**Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνων με την μέθοδο Lowry**

1. 1 cm2 ψιλοκομμένου φύλλου προστίθεται σε 600 μl 100 mM Tris-ΗCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA εντός μικροφυγοκεντρικού σωλήνος.
2. Προστίθενται 2 μl 1M DTT (διθειοθρεϊτόλη) και 2 μl 0.1 g / 1 ml PMSF σε διμεθυλφορμαμίδη και ο ιστός ομογενοποιείται.
3. Τα αδιάλυτα στερεά υλικά απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στα 10.000 Χ g, 5 min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα.
4. Προσθήκη 200 mg/ml στερεού θειϊκού αμμωνίου (η τελική συγκέντρωση είναι 40% κεκορεσμένο σε θειϊκό αμμώνιο. 500 mg / ml είναι 100% κεκορεσμένο διάλυμα), ανακίνηση επί 20 λεπτά, φυγοκέντρηση στα 10.000 xg, 10 min. Μερικές από τις πρωτεϊνες καταπίπτουν σαν ίζημα.
5. Το ίζημα των πρωτεινών διαλύεται σε 500 μl νερού.
6. Σε έναν μικροφυγοκεντρικό σωλήνα προστίθενται 200 μl νερού και έπειτα 5 μl διαλύματος πρωτεϊνών.
7. Προστίθενται 200 μl διαλύματος CTC (2.5 % w/v SDS, 0.2 M NaOH, 2.5% w/v Na2CO3, 0.025% w/v CuSO4.5H2O, 0.025% w/v ταρταρικό κάλιο). Το δείγμα επαφίεται επί 10΄σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Προστίθενται 100 μl 20% v/v διαλύματος Folin-Ciocalteu. Το δείγμα επαφίεται επί 10΄σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Μετράται η απορρόφηση στα 750 nm. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνων στο δείγμα υπολογίζεται από καμπύλες απορρόφησης διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων της πρωτεϊνης BSA.

*Υλικά*

3 μικροφυγοκετρικοί σωλήνες

2 πλαστικές πιπέτες

διάλυμα 100 mM Tris-ΗCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA.

0.1 g / 1 ml PMSF σε διμεθυλφορμαμίδη

νερό

διάλυμα CTC

20% v/v διαλύματος Folin-Ciocalteu

κυψελίδα φωτομέτρου

*Άσκηση κατ΄οίκον*

Να ευρεθούν στο διαδίκτυο άλλοι τρόποι της χρήσης της μεθόδου Lowry για μέτρηση πρωτεϊνων και ειδικότερα άλλοι τρόποι παρασκευής του διαλύματος CTC. Χρησιμοποιήστε για την έρευνα τις λέξεις: Lowry and protein and (estimation or quantification or measurement) στις βάσεις δεδομένων (Scopus, ISI Web of science, etc) της βιβλιοθήκης του πανεπιστημίου ή στην διεύθυνση [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ή στον οδηγό αναζήτησης MSN.com του διαδικτύου.