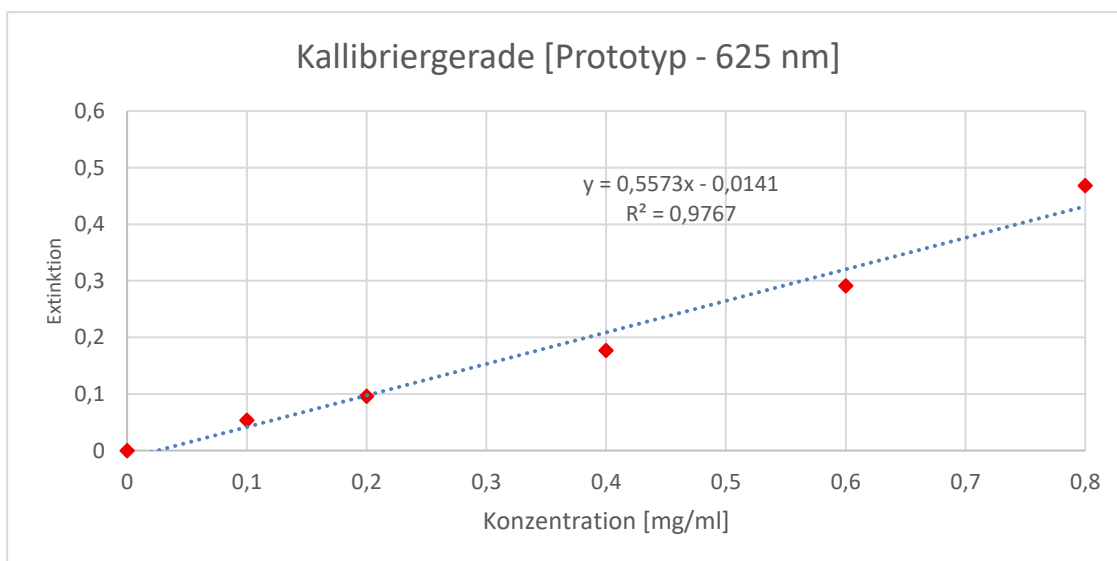


Abbildung2: Kalibriergerade für die Konzentrationsbestimmung (Prototyp-Messung bei ca. 625 nm)

Der Messwert für die Kalibriergerade bei 1 mg/ml wurde analog zu dem Hauptversuch verworfen. Die ermittelte Konzentration von P2 liegt mit 65,5 mg/ml nahe am durchschnittlichen Wert der Messung mit dem Eppendorf-Photometer (63,2 mg/ml). Die Konzentration von P3 liegt mit 9,10 mg/ml ebenfalls nahe am durchschnittlichen Wert der Eppendorf-Photometer-Messung (8,86 mg/ml).

5. Diskussion

Die Lowry-Methode ist mit der Biuret-Methode vergleichbar, weist jedoch aufgrund einer zusätzlichen Reaktionsstufe eine deutlich höhere Empfindlichkeit auf. Die Nachweisgrenze der Lowry-Methode liegt bereits im Bereich von 0,1–1 µg/ml. ⁽¹⁾

Die bei der Lowry-Methode entstehende Färbung besitzt jedoch keine langfristige Stabilität. Darüber hinaus ist die Methode anfällig gegenüber Störeinflüssen, beispielsweise durch das Vorhandensein von Reduktionsmitteln. Im Vergleich zur Bradford-Methode ist der zeitliche Aufwand erhöht. Zudem führt der Bedarf an zusätzlichen Reaktionsgefäßen zu einem erhöhten Abfallaufkommen, was im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung nachhaltiger analytischer Methoden kritisch zu bewerten ist. Die Auswertung der Messergebnisse gestaltet sich hingegen unkompliziert, da für die Kalibrierung lediglich eine lineare Regressionsgleichung benötigt wird. ⁽¹⁾

Potenzielle Fehlerquellen ergeben sich insbesondere durch ungenaues Pipettieren sowie durch Verunreinigungen der Laborgefäße und Küvetten. Aus diesem Grund ist vor jeder Messung die Sauberkeit der Laborgefäße und Küvetten sorgfältig zu überprüfen. Beim Pipettieren ist mit besonderer Sorgfalt vorzugehen.

Das diskrete Multiwellenlängen-Photometer zeigte im Vergleich zum Eppendorf-Photometer eine vergleichbare Messleistung. Der Vergleich der für die Kalibriergeraden ermittelten Messwerte weist sehr ähnliche Verläufe sowie vergleichbare Abweichungen auf (vgl. Abbildung 1 und 2). Die nahezu identischen Bestimmtheitsmaße von 0,9778 für das Eppendorf-Photometer und 0,9767 für das Eigenbau-Photometer deuten darauf hin, dass die beobachteten Messabweichungen überwiegend auf Unsicherheiten in der Durchführung der Lowry-Methode zurückzuführen sind und nicht primär auf Messungenauigkeiten des Eigenbau-Photometers.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das diskrete Multiwellenlängen-Photometer für einfache photometrische Messungen geeignet ist. Eine weiterführende Validierung könnte zusätzliche Aussagen über die Genauigkeit, Präzision, Grenzen sowie die langfristige Zuverlässigkeit des Systems ermöglichen.

6. Quellen

[1] Skript Biochemie Praktikum 2020, Stand 6.10.2020 (Lernraum TH-Lübeck, Abgerufen 07.11.2020)