

Protein

Prinzip

Der Proteingehalt von Zellen wird nach einer abgeänderten Methode nach dem Prinzip von Lowry (1951) bestimmt. Zwei Schritte führen zum blauen Endprodukt des Tests: die Reaktion der Proteine mit Kupfer in alkalischer Lösung sowie die Reduktion des Folinreagens. Das zugegebene Natriumbicarbonat wirkt dabei als Reaktionspuffer.

Anwendungsbereich

Daten zur Proteineichkurve

Element	Protein
Eichgerade	$y = -1.8599 + 76.101c \quad R^2 = 0.994$
Gültigkeitsbereich % für Konzentrationen c [mg/l]	3-60
LQDC (mg/l)	2
Rel. Standardfehler <5% für Konzentrationen c [mg/l]	7-60
Rel. Standardfehler >5% für Konzentrationen c [mg/l]	3-7

LQDC lowest quantitatively determinable concentration

Reagenzien

• Reagens 1:

1% CuSO₄ · 5 H₂O

1% KNa-Tartrat · 4 H₂O

2% Na₂CO₃ in 0.1 N NaOH

Die 3 Lösungen im Verhältnis 1:1:98 (v:v:v) mischen.

• Reagens 2:

Folin-Ciocalteu-Reagens mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1 verdünnen.

• 10 mM Phosphatpuffer

174.2 mg K₂HPO₄ in 100 ml destilliertem Wasser

136.1 mg KH₂PO₄ in 100 ml destilliertem Wasser

Gleiche Volumina der beiden Lösungen werden gemischt.

• Physiologische Kochsalzlösung (150 mM NaCl)

877 mg NaCl in 100 ml 10 mM Phosphatpuffer lösen und mit 2 N NaOH auf 7.2 ≤ pH ≤ 7.5 einstellen.

• Protein-Standard

Rinderserumalbumin (BSA): Herstellung der BSA-Stammlösung: 10 mg Rinderserumalbumin werden in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Vorgehen

- **Probenkonservierung:** 25 ml Seewasserprobe oder 1 ml Laborkultur lyophilisieren.
- Zugabe von 2.1 ml Reagens 1, mischen, während 10 Min. bei 60°C im Wasserbad lysieren, mischen, abkühlen lassen.
- Zugabe von 0.2 ml Reagens 2, mischen.
- 1 Stunde im Dunkeln stehen lassen, mischen.
- Absorption in 1 cm-Küvette bei 750 nm gegen Blindwert messen.

Hinweise

In physiologischer Kochsalzlösung ist BSA stabil. Beim Auftauen von gefrorenen Standards muss darauf geachtet werden, dass die Proteine beim Schütteln der Proben nicht denaturiert werden (Schaumbildung).

Die Methode nach Lowry (1951) erwies sich als zuverlässig.

Hartree (1972) verbesserte die Linearität des Lowry-Tests durch eine leicht veränderte Zusammensetzung der Reagenzien sowie durch Messung der Extinktion bei 650 nm. Für die Bestimmung des Proteingehalts in *Chromatiaceae* wird bei dieser Wellenlänge eine Ethanolextraktion intrazellulären Schwefels erforderlich (Kämpf 1984). Bei der Proteinbestimmung in Seewasserproben war die Ethanolextraktion schwierig, da

selbst in 25 ml Volumina nur sehr wenig Biomasse vorhanden war. Wie sich aus dem Vergleich zwischen Aliquoten derselben Proben herausstellte, ergab das Abzentrifugieren nach der Extraktion schlecht reproduzierbare Pellets. Die Messung der Extinktion bei 750 nm (nahe des Absorptionsmaximums des blauen Farbstoffs) wird durch Schwefel nicht gestört und ergibt ausserdem 30 % höhere Werte. Dieser Vorteil des Lowry-Tests wird in der vorliegenden Methode mit den konzentrierteren Reagenzien von Hartree gekoppelt. (Neben den Versionen der Proteinbestimmung nach Lowry wurde ein BioRad-Test geprüft (BioRad 1979), der auf dem Prinzip der Coomassieblau-Färbung nach Bradford (1976) beruht, aber laut Känel und Mez (1992) nicht reproduzierbare Resultate lieferte (Absorption schwankt stark). Ein zusätzliches Problem stellte der Aufschluss der Zellen dar, da verschiedene Detergenzien den Bio Rad-Test stören).

Literatur

- BioRad Protein Determination, Laboratory Manual, 1979
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Hartree EF, 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48:422-427
- Kämpf C, 1984. *Untersuchungen zur Chemotrophie bei phototrophen roten Schwefelbakterien*. Dissertation, Universität Konstanz
- Känel B, Mez K. 1992. *Vielfalt und Dynamik mikrobieller Stoffwechselaktivitäten in der Redoxtransitionszone des Lago di Cadagno*. Diplomarbeit Universität Zürich
- Lowry OH, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275
- Merrick JM, 1978. Metabolism of reserve materials. In *The Photosynthetic Bacteria* ed. RK Clayton. et al. pp. 199-215, Plenum Press