

Stephanie [REDACTED]
BTA-UH 1
Gruppe A
Partner: Ljiljana [REDACTED]

Versuch vom 25.06.2002

„Proteinbestimmung“

Biochemisches Praktikum

Berufskolleg Kartäuserwall
Kartäuserwall 30, Köln

bei: Fr. Ulrike Schlicher

Proteinbestimmung nach Bradford

Theorie / Prinzip des Versuchs

-/-

Material

Geräte: Mikropipette 10 - 100 µl von Eppendorf
Mikropipette 100 -1000 µl von Eppendorf
Spitzen für Mikropipette
Messkolben 250 ml von Schott
Präzisionswaage 1500 von Faust
3 kleine Bechergläser 20 ml aprox. von Schott
Spectrophotometer mit PC-Software von Pharmacia Biotech
Kunststoffküvetten
Reck für Küvetten
Aqua dest.

Untersuchungsmaterial: Kartoffelextrakt

Chemikalien: NaCl, reinst, M=58,44 g/mol, von Merck
BSA, Rinderserum Albumin
Coomassie brilliant blue G-250, M=854,04 g/mol von Sigma
Ethanol 96%, reinst, M=46,07 g/mol, R11, S7-16 von Merck
Phosphorsäure 85%, p.A., R34, S 26-36/37/39-45 von Merck

Durchführung

- Ansetzen einer 0,15-M NaCl-Lösung (2,1915 g NaCl auf 250 ml auffüllen)
- Ansetzen der Stammlösung aus 10 mg BSA, im Messkolben mit 0,15-M NaCl auf 10 ml auffüllen
- Erstellen einer Verdünnungsreihe:

1000 µl Stammlösung + 0 µl NaCl
900 µl Stammlösung + 100µl NaCl
800µl Stammlösung + 200µl NaCl
u.s.w.
- Probenreihen ansetzen (doppelt): 20 µl Probe + 1000 µl Coomassie
- 5 Minuten warten
- Extinktion bei 595 nm messen
- erhaltene Daten mitteln
- in einer Eichkurve Extinktion gegen Konzentration auftragen
- Eichgerade erstellen
- Ansetzen des Kartoffelextraktes: 10g Kartoffel + 25 ml 0,15-M NaCl
- Verdünnung des Extraktes im Verhältnis 1:2
- Proben ansetzen (doppelt): 20 µl Probe + 1000 µl Coomassie

- 5 Minuten warten
- Extintion bei 595 nm messen
- mit Hilfe der Eichgeraden bestimmen: Wieviel Protein ist in 1 g Kartoffel enthalten?

Ergebnisse

Beim Messen der Extintion der Proben aus der BSA-Lösung kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

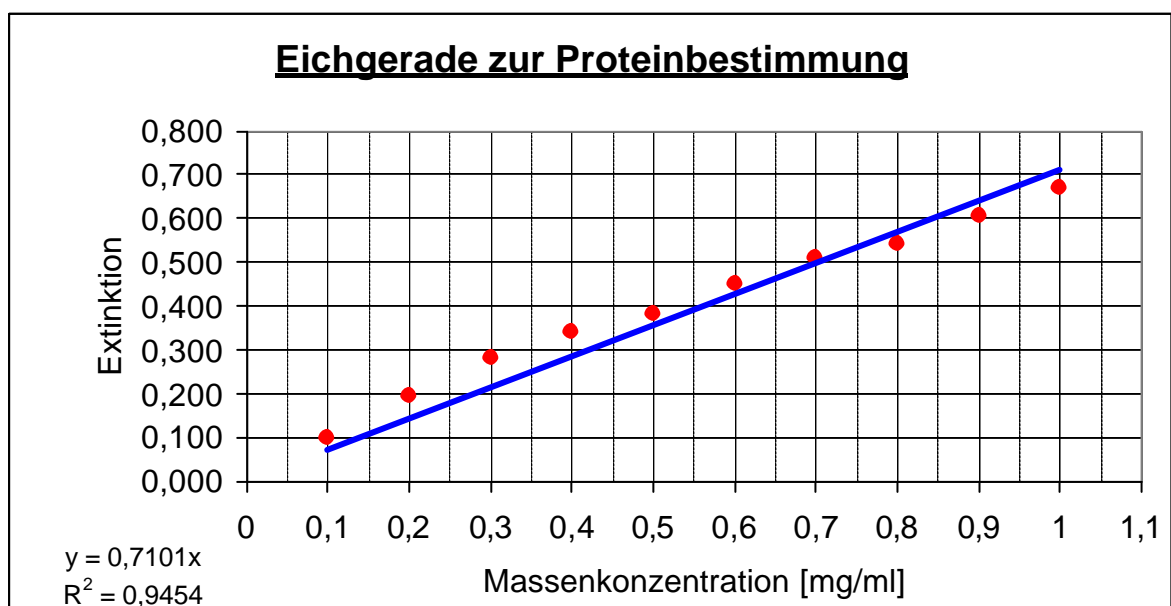
Massenkonz. [mg/ml]	Extintion		
	Messung 1	Messung 2	Durchschnitt
0,1	0,100	0,098	0,099
0,2	0,180	0,204	0,192
0,3	0,280	0,284	0,282
0,4	0,358	0,325	0,342
0,5	0,378	0,387	0,383
0,6	0,447	0,454	0,451
0,7	0,518	0,500	0,509
0,8	0,533	0,546	0,540
0,9	0,608	0,601	0,605
1	0,697	0,645	0,671

Der verdünnte Kartoffelextrakt weist eine Extintion auf von:

1. Messung	0,386
2. Messung	0,430
Durchschnitt	0,408

Auswertung

In einem Diagramm werden die Konzentration und der Mittelwert der Extintion gegeneinander aufgetragen. Durch diese Werte legt man eine Eichgerade, soweit die Werte einen linearen Bereich aufweisen. (Am besten lässt man sich die Formel der Geraden anzeigen. Das ist hilfreich für weitere Berechnungen. Das Bestimmtheitsmaß gibt nur an, wie gut sich die Datenpunkte der Eichgeraden nähern.)



Meine Daten liegen relativ linear auf einer Geraden. Das Bestimmtheitsmaß bestätigt dies: 1 wäre eine optimale Angleichung, 0.95 liegt sehr nahe an diesem Wert. Um die Massenkonzentration an Protein in meiner Kartoffelprobe zu bestimmen, kann ich zeichnerisch und rechnerisch vorgehen:

1. ich wandere in meinem Graphen auf der Extinktionsachse nach rechts bis zur Eichgerade, von da nach unten und lese auf der Konzentrationsachse die Massenkonzentration ab; es ergibt sich ein Wert von **ca. 0,570**
2. ich setze die von mir gemessene Extinktion in die Geradengleichung der Eichgerade ein und berechne x, welches für die Massenkonzentration steht; es ergibt sich ein Wert von:

$$\begin{array}{rcl}
 y = 0,7101 \cdot x & & | \cdot T \\
 0,408 = 0,7101 \cdot x & & | :0,7101 \\
 x = 0,408 / 0,7101 & & \\
 \mathbf{x = 0,575} & &
 \end{array}$$

Die beiden Werte entsprechen sich, wobei der rechnerisch ermittelte Wert wahrscheinlich um einiges genauer ist als der zeichnerisch ermittelte. Nun weiß ich, das in meinem 1:2-verdünnten Kartoffelextrakt 0,575 mg / ml Protein enthalten waren. Im unverdünnten Kartoffelextrakt befindet sich also doppelt soviel Protein:

$$0,575 \text{ mg/ml} \cdot 2 = 1,150 \text{ mg/ml}$$

1,15 mg/ml ist also die Proteinkonzentration unserer Ausgangslösung, die sich aus 10 g Kartoffel und 25 ml NaCl zusammensetzt. In einem ml dieser Lösung sind demnach $10\text{g}/25 = 0,4 \text{ g}$ Kartoffel enthalten. 1 g Kartoffel muß dann folgende Menge Protein enthalten:

$$\begin{array}{rcl}
 0,4 \text{ g/ml Kartoffel} \Rightarrow 1,150 \text{ mg/ml Protein} & | & :4 \\
 0,1 \text{ g/ml Kartoffel} \Rightarrow 0,2875 \text{ mg/ml Protein} & | & *10 \\
 \mathbf{1 \text{ g/ml Kartoffel} \Rightarrow 2,875 \text{ mg/ml Protein}} & &
 \end{array}$$

In einem Gramm Kartoffel sind also **2,875 mg Protein** enthalten.

Fehlerdiskussion

Der Versuch lief bei uns problemlos. Fehlerquellen können auftreten, wenn

- man unsauber pipettiert (mit einer Spitze in mehrere Proben; mit einer Spitze in unterschiedliche Lösungen; Pipette nicht richtig eingestellt)
- man die Proben nicht gründlich genug durchmischt
- man zu kurz oder zulange nach Zugabe von Coomassie brilliant blue wartet
- man das Photometer nicht richtig bedient