
7.VAJA – METODA PO BRADFORDU

MARINA KLEMENČIČ

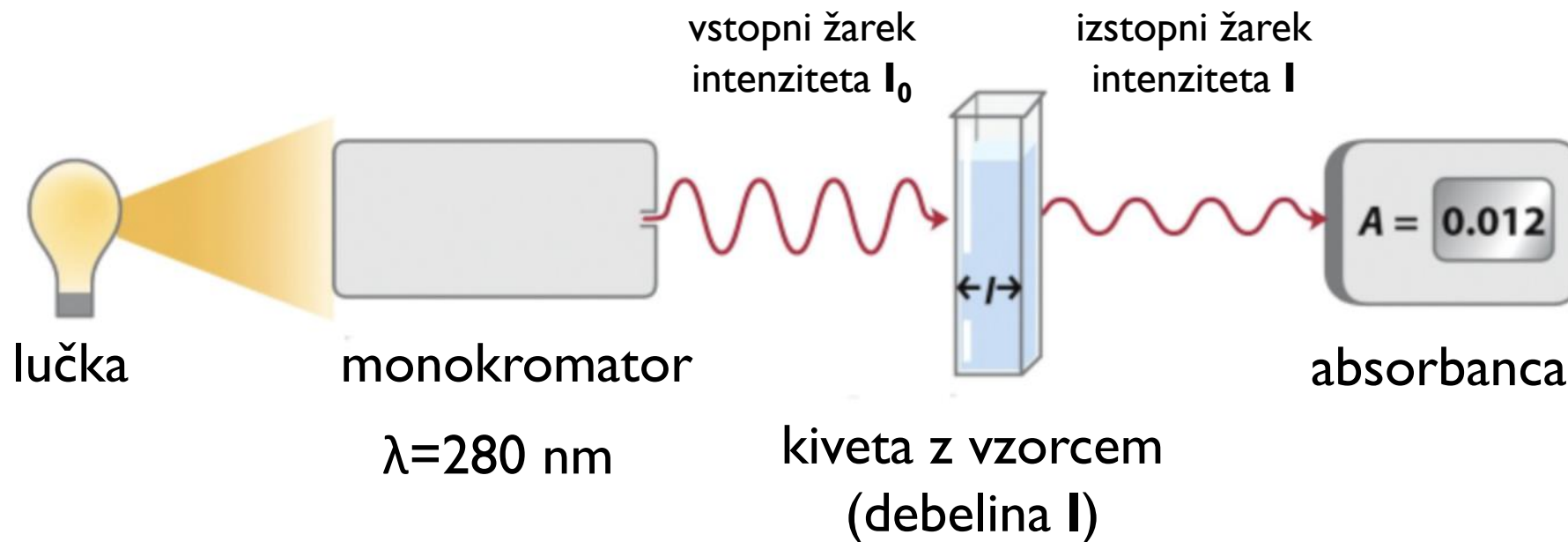


KVANTITATIVNO DOLOČANJE PROTEINOV

- Spektrofotometrija
- Kolorimetrične metode
 - Biuretska
 - Lowrijeva
 - Bradfordova

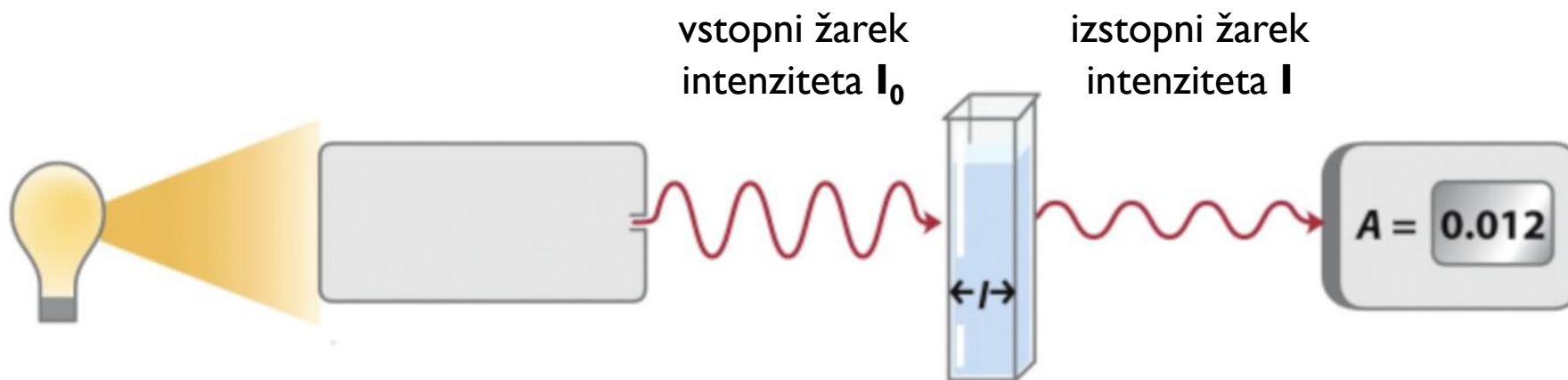
SPEKTROFOTOMETRIJA

Absorbanca pri $\lambda=280$ nm (A_{280})



SPEKTROFOTOMETRIJA

Absorbanca pri $\lambda=280$ nm (A_{280})

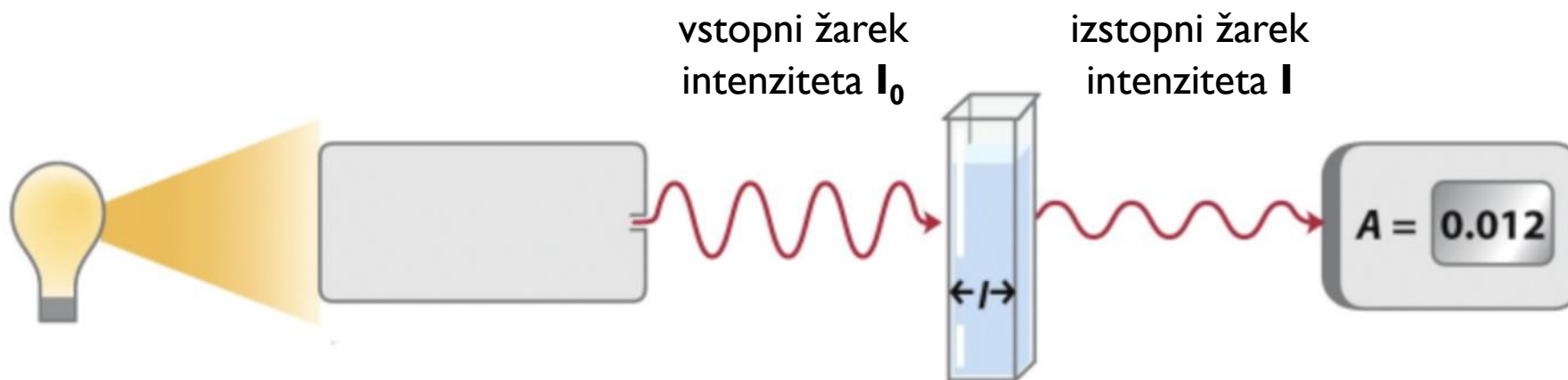


$$T = \frac{I}{I_0}$$

transmitanca

SPEKTROFOTOMETRIJA

Absorbanca pri $\lambda=280$ nm (A_{280})

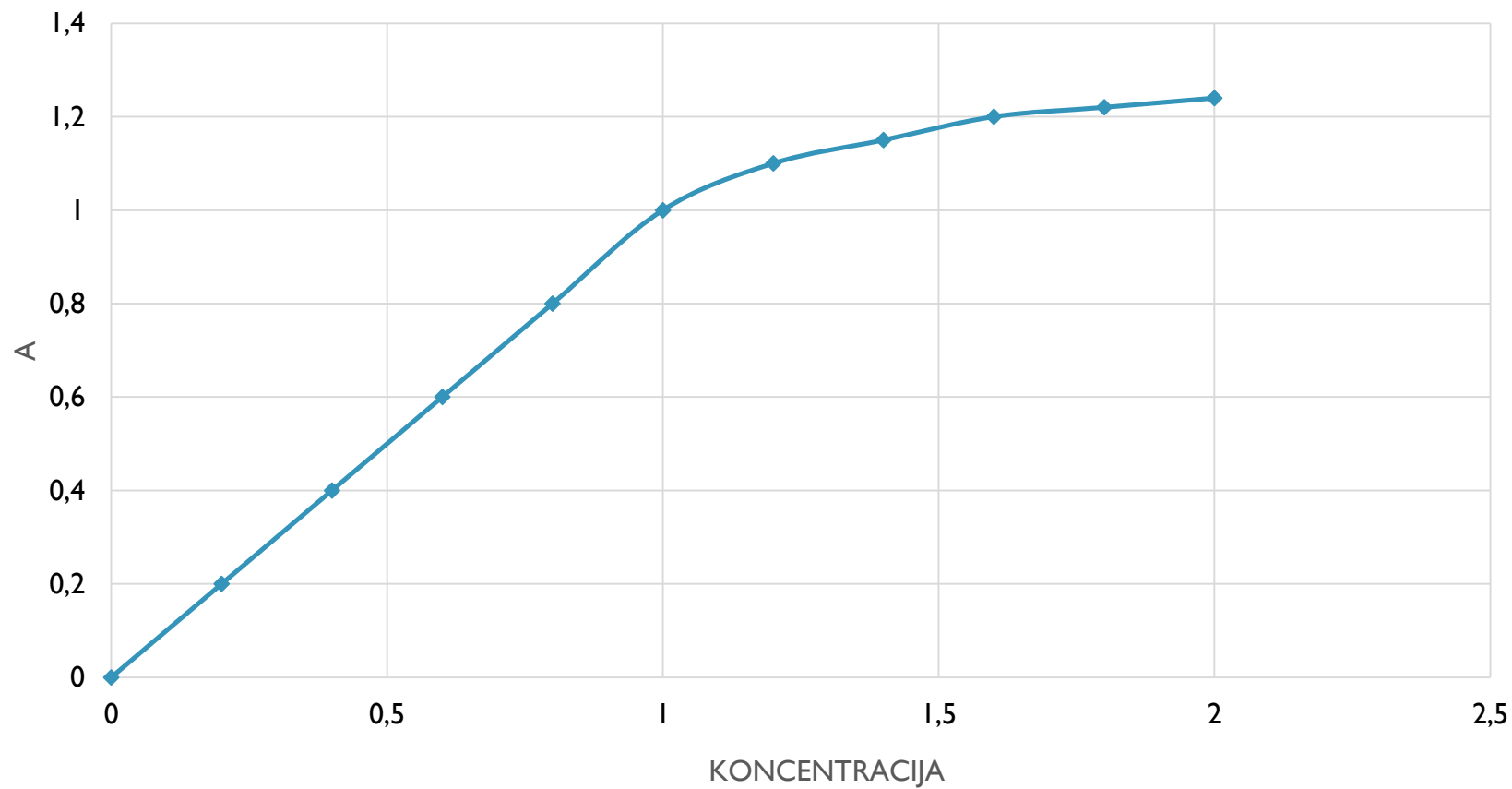


$$A = -\log T$$

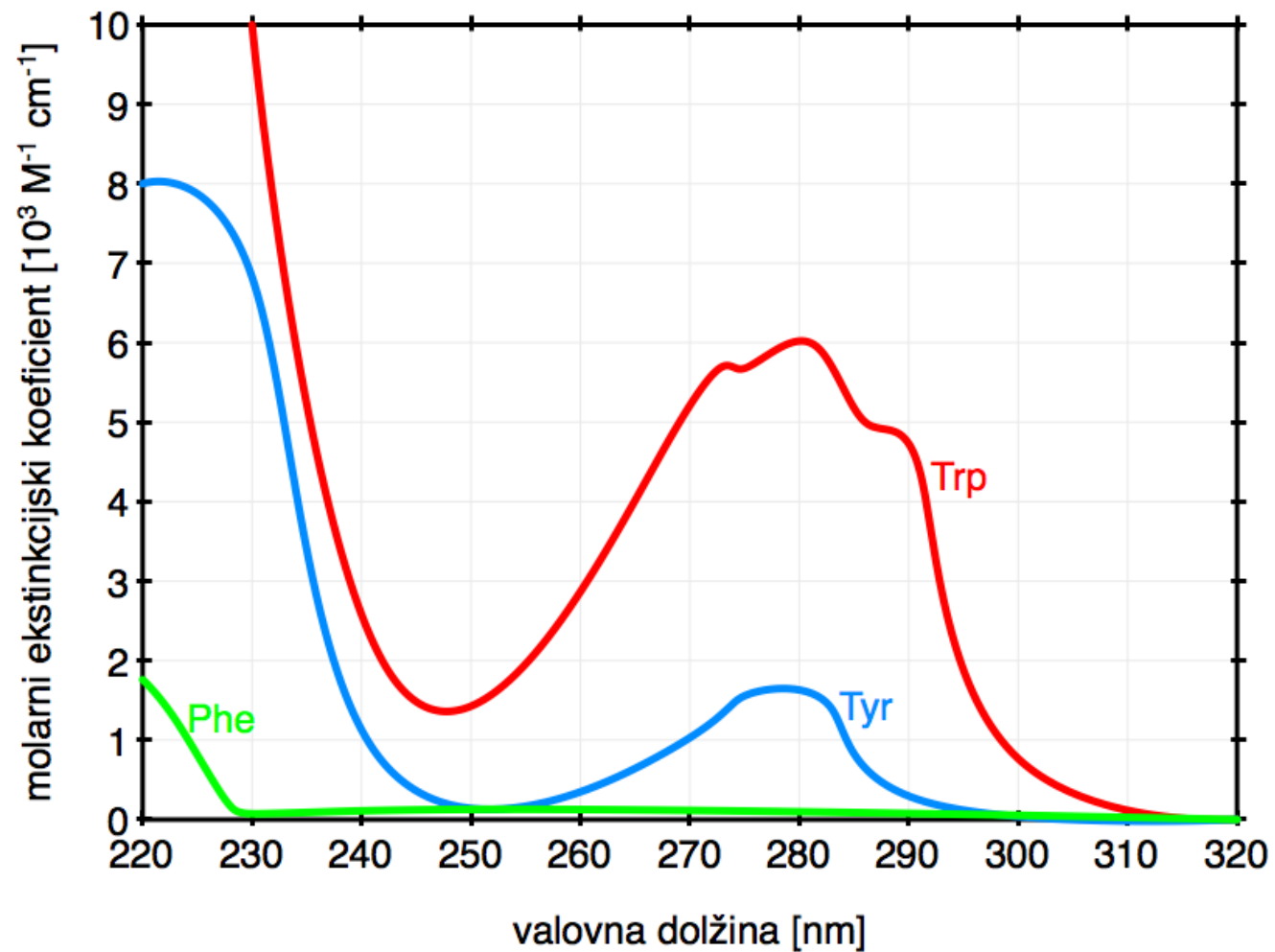
absorbanca

SPEKTROFOTOMETRIJA

A	T%
1	10 %
2	1 %
3	0,1 %
4	0,01%



SPEKTROFOTOMETRIJA



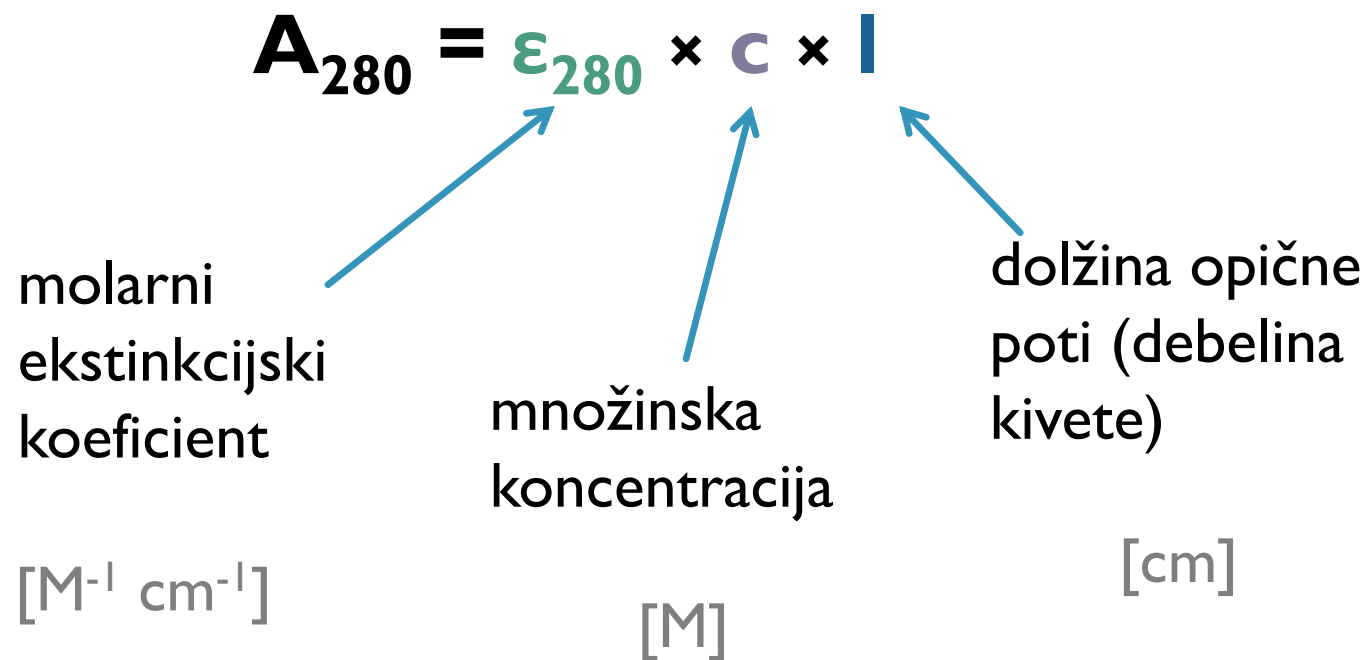
SPEKTROFOTOMETRIJA

$$A_{280} = \epsilon_{280} \times c \times l$$

molarni
ekstinkcijski
koeficient
[M⁻¹ cm⁻¹]

množinska
koncentracija
[M]

dolžina optične
poti (debelina
kivete)
[cm]



Velja približek: če je absorbanca = 1 je koncentracija enaka 1 mg/ml

SPEKTROFOTOMETRIJA

KAKO DELUJE?

Metoda temelji na spremljanju absorbance pri $\lambda=280$ nm, kjer absorbirata predvsem aminokislini triptofan in tirozin.

MEJA DETEKCIJE?

20 – 3000 $\mu\text{g/ml}$

PREDNOSTI?

- hitra
- nedestruktivna
- poceni

SLABOSTI?

- močno odvisna od aminokislinske sestave
- sestava pufru vpliva na absorbanco

SICER HITRA IN POCENI
METODA, A NENATANČNA
TER ODVISNA OD SESTAVE
PROTEINA

KOLORIMETRIČNE METODE

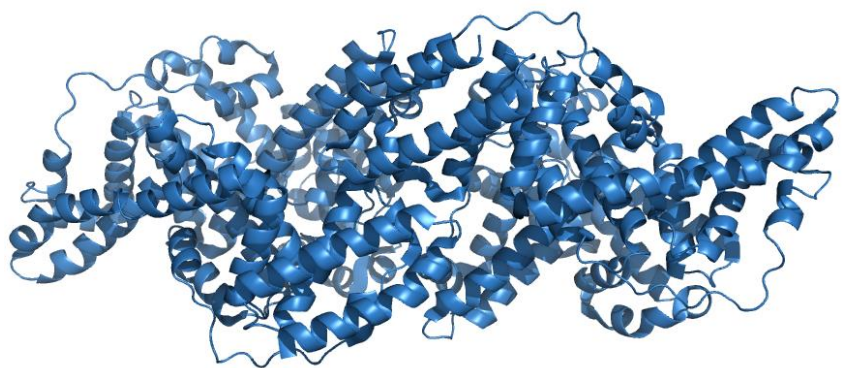
Kolorimetrične metode niso absolutne, kar pomeni, da za določevanje koncentracije proteinov potrebujemo **UMERITVENO KRIVULJO**.

To pomeni, da za **znane koncentracije znanega proteina** izmerimo absorbance pri želeni λ .

- umeritvena krivulja ni linearna v celotnem območju
- pozorni moramo biti na izbiro znanega proteina za izdelavo umeritvene krivulje
- umeritvena krivulja mora biti narejena v ustreznem območju
- za izdelavo umeritvene krivulje uporabimo enake pogoje kot pri merjenju vzorca

UMERITVENA KRIVULJA

Kolorimetrične metode niso absolutne, kar pomeni, da za določevanje koncentracije proteinov potrebujemo **UMERITVENO KRIVULJO**.

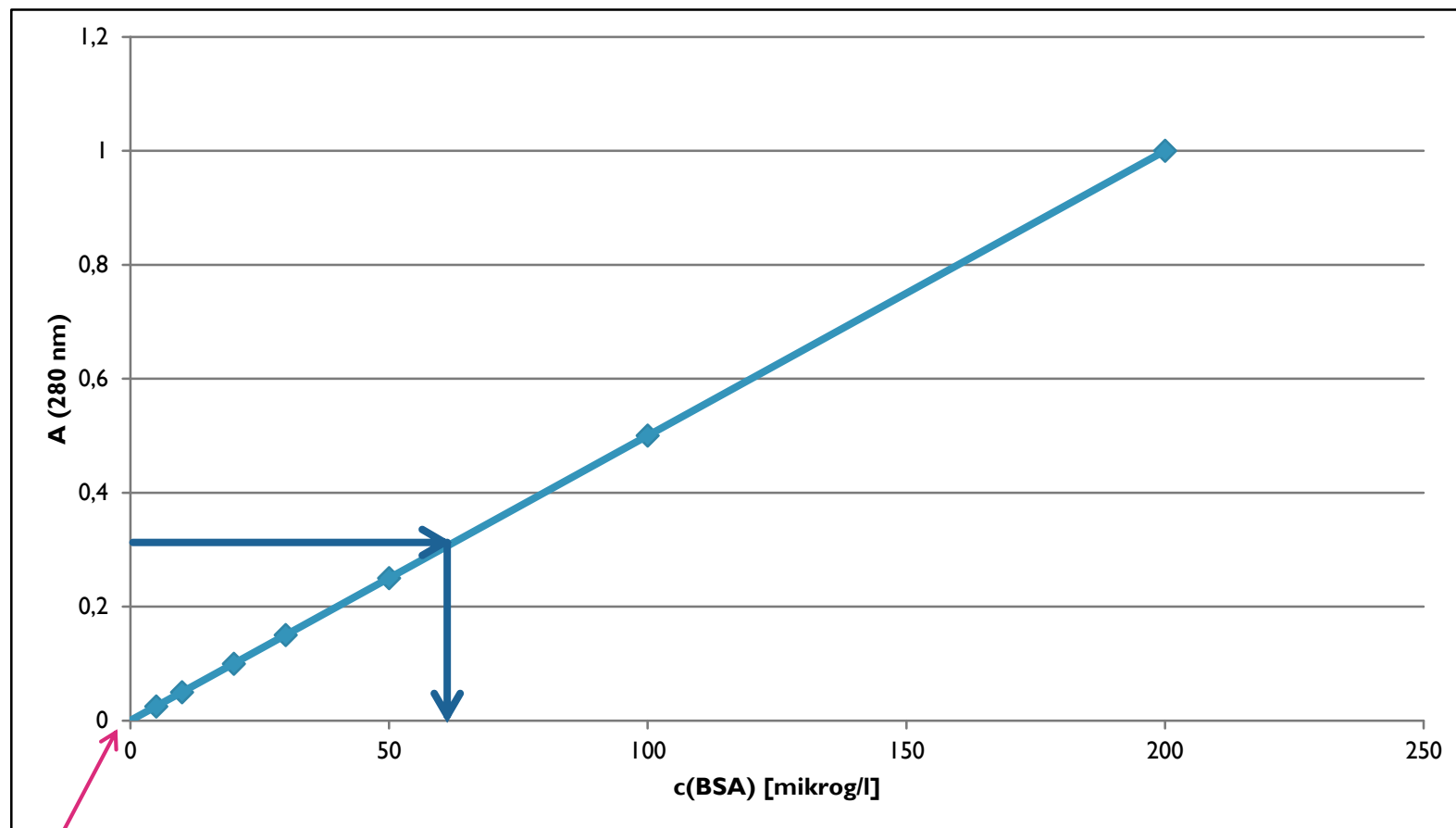


BSA = goveji serumski albumin

- Najpogosteje kot znan protein uporabimo BSA (angl. *Bovine serum albumin*).
- Idealna bi bila uporaba proteina, ki je čimbolj podoben našem (npr. če želimo v vzorcu določati koncentracijo protiteles IgG kot standard uporabimo znane koncentracije čistega IgG).
- Pazimo na ustrezno koncentracijsko območje!

C (BSA) [$\mu\text{g/ml}$]	A
5	0,025
10	0,05
20	0,1
30	0,15
50	0,25
100	0,5
200	1

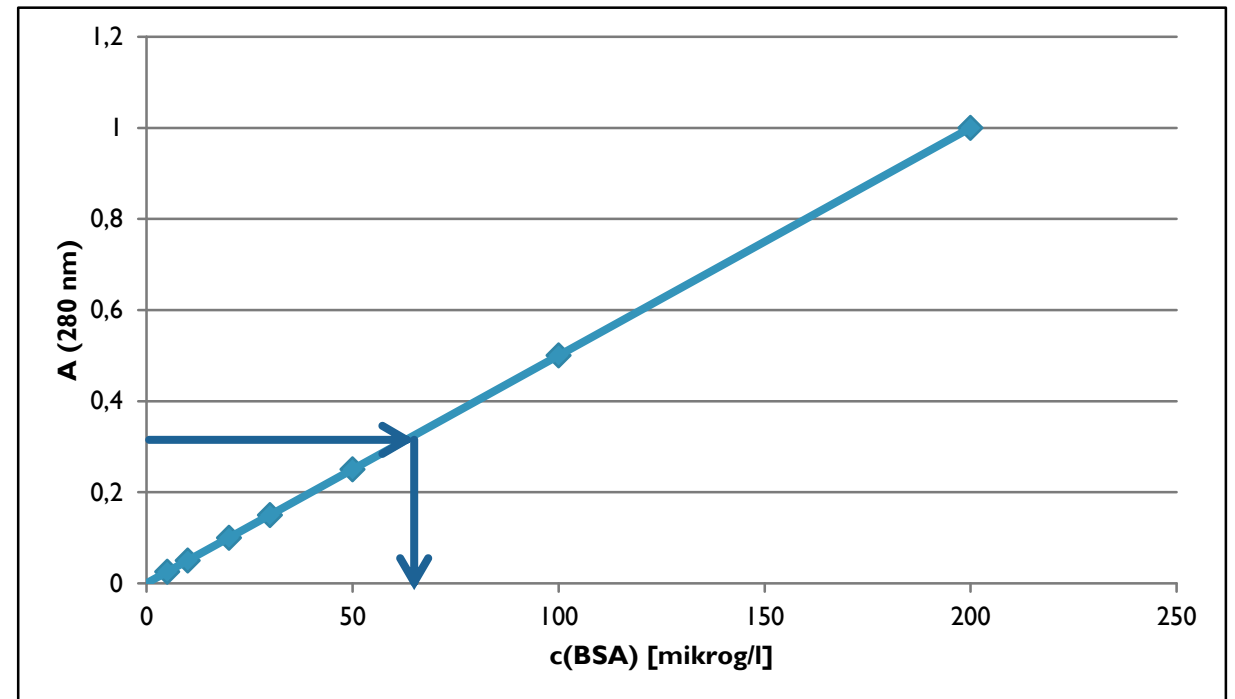
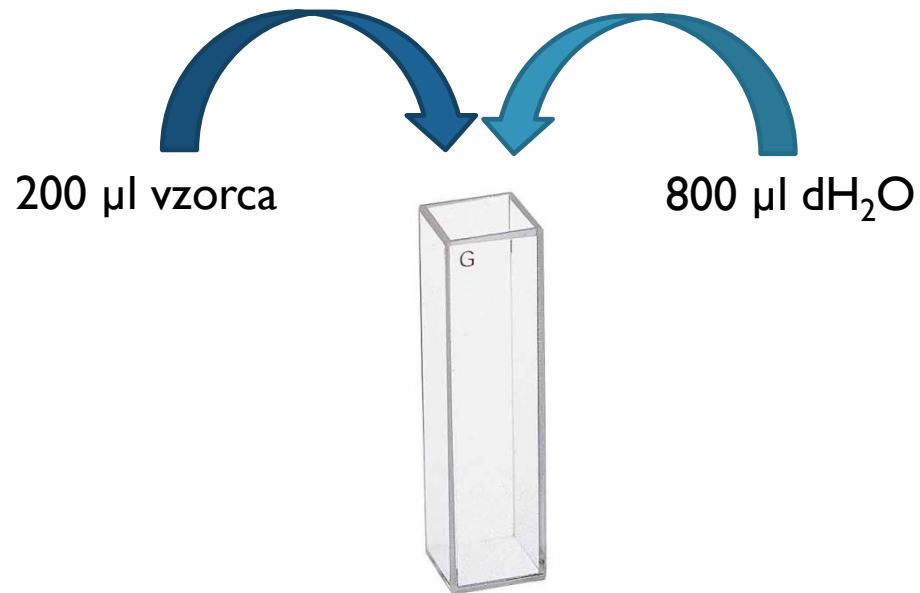
c(prot.) [$\mu\text{g/ml}$]	A
?	0,35



(0, 0)

ker če ni proteina, ni absorbance!!!

c(prot.) = 60 $\mu\text{g/ml}$

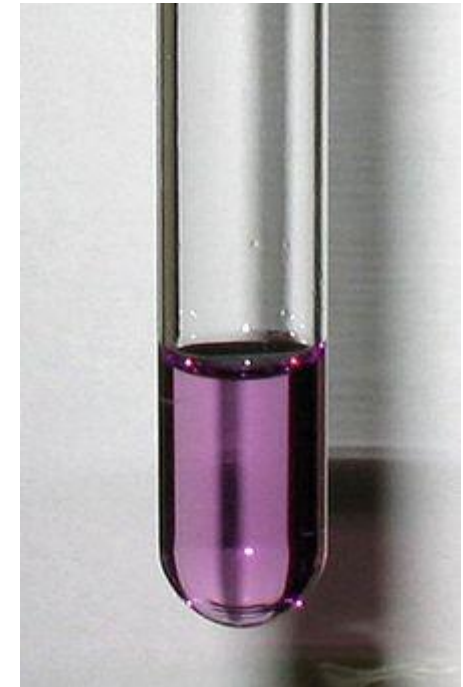
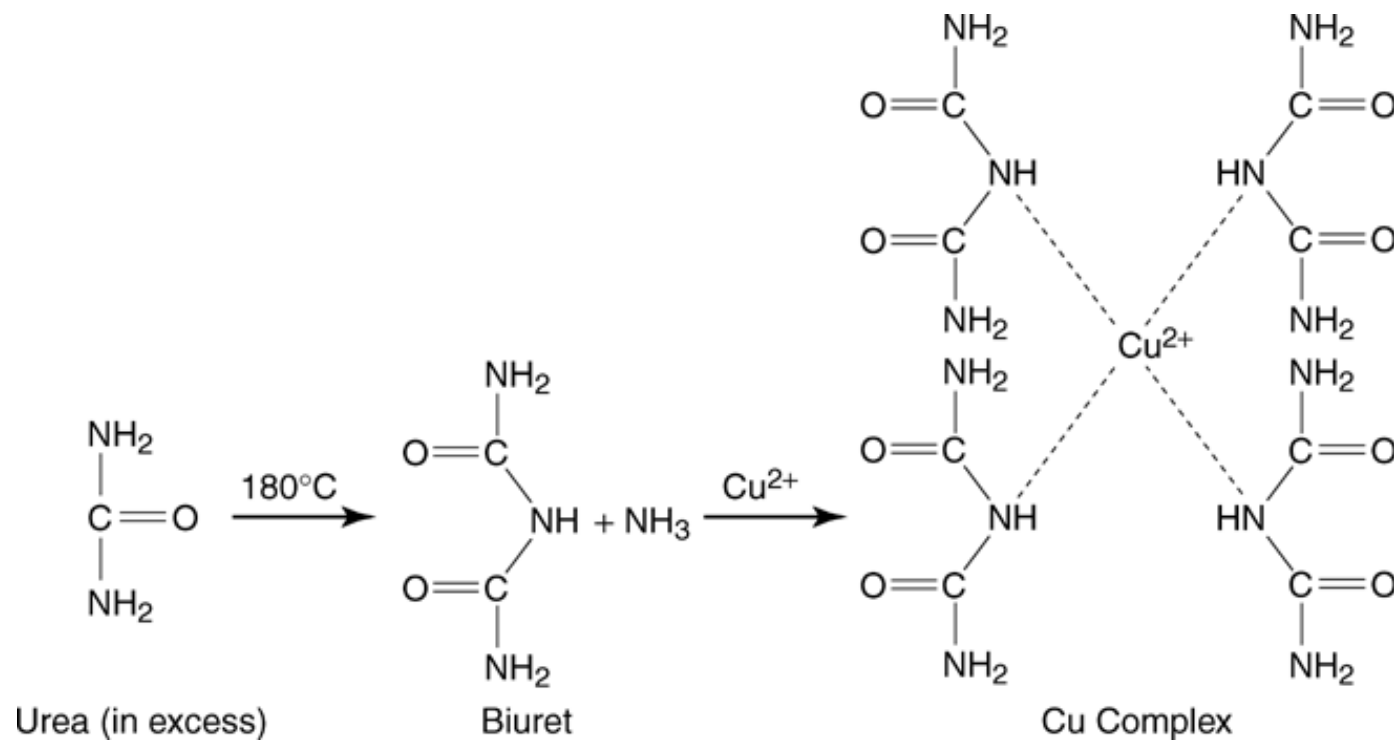


$c(\text{prot.}) = 60 \mu\text{g/ml}$

Če, da smo vzorec v kiveti redčili (5x redčenje), moramo to upoštevati pri podaji končnega rezultata! V tem primeru je končna koncentracija proteinov v našem vzorcu **300 µg/ml**.

BIURETSKA METODA

Protein + $\text{CuSO}_4 \longrightarrow$ vijolično obarvana snov



BIURETSKA METODA

KAKO DELUJE?

Metoda temelji na reakciji peptidne vezi z bakrom v bazičnem in v prisotnosti kalij-natrijevega tartrata, kar povzroči formacijo violičnega kompleksa.

MEJA DETEKCIJE?

5 – 160 mg/ml

PREDNOSTI?

- primerna metoda za vse proteine
- dobro ponovljiva

SLABOSTI?

- obupno slabo občutljiva metoda
- dolgotrajna priprava reagentov, slaba obstojnost (sveža priprava)
- vpliv drugih snovi v raztopini (urea...)
- deluje samo za večje od tripeptidov

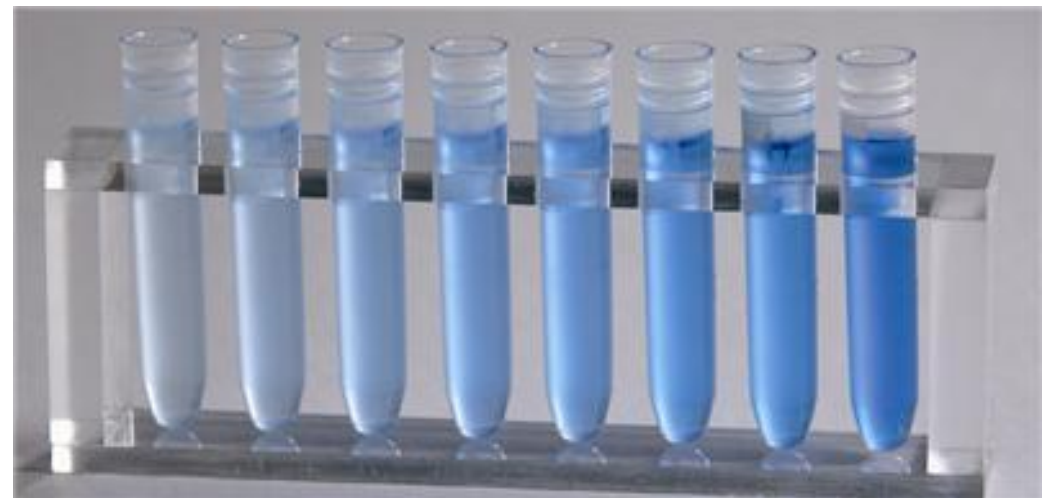
METODA PRIMERNA ZA VSE
PROTEINE, A PREVEČ SLABO
OBČUTLJIVA ZA RUTINSKO
UPORABO

LOWRIJEVA METODA

Protein + CuSO_4 + Folin-Ciocalteu r. \longrightarrow modro obarvana snov



$3\text{H}_2\text{O} \times \text{P}_2\text{O}_5 \times 13\text{WO}_3 \times 5\text{MoO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$
 $3\text{H}_2\text{O} \times \text{P}_2\text{O}_5 \times 14\text{WO}_3 \times 4\text{MoO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$



LOWRIJEVA METODA

KAKO DELUJE?

Podobno kot biuretska metoda temelji na reakciji med peptidno vezjo in bakrom, vendar redukcija Folin-Ciocalteujevega reagenta povzroči nastanek violečno obarvanega kompleksa.

MEJA DETEKCIJE?

2 – 1000 $\mu\text{g/ml}$

PREDNOSTI?

- primerna metoda za vse proteine
- občutljiva na širokem področju
- zelo občutljiva v primerjavi tudi z UV

SLABOSTI?

- metodo moti veliko snovi (citrat, cistein, DTT, EDTA, HEPES, merkaptoetanol, detergenti, fenol, Tricin, TRIS...)
- razkrajanje molibdenskega barvila
- nujna prisotnost tirozina

METODA JE ZELO OBČUTLJIVA, A JO MOTI VELIKO SNOVI, KI SE JIH UPORABLJA PRI IZOLACIJI ROTEINOV.

BRADFORDOVA METODA

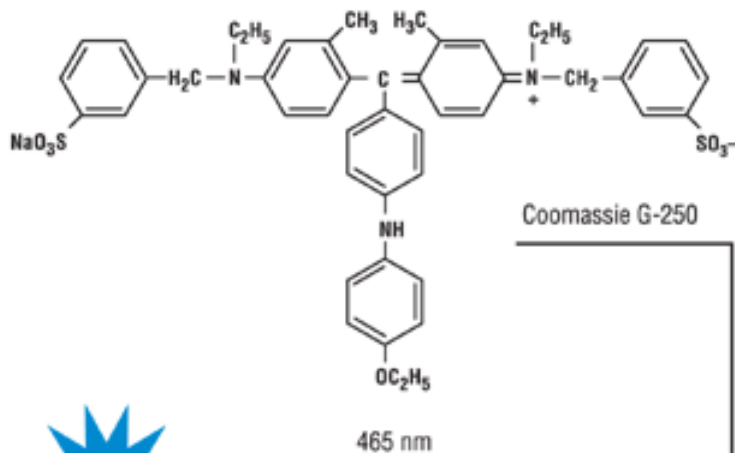
Bradfordina!



PROTEIN

Basic and Aromatic
Side Chains

+



Coomassie G-250

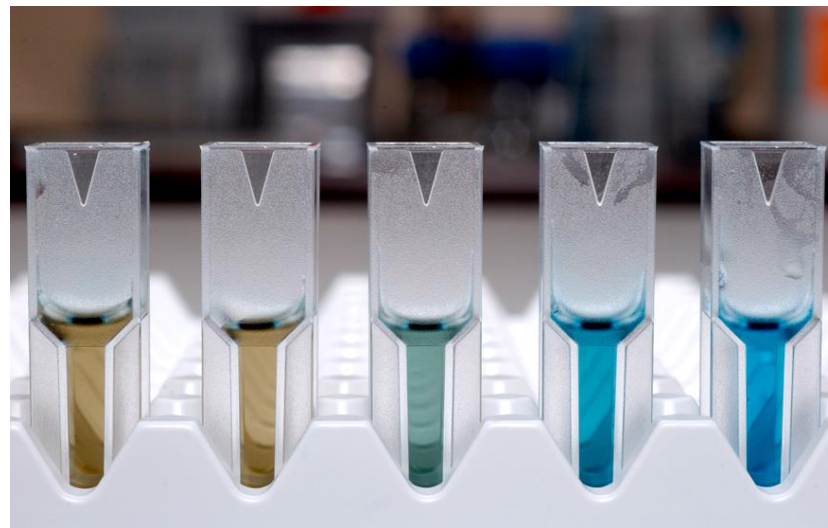
465 nm



A_{max} = 595 nm

Protein-Dye Complex

470 nm



595 nm

BRADFORDOVA METODA

KAKO DELUJE?

Metoda temelji na vezavi Coomassie Brilliant Blue (CBB) na proteine v kislem, saj se veže na pozitivno nabite (arginin, histidin, lizin) in aromatske aminokislino. Vezava povzroči spremembo absorpcijskega vrha CBB s 470 na 595 nm.

MEJA DETEKCIJE?

1 – 200 $\mu\text{g/ml}$

PREDNOSTI?

- hitra in poceni
- visoko specifična za proteine
- zelo občutljiva
- kompatibilna z mnogimi snovmi

SLABOSTI?

- nelinearnost, prekrivanje obeh spektrov

NAJPRIMERNEJŠA METODA ZA
OBČUTLJIVO DOLOČEVANJE
KONCENTRACIJE PROTEINOV

POTEK VAJE

- priprava umeritvene krivulje z znanimi koncentracijami BSA
- priprava vzorcev za meritve z Bradfordovo metodo
- merjenje absorbanca (595 nm) in določitev koncentracije proteinov v vzorcih