Experiment 5

Quantitative Determination of Protein Concentration by spectrophotometry

للكشف عن نوع معين من الجزيئات وتحديد كميته، من الضروري وجود طريقة أو إجراء لقياسه. يُطلق على هذا الإجراء اسم "المقايسة"، ومن أمثلتها المقايسات الطيفية الضوئية.

Introduction

To detect, quantify a particular type of molecule, it is necessary to have a method or procedure for measuring it. This procedure is called an "assay" an example of which is **spectrophotometric assays.**

يهدف فحص البروتين (تحديد كميته) إلى تحديد كمية أو تركيز بروتين معين أو مجموعة من البروتينات المختلفة في عينة. يُستخدم عزل البروتين والكشف عنه في العديد من العمليات السريرية والبحثية، أو في المختبرات السريرية كجزء من تشخيص الأمراض (لتحديد كمية فقدان البروتين، أو مستوى بعض الإنزيمات أو الأجسام المضادة).

The purpose of the **protein assay (quantification)** is to determine the amount or concentration of a specific protein or an array of different proteins in a sample. Isolating and detecting protein is used for many clinical and research processes or in a clinical laboratory as part of a disease diagnosis (to quantify loss of protein, level of certain enzymes or antibodies).

There are many different types of protein assay, and variations upon the major techniques. Here we provide a simple overview of colorimetric reagent protein assay.

هناك أنواع عديدة من مقايسات البروتين، واختلافات في التقنيات الرئيسية. نقدم هنا نظرة عامة بسيطة على مقايسة البروتين باستخدام كاشف قياس الألوان.

❖ Spectrophotometry:

* قياس الطيف الضوئي:

A spectrophotometer is an instrument that measures the amount of photons (the intensity of light) absorbed after it passes through sample solution. With the spectrophotometer, the amount of a known chemical substance (concentrations) can also be determined by measuring the intensity of light detected.

جهاز قياس الطيف الضوئي هو أداة تقيس كمية الفوتونات (شدة الضوء) الممتصة بعد مرورها عبر محلول العينة. باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي، يمكن أيضًا تحديد كمية مادة كيميائية معروفة (التركيزات) عن طريق قياس شدة الضوء المكتشف.

Light is often treated as energy wave. The wavelength is expressed by lambda λ. And measured in nanometre= 10^{-9} m). The transfer of energy from a photon to a molecule is absorption. Light absorption may result directly from the intrinsic chemical properties of the molecules of interest. Alternatively, they may occur indirectly as a result of treating the molecules of interest with other compounds which react with them to create new chemicals that exhibit absorption. The wavelength at which a substance has its strongest photon absorption (highest point along the UV spectrum) is called Lambda max (λ max).

غالبًا ما يُعامل الضوء كموجة طاقة. يُعبر عن الطول الموجي بـ λ 2، ويُقاس بالنانومتر (10 م). يُعرف انتقال الطاقة من الفوتون إلى الجزيء بالامتصاص. قد ينتج امتصاص الضوء مباشرةً عن الخصائص الكيميائية الذاتية للجزيئات محل الاهتمام. أو قد يحدث بشكل غير مباشر نتيجةً لمعالجة الجزيئات محل الاهتمام بمركبات أخرى تتفاعل معها لتكوين مواد كيميائية جديدة تُظهر امتصاصًا. يُسمى الطول الموجي الذي يكون عنده امتصاص الفوتون أقوى ما يمكن (أعلى نقطة على طول طيف الأشعة فوق البنفسجية) بـ λ max (الأقصى).

تعتمد المقايسات الكيميائية الحيوية للجزيئات الحيوية عادةً على الامتصاص في منطقة الأشعة فوق البنفسجية أو المرئية. في هذه التجربة، سنستخدم مطياف الأشعة فوق البنفسجية المرئية (الشكل 1)، ويمتد نطاق الأشعة فوق البنفسجية عادةً من 100 إلى 400 نانومتر، مع نطاق مرئي من حوالي 400 إلى 800 نانومتر (طول موجة من الأحمر إلى البنفسجي

Biochemical assays for biomolecules are usually based on absorption in the UV or visible region. In this experiment we will use the **ultraviolet-visible spectrophotometer (figure 1),** the UV range normally extends from 100 to 400 nm, with the visible range from approximately 400 to 800 nm (red to violet wavelength range).

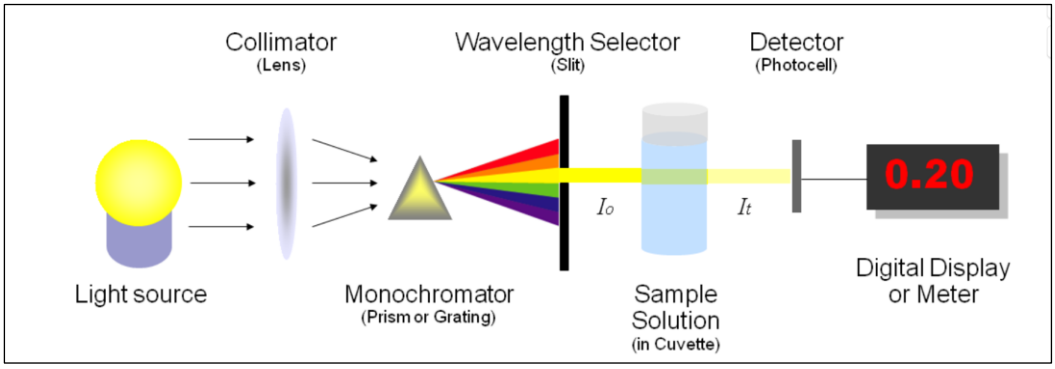


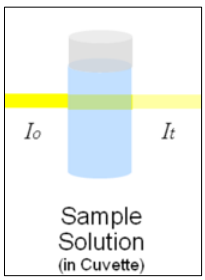
Figure 1: Components of spectrophotometer

يتم تحديد الكمية الإجمالية للضوء الممتص عند أي طول موجي معين (الامتصاص) من خلال ثلاثة عوامل: 1) خصائص امتصاص الجزيئات محل الاهتمام، 2) طول المسار أو المسافة التي يجب أن يقطعها الضوء، و3) تركيز الجزيء الممتص.

Beer-Lambert Law

The total amount of light absorbed at any particular wavelength (the absorbance) is determined by three factors: 1) the absorption characteristics of the molecules of interest; 2) the pathlength or distance through which the light must travel; and 3) the concentration of the absorbing molecule.

These factors are summarized in the following expression, which is called the Beer-Lambert law:



$$A = \log_{10} I_o/It = E \times C \times l$$

$$A = E \times C \times L$$

حيث A هي امتصاصية المحلول، وI هي شدة الضوء الساقط، وI هي شدة الضوء النافذ، وE هو معامل الامتصاص المولي، وc هو تركيز المذاب الممتص، وI هو طول مسار الضوء.

Where A is the absorbance of the solution, I_o is the intensity of the incident light, and I_t is the intensity of the transmitted light; E is the molar extinction coefficient ; c is the concentration of the absorbing solute; and l is the pathlength of the light.

The concentration of the solute (c) is usually expressed in moles/liter (M) and the pathlength of light (l) is expressed in cm. The molar extinction coefficient (E), also called the molar absorptivity [epsilon (ε)] is an intrinsic characteristic of each molecule at a particular wavelength. It is numerically defined as the absorbance of a 1.0 M solution of the molecule of interest in a 1.0 cm light path. Because E has the units of liter/(cm x mole) , absorbance itself is a parameter with no units. The larger the value of E, the more a compound absorbs at a particular wavelength.

يُعبر عن تركيز المذاب (c) عادةً بوحدة مول/لتر (M)، ويُعبر عن طول مسار الضوء (l) بوحدة سم. معامل الامتصاص المولي (E)، والذي يُسمى أيضًا معامل الامتصاص المولي (ε)، هو خاصية جوهرية لكل جزيء عند طول موجي معين. ويُعرف عدديًا بأنه امتصاصية محلول تركيزه 1.0 مول/لتر من الجزيء المطلوب في مسار ضوئي طوله 1.0 سم. بما أن وحدة E هي لتر/(سم × مول)، فإن الامتصاصية نفسها تُعتبر مُعاملًا بلا وحدات. كلما زادت قيمة E، زاد امتصاص المركب عند طول موجي مُحدد.

يتبع معادلة الخط المستقيم

m= E l C= x

The equation for Beer's law is a straight line with the general form of y = mx +b.

Beer's Law: A = (E l) C

The general form: y = (m) x

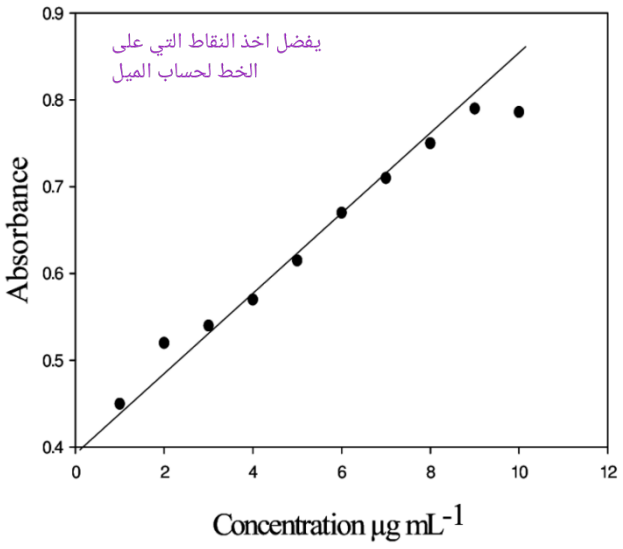
حيث الميل، م، يساوي (El). في هذه الحالة، يتم رسم امتصاصات تراكيز مختلفة من مادة قياسية مقابل تراكيزها لإنشاء منحنى "معايرة" قياسي.

where the slope, m, is equal to (El). In this case, the absorbances of different concentrations of a standard substance is plotted against their concentrations to generate a standard "calibration" curve.

A calibration curve, also known as a **standard curve**, is a general method for determining the concentration of a substance in an unknown sample by comparing the unknown to a set of standard samples of known concentration (for protein assay, sugar assays, and various types of assays).

You can find the slope and y-intercept of the linear graph to get the linear equation. By measuring the absorbance of the sample of unknown concentration, you can apply it to the equation to find the concentration (there is an example afterward).

منحنى المعايرة، المعروف أيضًا باسم المنحنى القياسي، هو طريقة عامة لتحديد تركيز مادة في عينة مجهولة عن طريق مقارنة العينة المجهولة بمجموعة من العينات القياسية ذات التركيز المعروف (لتحليل البروتين، وتحليلات السكر، وأنواع مختلفة من التحليلات).



يمكنك إيجاد ميل ونقطة تقاطع الرسم البياني الخطي للحصول على المعادلة الخطية. من خلال قياس امتصاص العينة ذات التركيز المجهول، يمكنك تطبيقه على المعادلة لإيجاد التركيز (يوجد مثال لاحقًا).

Calibration curve of absorbance against concentration using Beer's Lambert law.

منحنى معايرة الامتصاص مقابل التركيز باستخدام قانون بير لامبرت.

نظريًا، يجب أن يكون التقاطع مع المحور الصادي صفرًا في رسم قانون بير؟ لأنه عند التركيز الصفري، لا يوجد مركب مذاب في المحلول، ويتم تصفير جهاز قياس الطيف الضوئي باستخدام المحلول الفارغ قبل إجراء القياسات. تُجرى جميع قياسات امتصاص الضوء بالنسبة إلى محلول فارغ يحتوي على جميع مكونات محلول العينة باستثناء المادة المراد تحليلها. ولكن عمليًا، قد يكون لديك تقاطع مع المحور الصادي، إذا لم يكن الرسم البياني خطيًا أو إذا انحرف التقاطع مع المحور الصادي بشكل كبير عن نقطة الأصل، فهذا يشير إلى أن المعايير لم يتم تحضيرها بشكل صحيح، وأن هناك تداخلًا غير معروف في العينة.

Theoretically the Y-intercept should be zero for the Beer's Law Plot?

Because at zero concentration, there is no compound dissolved in solution, and the spectrophotometer is zeroed using the blank before taking the measurements.

All light absorption measurements are made relative to a blank solution which contains all the components of the sample solution except the substance being analyzed

But practically, you may have y-intercept, if the plot is not linear or if the y-intercept deviates substantially from the origin, it indicates that the standards were improperly prepared, that there is an unknown interference in the sample.

sample - blank = substance being analyzed

If we have two concentrations of the same solution, then they have the same molar extinction coefficient (E), and the length path (l) is 1 cm in most spectrophotometers.

$A = (E\ l)\ C$

$(E\ l) = A/C$

إذا كان لدينا تركيزان لنفس المحلول، فسيكون لهما نفس معامل الامتصاص المولي (E)، وطول المسار (1) هو 1 سم في معظم أجهزة قياس الطيف الضوئي.

- $E \times l_{(1st\ concentration)} = E \times l_{(2nd\ concentration)}$
- $E_1 = E_2$
- $A/C_1 = A/C_2$

Therefore, the absorbance/concentration relationship can be applied using the same linear equation we got for the standard.

لذلك، يمكن تطبيق علاقة الامتصاص/التركيز باستخدام نفس المعادلة الخطية التي حصلنا عليها للمعيار.

Example:

A calibration curve was generated for a set of standard concentrations (mg/ml). The slope for the line is 0.13 and the y-intercept is 0.018. using beers law, calculate the concentration of an unknown sample, given that its absorbance was 0.5

$y = (m)\ x$ + y intercept if it's not zero

$A = (E\ l)\ C$

$y = 0.13x + 0.0108$

$0.5 = 0.13x + 0.0108$

$0.5 - 0.0108 = 0.13x$

$0.4892 = 0.13x$

$x = 0.4892/0.013, \quad x = 3.76$ mg/ml

فحص البروتين باستخدام كاشف قياس الألوان

❖ Colorimetric reagent protein assay

تُعد هذه الفحوصات مفيدة لتحديد كمية البروتين في عينة معينة. وهي سريعة وسهلة التنفيذ، ولا تتطلب مواد كيميائية معقدة أو خطرة. في هذه الفحوصات، يتم ربط كاشف يمتص كمية محددة من الضوء ببروتين معين، ثم يتم قياس كمية الضوء.

These assays are useful to quantify the amount of protein in a given sample. These are fast and easy to perform, and do not require complex or hazardous chemicals. In these assays, a reagent that specifically absorbs a specific amount of light is attached to a specific protein, and then the amount of light is measured.

Two main types of colorimetric reagent protein assay

نوعان رئيسيان من اختبارات البروتين باستخدام كاشف قياس الألوان:

1. استخلاب النحاس والكشف عن النحاس المختزل
• اختبار حمض البيسينكونينيك (BCA).

1. Copper chelation and detection of the reduced copper

- Bicinchoninic acid (BCA) assay.

Compatible with samples containing detergents. Incompatible with reducing agents; chelators.

متوافق مع العينات التي تحتوي على منظفات. غير متوافق مع عوامل الاختزال: عوامل الاستخلاب.

Assay range: (sample volume) 20 to 2,000 µg/mL, (25 µL).

نطاق الفحص: (حجم العينة) من 20 إلى 2000 ميكروغرام/مل، (25 ميكرولتر). وقت ودرجة حرارة الحضانة: 30 دقيقة عند 37 درجة مئوية

Incubation time and temperature: 30 min at 37°C

Assay measurement (absorbance maximum wavelength -λ max): 540 nm.

قياس المعايرة (أقصى امتصاص عند الطول الموجي الأقصى): 540 نانومتر.

2. Protein-dye binding and associated colour change

2. ارتباط البروتين بالصبغة وتغير اللون المصاحب
• برادفورد (صبغة كوميسي):

- Bradford (Coomassie dye):

متوافق مع العينات التي تحتوي على أملاح المحلول المنظم، وأيونات المعادن، وعوامل الاختزال، وعوامل الاستخلاب. غير متوافق مع العينات التي تحتوي على المنظفات. نطاق القياس (حجم العينة): 100 ميكروغرام/مل - 1500 ميكروغرام/مل (20 ميكرولتر).

Compatible with samples containing buffer salts, metal ions, reducing agents, chelators. Incompatible with samples containing detergents.

Assay range (sample volume), 100 µg/ml-1,500 µg/ml (20 µL),

Incubation time and temperature: 5-10 minutes at room temperature, samples should not be incubated longer than 1 hr at room temperature.

وقت ودرجة حرارة الحضانة: 5-10 دقائق في درجة حرارة الغرفة، يجب عدم حضانة العينات لأكثر من ساعة واحدة في درجة حرارة الغرفة.

Assay measurement (absorbance maximum wavelength-λ max): 595 nm.

قياس المعايرة (أقصى امتصاص عند الطول الموجي الأقصى): 595 نانومتر.

➔ Bradford assay principles

مبادئ فحص برادفورد ←

Use of Coomassie G-250 Dye in a colorimetric reagent for the detection and quantitation of total protein was first described by Dr. Marion Bradford in 1976. It is a colorimetric, spectrophotometric quantitative assay to measure protein concentration.

وصف الدكتور ماريون برادفورد لأول مرة في عام 1976 استخدام صبغة كوماسي G-250 في كاشف قياس الألوان للكشف عن البروتين الكلي وتحديد كميته. وهو فحص كمي طيفي لقياس تركيز البروتين.

→ كيمياء برادفورد، فحوصات البروتين القائمة على صبغة كوميسي

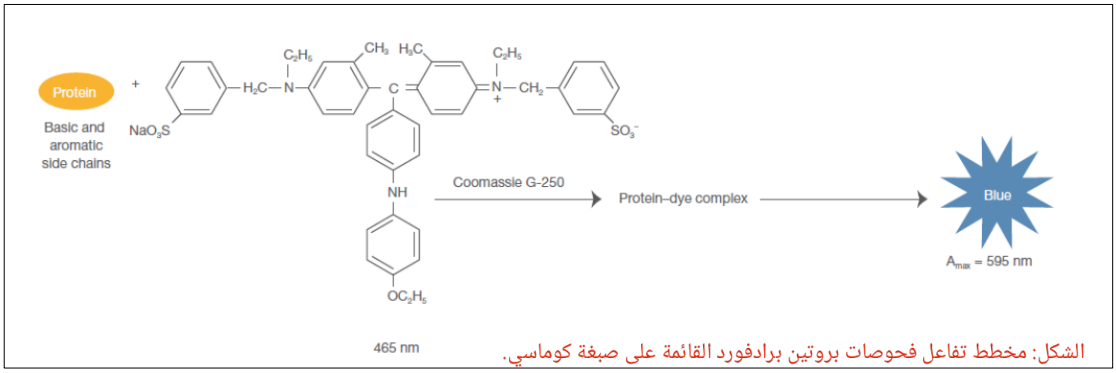
➔ Chemistry of Bradford, Coomassie-based protein assays

في بيئة حمضية، ترتبط البروتينات بصبغة كوميسي. ينتج عن ذلك تحول طيفي من الشكل البني للصبغة إلى الشكل الأزرق. الطول الموجي الأمثل لقياس اللون الأزرق من معقد صبغة كوميسي-البروتين هو 595 نانومتر.

In an acidic environment, proteins bind to coomassie dye. This results in a spectral shift from the brown form of the dye to the blue form. The optimal wavelength to measure the blue color from the Coomassie dye–protein complex is 595 nm.

يرتبط ظهور اللون في فحوصات البروتين القائمة على صبغة كوميسي بوجود أحماض أمينية قاعدية معينة - وخاصة الأرجينين والليسين والهيستيدين - في البروتين. تؤثر قوى فان دير فالس والتفاعلات الكارهة للماء أيضًا على ارتباط الصبغة بالبروتين. يتناسب عدد جزيئات صبغة كوميسي المرتبطة بكل بروتين تقريبًا مع عدد الشحنات الموجبة الموجودة على البروتين.

Development of color in Coomassie dye–based protein assays has been associated with the presence of certain basic amino acids—primarily arginine, lysine, and histidine—in the protein. Van der Waals forces and hydrophobic interactions also influence dye–protein binding.The number of Coomassie dye molecules bound to each protein is approximately proportional to the number of positive charges found on the protein.



الشكل: مخطط تفاعل فحوصات بروتين برادفورد القائمة على صبغة كوماسي.

Figure: Reaction schematic for the Coomassie dye–based Bradford protein assays.

Free amino acids, peptides, and low molecular weight proteins do not produce color with Coomassie dye reagents. In general, the mass of a peptide or protein should be at least 3,000 Dalton for quantification with this reagent.

لا تُنتج الأحماض الأمينية الحرة والببتيدات والبروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض لونًا مع كواشف صبغة كوميسي. بشكل عام، يجب أن تكون كتلة الببتيد أو البروتين 3000 دالتون على الأقل للقياس الكمي باستخدام هذا الكاشف.

Bovine serum albumin (BSA) which is used to generate the standard curve has a molecular mass of 66.5 KDalton and is used because it is widely available in high purity and it is inexpensive.

يبلغ الوزن الجزيئي لألبومين مصل البقر (BSA)، المستخدم لإنشاء منحنى المعايرة، 66.5 كيلو دالتون، ويُستخدم لأنه متوفر على نطاق واسع بنقاوة عالية وغير مكلف.

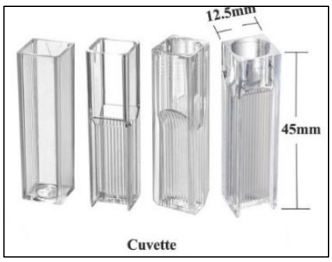
The main disadvantage of Coomassie based protein assays is their incompatibility with surfactants/detergents at concentrations routinely used to solubilize membrane proteins. In general, the presence of a surfactant in the sample, even at low concentrations, causes precipitation of the reagent. In addition, the Coomassie dye reagent is highly acidic, so proteins with poor acid-solubility cannot be assayed with this reagent.

العيب الرئيسي لفحوصات البروتين القائمة على كوميسي هو عدم توافقها مع المواد الخافضة للتوتر السطحي/المنظفات بالتركيزات المستخدمة بشكل روتيني لإذابة بروتينات الغشاء. بشكل عام، يؤدي وجود عامل خافض للتوتر السطحي في العينة، حتى بتراكيز منخفضة، إلى ترسيب الكاشف. إضافةً إلى ذلك، فإن صبغة كوميسي شديدة الحموضة، لذا لا يمكن تحليل البروتينات ذات الذوبانية المنخفضة في الأحماض باستخدام هذا الكاشف.

Experimental procedure:

Materials

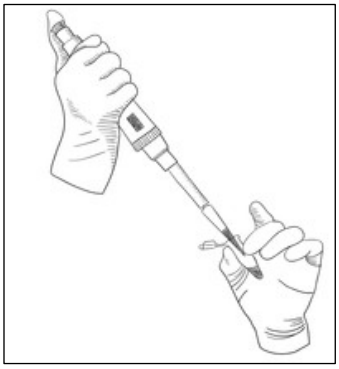
- Unknown sample
- Micropipette (P-1000, P-20)
- Tips
- 6 Eppendorf's
- Cuvette
- Distilled water
- BSA standard 5 (125 µg/ml)
- BSA standard 4 (250 µg/ml)
- BSA standard 3 (500 µg/ml)
- BSA standard 2 (1000 µg/ml)
- BSA standard 1 (1500 µg/ml)
- Spectrophotometer



Method

1. Label each Eppendorf with the concentration of the standard/ sample on the cap or the lateral side. Then:
   Add 20 µl of each standard to 1000 µl Bradford reagent in an Eppendorf and mix by flipping upside down (mix by inverting the tube smoothly, do not shake vigorously as this will results in bubbles and will interfere with your measurements).

1. ضع ملصقًا على كل أنبوب إيبندورف يوضح تركيز المعيار/العينة على الغطاء أو الجانب. ثم: أضف 20 ميكرولتر من كل معيار إلى 1000 ميكرولتر من كاشف برادفورد في أنبوب إيبندورف واخلط عن طريق قلب الأنبوب رأسًا على عقب (اخلط عن طريق قلب الأنبوب برفق، لا ترجه بقوة لأن ذلك سيؤدي إلى فقاعات وسيؤثر على قياساتك).



Assay range (sample volume), 100 µg/ml-1,500 µg/ml (20 µL).

نطاق المعايرة (حجم العينة)، 100 ميكروغرام/مل - 1500 ميكروغرام/مل (20 ميكرولتر). نسبة العينة إلى كاشف برادفورد هي 1:50 (20 ميكرولتر عينة : 1000 ميكرولتر كاشف برادفورد)

Ration of sample to Bradford reagent is 1:50

[20 µl sample: 1000 µl Bradford reagent]

Eppendorf	Bradford reagent	Standard/sample
1	1000 µl	20 µl standard 5 (125 µg/ml)
2	1000 µl	20 µl standard 4 (250 µg/ml)
3	1000 µl	20 µl standard 3 (500 µg/ml)
4	1000 µl	20 µl standard 2 (1000 µg/ml)
5	1000 µl	20 µl standard 1 (1500 µg/ml)
6	1000 µl	20 µl Unknown sample

no shaking just flip it upside down

3. شغّل الجهاز قبل الاستخدام بـ 5-10 دقائق على الأقل للسماح له بالاستقرار.

2. حضّن لمدة 5-10 دقائق في درجة حرارة الغرفة.

4. حدد الحد الأقصى .

2. Incubate for 5-10 minutes at room temperature.
3. Switch the instrument at least 5-10 minutes before use to allow it to stabilize.
4. Select the λ max.
5. Place the blank solution (or water) in the cuvette, so that the instrument is zeroed.

5. ضع المحلول الفارغ (أو الماء) في الكوفيت، بحيث يكون الجهاز مصفر

- Make sure the clear faces of the cuvette are in the light path and that the outside of the cuvette is dry and clean.

- تأكد من أن الأسطح الشفافة للكوفيت في مسار الضوء وأن السطح الخارجي للكوفيت جاف ونظيف.

- Handle cuvettes only by the top edge of the ribbed sides (finger print affects the measurement). All solutions should be free of bubbles.

- امسك أنابيب الاختبار من الحافة العلوية للجوانب المضلعة فقط (بصمات الأصابع تؤثر على القياس). يجب أن تكون جميع المحاليل خالية من الفقاعات.

Mix and incubate for 5-10 minutes at room temperature.

6. ضع العينة (القياسية/المجهولة) في المكان المخصص لها في مطياف الضوئي

6. Place the sample (standard/unknown) in the allocated place in the spectrophotometer.
7. Measure absorbance of standards and unknowns at 595nm, using water as a blank (when measuring by spectrophotometer, use 800 µl of the sample/standard or more in plastic cuvettes, using less volume will result in bad absorbance numbers- sample cuvette must be half/two third full)
8. Measure absorbance of the unknowns at 595nm similar to standard procedure.
9. Record your measurements.

7. قِس امتصاصية العينات القياسية والمجهولة عند 595 نانومتر، باستخدام الماء كعينة مرجعية (عند القياس بجهاز قياس الطيف الضوئي، استخدم 800 ميكروغرام أو أكثر من العينة/القياسية في خلايا قياس بلاستيكية، استخدام حجم أقل سيؤدي إلى قراءات امتصاص غير دقيقة - يجب أن تكون خلية قياس العينة ممتلئة إلى النصف/الثلثين)

8. قِس امتصاصية العينات المجهولة عند 595 نانومتر بطريقة مشابهة للإجراء القياسي.

9. سجّل قياساتك.

➢ For standard samples: you can use one plastic cuvette multiple times without washing if you work from low to high concentration. Otherwise, you must use a new cuvette each time or wash the cuvettes for reuse to get the blue out.

> بالنسبة للعينات القياسية: يمكنك استخدام أنبوب اختبار بلاستيكي واحد عدة مرات دون غسل إذا كنت تعمل من تركيز منخفض إلى تركيز عالٍ. خلاف ذلك، يجب عليك استخدام أنبوب اختبار جديد في كل مرة أو غسل أنابيب الاختبار لإعادة استخدامها لإزالة اللون الأزرق.

> إذا كان لون العينة المجهولة أكثر كثافة من المعيار الأعلى، فيجب تخفيفها بالماء. يُنصح بإجراء عدة تخفيفات مختلفة للعينة المجهولة (تخفيف 1 في 2 أو 1 في 4) بحيث تقع ضمن النطاق القياسي للاختبار.
عند تحليل البيانات، يجب ضرب التركيز الذي حصلت عليه بعد التخفيف في عامل التخفيف:

- If your unknown colour is more intense than the higher standard, you should dilute it in water• It is advisable to make several different dilutions of your unknown sample (1 in 2 or 1 in 4 dilution) so that it falls within the standard range of the assay. When analysing the data, you have to multiply the concentration you got after dilution with the dilution factor:
- concentration of the unknown= concentration after dilution x dilution factor.
- YOU DO NEED TO RUN STANDARDS EVERY TIME! The reagent's response will change even after one day.

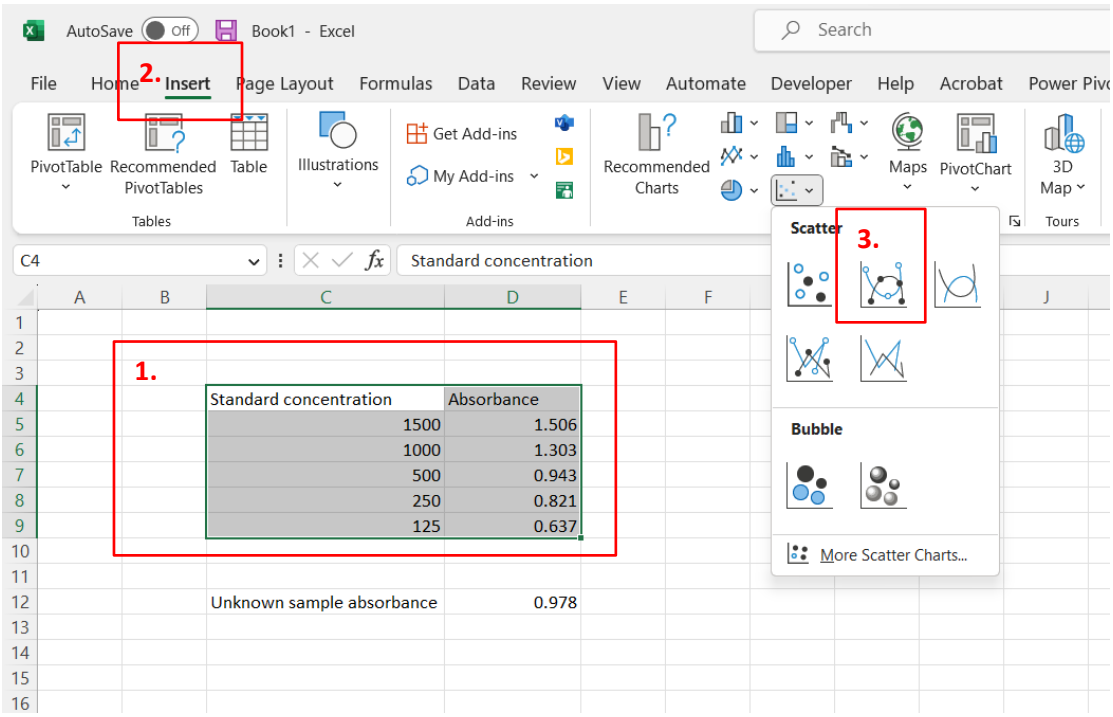
تركيز العينة المجهولة = التركيز بعد التخفيف × عامل التخفيف. يجب إجراء اختبارات قياسية في كل مرة! ستتغير استجابة الكاشف حتى بعد يوم واحد.

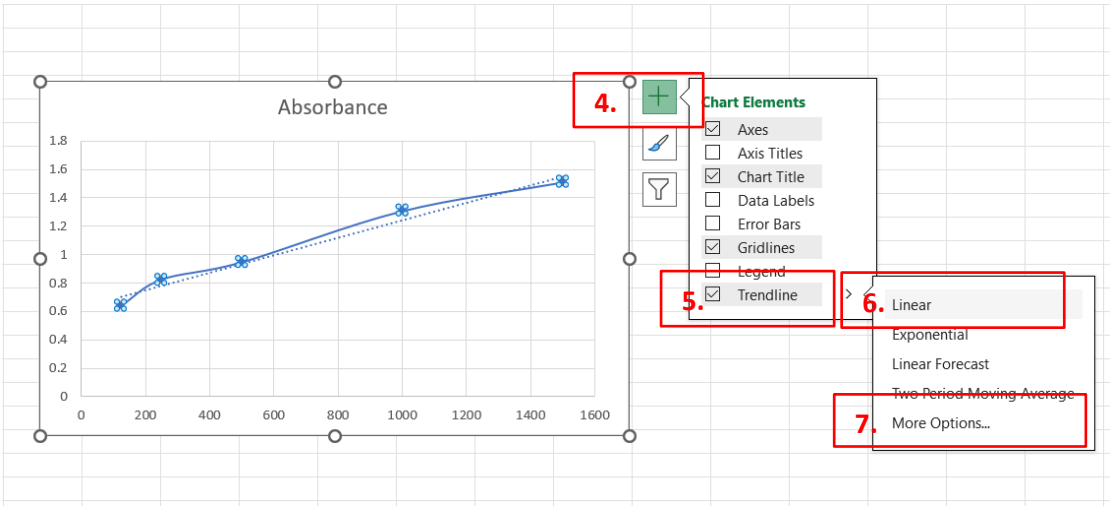
Data analysis:

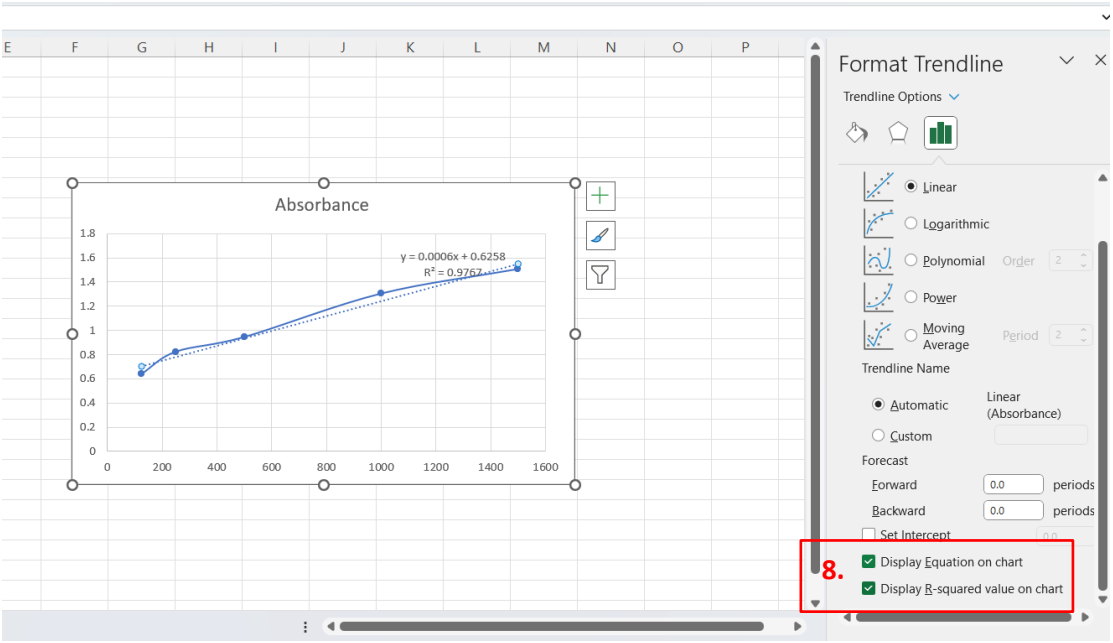
Draw a standard curve, and find the linear equation for your curve, R^2 value, and calculate your unknown concentration.

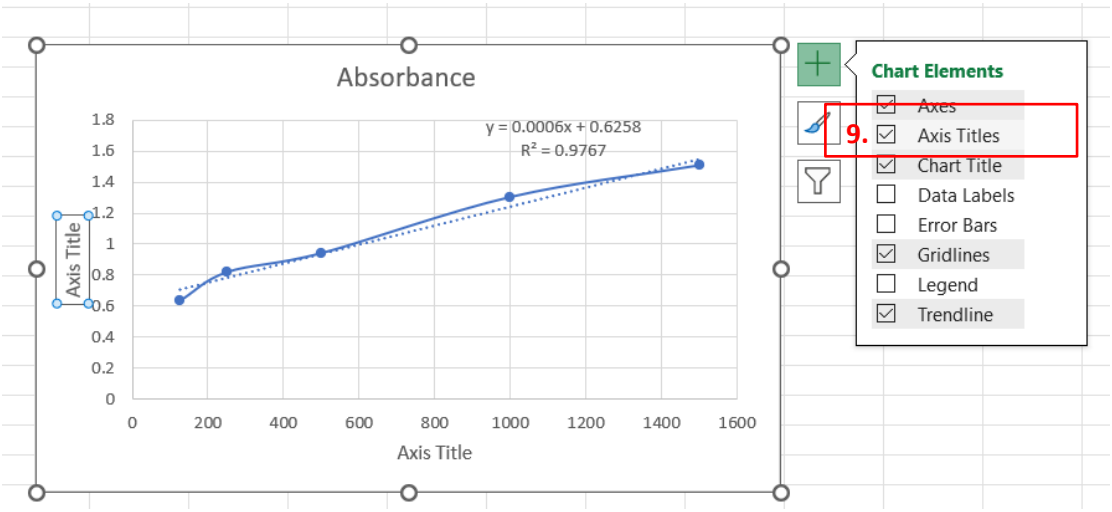
• Create a calibration/standard curve graph of bovine serum albumin (BSA) protein concentration vs. absorbance using Bradford method.

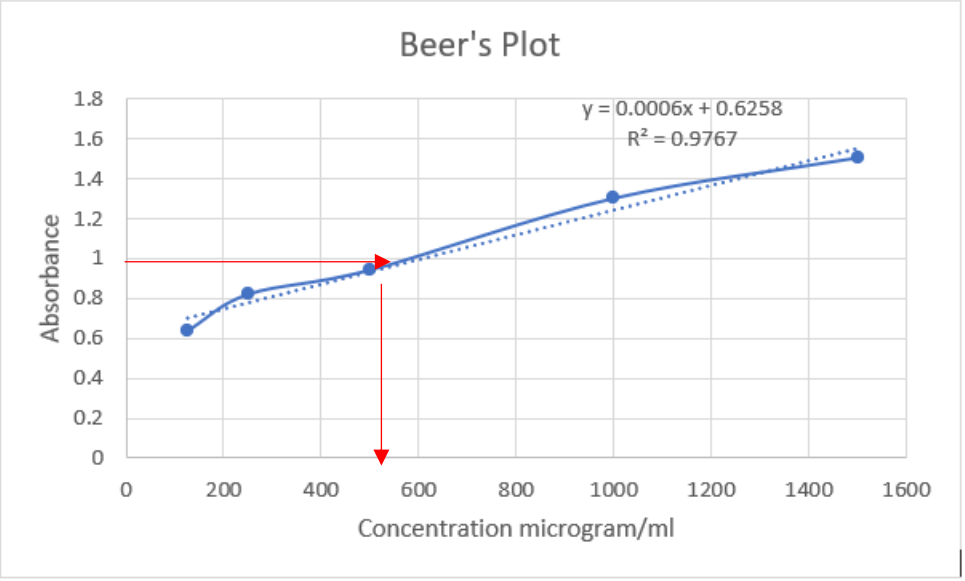
1. Enter the recorded measurement you obtained in the lab as in the image below, then click insert, choose scatter and click on the second option (scatter with smooth line and marker).
2. Double click on the line generated and choose the +, choose trendline, and then click on the linear option, then more options
3. On the right panel click on: Display equation on chart and display R-squared value on chart. R^2 value should ideally be above 0.9.
4. Edit y and x-axis and the plot title,
5. Print the form and submit it with your report. From the absorbances of the unknowns, find the protein concentration using the linear equation generated.


AutoSave Off
Book1 - Excel
Search
File Home Insert Page Layout Formulas Data Review View Automate Developer Help Acrobat Power Piv
2.
PivotTable
Recommended PivotTables
Table
Tables
Illustrations
Get Add-ins
My Add-ins
Add-ins
Recommended Charts
Maps
PivotChart
3D Map
Tours
Scatter
3.
Bubble
More Scatter Charts...
C4
Standard concentration
1.
Standard concentration
Absorbance
1500
1.506
1000
1.303
500
0.943
250
0.821
125
0.637
Unknown sample absorbance
0.978


Absorbance
4.
Chart Elements
Axes
Axis Titles
Chart Title
Data Labels
Error Bars
Gridlines
Legend
Trendline
5.
6.
Linear
Exponential
Linear Forecast
Two Period Moving Average
7.
More Options...


Absorbance
y = 0.0006x + 0.6258
R² = 0.9767
Format Trendline
Trendline Options
Linear
Logarithmic
Polynomial
Order
Power
Moving Average
Period
Trendline Name
Automatic
Linear (Absorbance)
Custom
Forecast
Forward
Backward
periods
Set Intercept
8.
Display Equation on chart
Display R-squared value on chart


Absorbance
y = 0.0006x + 0.6258
R² = 0.9767
Axis Title
Axis Title
Chart Elements
9.
Axes
Axis Titles
Chart Title
Data Labels
Error Bars
Gridlines
Legend
Trendline



Unknown absorbance = 0.978

$y = 0.0006x + 0.6258$, $R^2 = 0.9767$

$0.978 = 0.0006x + 0.6258$

$0.978 - 0.6258 = 0.0006x$

X= 587 microgram/ml