

# GEBRAUCHSANLEITUNG

---

## Lowry Assay Kit

Kit für die Proteinkonzentrationsbestimmung

(Kat.-Nr. 39236)



SERVA Electrophoresis GmbH ● Carl-Benz-Str. 7 ● D-69115 Heidelberg  
Phone +49-6221-138400, Fax +49-6221-1384010  
e-mail: [info@serva.de](mailto:info@serva.de) ● <http://www.serva.de>

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Lowry Assay Kit</b>	<b>2</b>
1.1.	Allgemeine Hinweise	2
1.2.	Kit Komponenten	2
1.3.	Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	2
1.4.	Lagerbedingungen	2
<b>2.</b>	<b>Durchführung der Proteinbestimmung nach Lowry</b>	<b>3</b>
2.1.	Ansetzen der Lösungen und Standards	3
2.2.	Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen	3
2.3.	Durchführung der Proteinbestimmung	3
2.4.	Berechnung der Proteinkonzentration	4
<b>3.</b>	<b>Literatur</b>	<b>6</b>

# 1. Lowry Assay Kit

## 1.1. Allgemeine Hinweise

Der *ready-to-use* SERVA Lowry Assay Kit basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry.

Die Proteinquantifizierung nach Lowry beruht auf der Biuret- und der Folin-Ciocalteu Reaktion. Der erste Reaktionsschritt ist die Biuret-Reaktion. Hierbei bilden sich blau-violette Komplexe zwischen den Peptidbindungen des Proteins und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung. Im zweiten Schritt wird Kupfer(II) durch Oxidation aromatischer Aminosäuren zu Kupfer(I) reduziert. Das gebildete Kupfer (I) reduziert nun das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau. Die resultierend intensive Blaufärbung wird hauptsächlich durch den Tyrosin- und Tryptophan-Gehalt im Protein bestimmt und weniger von Cysteinen oder anderen Aminosäuren.

## 1.2. Kit Komponenten

Komponente	250 Assays
Protein Standard, BSA	3 x 5 mg
Solution A	2,5 ml
Solution B	250 ml
Solution C	30 ml

## 1.3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Vortex-Mixer
- Spektralphotometer für Absorptionsmessung bei 660 nm
- Kunststoffküvetten

## 1.4. Lagerbedingungen

Der Lowry Assay Kit ist bei der empfohlenen Lagertemperatur von +2 - +8 °C mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

## 2. Durchführung der Proteinbestimmung nach Lowry

### 2.1. Ansetzen der Lösungen und Standards

#### 2.1.1. Proteinstandard

Das mitgelieferte BSA (5 mg/Vial) wird durch Zugabe von 1 ml dest. H<sub>2</sub>O rekonstituiert, so dass die BSA-Konzentration 5 mg/ml beträgt. Die so erhaltene **BSA-Stocklösung** kann bei 4 °C ca. 2 Wochen gelagert werden.

Unmittelbar vor Gebrauch werden 200 µl **BSA-Stocklösung** mit 800 µl dest. H<sub>2</sub>O verdünnt, so dass die **BSA-Arbeitslösung** 1 mg/ml BSA enthält.

#### 2.1.2. Komplexbildner

Um das Reagenz zur Komplexbildung herzustellen, mischen Sie unmittelbar vor Gebrauch 1 Volumenteil Solution A mit 100 Volumenteilen der Solution B.

#### 2.1.3. Solution C

Das Solution C kann direkt in den Assay eingesetzt werden.

### 2.2. Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen

BSA [µg/mL]	V(BSA-Arbeitslösung) [µl]	V(Diluent) [µl]
0	0	1000
10	10	990
50	50	950
100	100	900
250	250	750
500	500	500

### 2.3. Durchführung der Proteinbestimmung

Bitte beachten Sie, dass folgende Substanzen zu Störungen des Assays führen und deshalb in der Probe vermieden werden sollten.

- Komponenten mit Aminogruppen
- Hochmolare Puffer mit niedrigem pH oder starke Säuren  
Der pH-Wert der Reaktionsmischung sollte zwischen 10 und 10,5 liegen.
- Detergenzien
- > 3 % Ammoniumsulfat
- > 0,2 M Natriumphosphat
- Cäsiumbicarbonat

### Protokoll:

- Jeder Ansatz sollte als Dreifachbestimmung durchgeführt werden.
- Für jede Testreihe sollte separat eine Kalibrationskurve erstellt werden.
- Vorlegen der BSA-Arbeitslösung, der Proben und des dest. H<sub>2</sub>O wie im Pipettierschema angegeben und Einstellung des Volumens auf 100  $\mu$ l
- Zugabe von 1 ml Komplexbildner, mischen und 10 Minuten bei RT inkubieren
- Zugabe von 100  $\mu$ l Lösung III, mischen mit Vortexer und anschließend 20 – 30 Minuten bei RT inkubieren
- Absorptionsmessung bei 660 nm

### Schema zur Durchführung der Proteinbestimmung:

Vorlegen von **100  $\mu$ l** dest. H<sub>2</sub>O bzw. Puffer für die Blindwerte, Referenzlösungen und Proteinproben in Reaktionsgefäße



Zugabe von **1 ml Komplexbildner**, mischen durch Invertieren und 10 Min. Inkubation bei RT



Zugabe von **100  $\mu$ l Solution C**



auf Vortex mischen



**20 - 30 Min.** bei RT inkubieren



Überführen der Lösung in Küvette  
Messung der Absorption bei 660 nm ( $A_{660\text{nm}}$ )

## 2.4. Berechnung der Proteinkonzentration

Erstellen Sie eine Tabelle mit den im Test erhaltenen Absorptionswerten. Aus den erhaltenen Werten für das Referenzprotein erstellen Sie eine Kalibrierungskurve indem Sie auf der y-Achse die gemessenen Absorptionswerte und auf der x-Achse die Menge Standardprotein/Reaktionsgefäß auftragen.

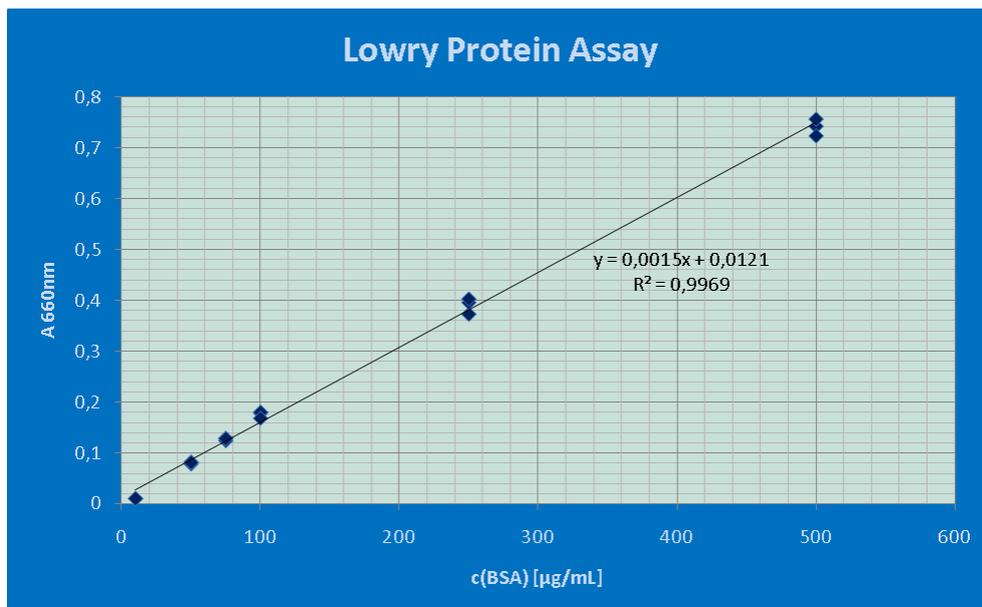
**Tabelle 1** zeigt beispielhaft Messwerte für die Erstellung der BSA-Kalibrierungsgeraden. **Graph 1** zeigt die daraus erstellte BSA-Kalibrierungsgerade.

c(BSA) [µg/mL]	A <sub>660nm</sub>
0	0
0	0
0	0
10	0,01
10	0,01
10	0,01
50	0,078
50	0,082
50	0,081
75	0,129
75	0,124
75	0,128
100	0,178
100	0,18
100	0,168
250	0,373
250	0,396
250	0,403
500	0,743
500	0,757
500	0,724

**Hinweis:**

Beachten Sie bitte, dass diese Werte nicht als Ersatz für die Erstellung einer Kalibrierungsgeraden dienen können, da die Absorptionswerte der BSA-Referenzlösungen in jeder Testreihe von den hier aufgeführten Werten abweichen können.

**Tabelle 1:** Beispieltabelle für Messwerte der BSA-Referenzlösungen



**Graph 1:** BSA-Kalibrierungsgerade aus den Messwerten von Tabelle 1. Die Standardgerade wurde mittels linearer Regressionsanalyse mit der Gleichung  $y = 0,0015x + 0,0121$  berechnet. Der Regressionskoeffizient beträgt  $R^2 = 0,9969$ .

Mit Hilfe einer solchen Kalibrierungskurve kann anschließend wie folgt die Proteinkonzentration der unbekannt Probe bestimmt werden:

- Anhand der Absorptionswerte für eine unbekannt Probe kann die Proteinmenge/Reaktionsgefäß mit Hilfe der Kalibrierungskurve ermittelt werden.
- Zur Berechnung der Proteinkonzentration wird die graphisch ermittelte Proteinmenge (X in µg) durch das eingesetzte Probenvolumen (V in µl) dividiert.

$$X [\mu\text{g}] / V [\mu\text{l}] = C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = C [\text{mg/ml}]$$

- Wenn eine Vorverdünnung der Probe durchgeführt wurde, muss der Verdünnungsfaktor (VF) berücksichtigt werden.

$$(X [\mu\text{g}] / V [\mu\text{l}]) * VF = C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = C [\text{mg/ml}]$$

### 3. Literatur

Lowry O. H., et al. (1951) J. Biol. Chem. **193**, 265 – 275.