

Priimek in ime:.....smer študija:.....skupina:.....

Bradfordova metoda

(Teorija je v skriptih na straneh 53 – 55.)

Namen vaje: Spoznavanje kolorimetričnih metod za določanje proteinov v biokemiji, načrtovanje relativne analitske meritve v biološkem vzorcu in preverjanje tehnike pipetiranja z avtomatsko pipeto.

Uvod: Metode za določanje koncentracije proteinov so najbolj pogosto uporabljene metode v biokemijskih laboratorijih. Koncentracijo proteina lahko določimo z merjenjem absorbance pri 280 nm ali pa z različnimi kolorimetričnimi metodami. Biuretska metoda temelji na lastnosti peptidne vezi, da v alkalnem tvori obarvane komplekse z bakrovimi ioni, BCA in Folin-Lowry-jeva metoda temeljita na lastnosti proteinov, da v alkalnem reducirajo določene kovinske ione, Bradfordova metoda pa temelji (Dopolni!)

.....

.....

Potek dela:

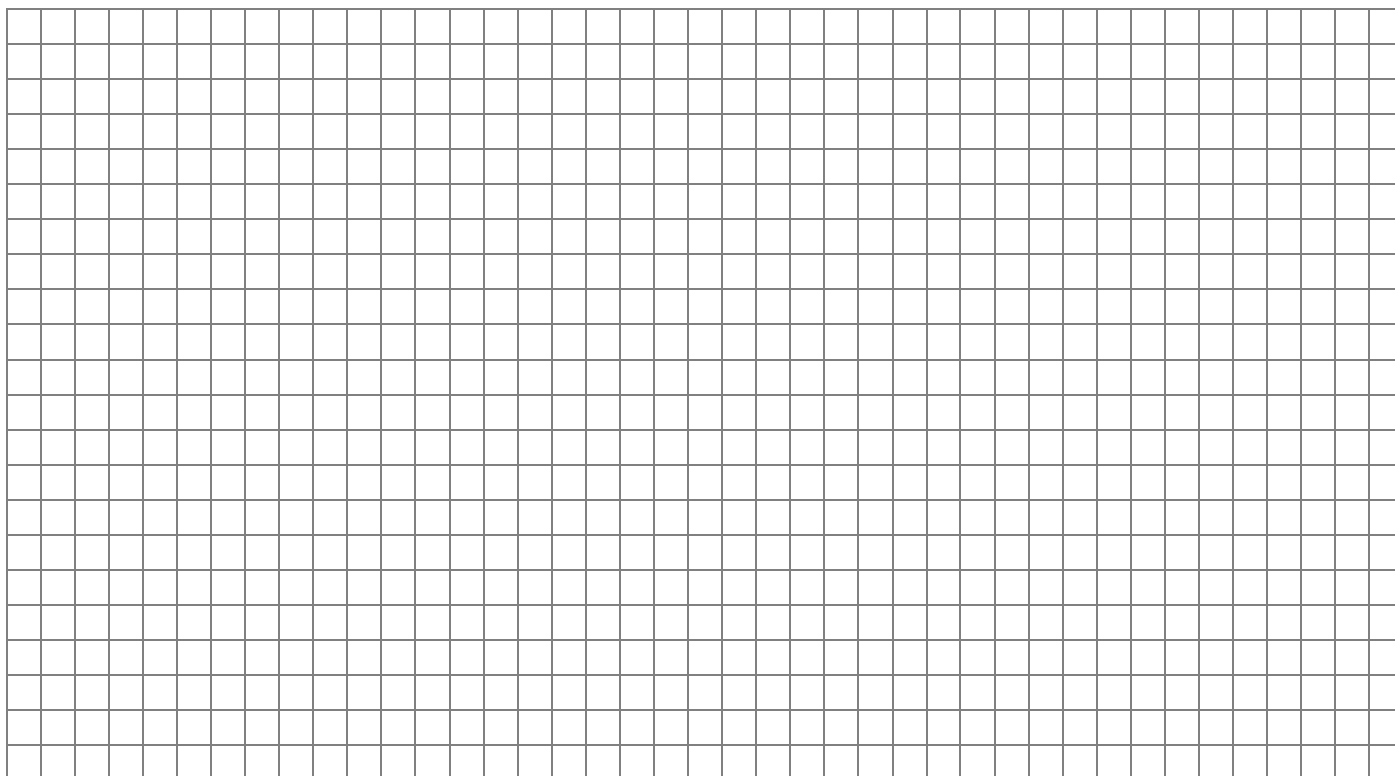
Za vsako točko na umeritveni krivulji in za vzorec naredi po dve paralelni meritvi!

1. Umeritvena krivulja:
Odpipetiraj 20, 50, 100 in 150 μL raztopine govejega serumskega albumina (BSA) v deionizirani vodi s koncentracijo 0,1 mg/mL in dopolni z deionizirano vodo do 0,2 mL.
2. Vzorec:
Odpipetiraj 100 in 200 μL raztopine proteina z neznano koncentracijo in dopolni z vodo do 0,2 mL.
3. Slep vzorec:
Odpipetiraj..... (Dopolni!)
4. V vse epruvete dodaj po 0,8 mL Bradfordovega barvnega reagenta, pomešaj, počakaj 5 minut in izmeri absorbanco pri 595 nm proti slepemu vzorcu.

Rezultati:

| št. vzorca | koncentracija vzorca v 0,2 mL | A_{595} | A_{595} | povprečna A_{595} |
|------------|----------------------------------|-----------|-----------|---------------------|
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |
| 6 | | | | |

Nariši umeritveno krivuljo in iz nje odčitaj koncentracijo proteina v vzorcu!



Odgovori na vprašanja:

1. Koncentracija proteina v vzorcu označenim s črko je
2. Komentiraj rezultat!

3. Kako bi določil koncentracijo proteina v:
 - a) brezbarvni mešanici proteinov
 - b) raztopini znanega čistega proteina
 - c) raztopini znanega čistega proteina, ki ne vsebuje aromatskih aminokislin
 - d) vzorcu, ki vsebuje ureo
 - e) vzorcu, ki vsebuje DTT
 - f) vzorcu, ki vsebuje klorofil
 - g) vzorcu, ki vsebuje EDTA
4. Katera od zgoraj navedenih meritev bi bila najbolj točna?