

Μέρος 3^ο: Προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης σε διάλυμα με τη μέθοδο Bradford-Στοιχεία θεωρίας

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης/ών σε ένα διάλυμα. Χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (Εικόνα 1), η οποία έχει αρνητικό φορτίο. Η χρωστική, στην ελεύθερή της μορφή έχει χρώμα κόκκινο και μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm. Όταν η χρωστική αλληλεπιδράσει σε όξινες συνθήκες με τα θετικά φορτία μιας πρωτεΐνης δίνει ένα σύμπλοκο μπλε χρώματος με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm. Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών έχει παραπλήσιο τρόπο αλληλεπίδρασης με τη χρωστική αυτή οπότε τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής είναι επαναλήψιμα.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- Γρήγορη (ο χρόνος που απαιτείται για την επώαση της αντίδρασης είναι 2')
- Ευαίσθητη (δεν απαιτείται μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης)

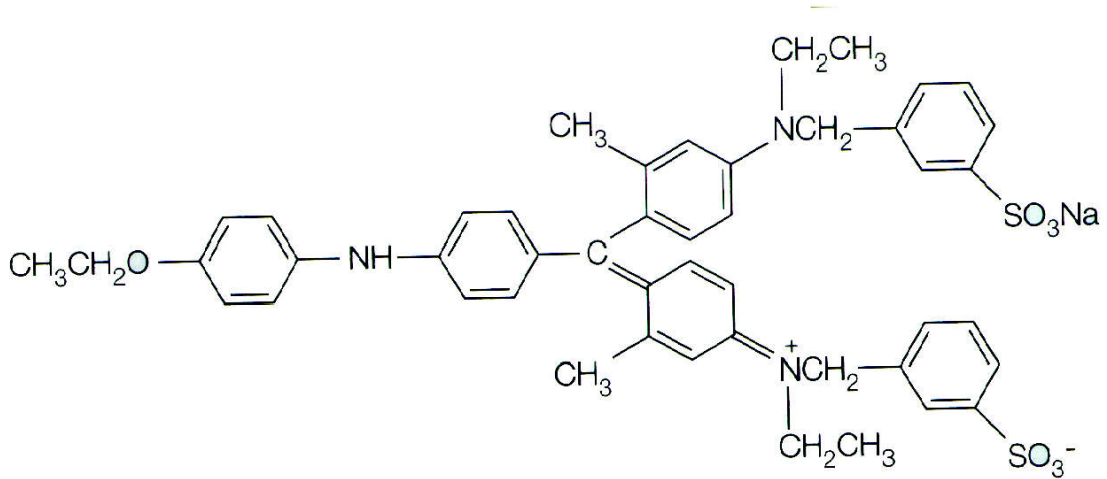
Ενώ στα μειονεκτήματα περιλαμβάνονται τα παρακάτω:

- Ο τρόπος αλληλεπίδρασης χρωστικής-πρωτεΐνης μπορεί να διαφοροποιείται από δείγμα σε δείγμα (εξαρτάται από τα αμινοξέα των πρωτεϊνών).
- Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο αυτή υφίστανται μη αντιστρεπτή μετουσίωση.

Γενικότερη θεωρία σχετικά με τη φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού και την εφαρμογή της για το υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών διαλυμάτων μπορείτε να βρείτε στα στοιχεία θεωρίας στο Μέρος 2^ο.

Για την εφαρμογή της μεθόδου Bradford απαιτείται ο σχεδιασμός και η χρήση καμπύλης αναφοράς. Η καμπύλη κατασκευάζεται ως εξής: Παρασκευάζεται μια σειρά διαλυμάτων με διαφορετικές αλλά γνωστές ποσότητες μιας πρότυπης πρωτεΐνης (Bovine Serum Albumin, Bovine γ -globulin). Στη συνέχεια μετريέται η απορρόφηση καθενός από τα δείγματα και κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της απορρόφησης A προς την ποσότητα πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη μπορεί να εκφράζεται είτε σε μονάδες μάζας (όπως μg ή mg), είτε σε μονάδες συγκέντρωσης (όπως μM ή mM). Η καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του αγνώστου δείγματος.

Θα χρησιμοποιήσετε τη μέθοδο Bradford για να βρείτε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης (α-λακταλβουμίνης) στο τυρόγαλα και στα κλάσματα που κρατήσατε από την κολώνα συγγένειας. Επίσης θα υπολογίσετε τη συγκέντρωση ενός αγνώστου δείγματος α-λακταλβουμίνης.



ΕΙΚΟΝΑ 1. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250

Προσομοίωση της μεθόδου (ή πως θα ήταν τα αποτελέσματά σας αν όλα γίνονταν σωστά!)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Φασματοφωτόμετρο
- Πλαστικές κυψελίδες (πολυστυρενίου)
- Πουάρ και πιπέτες Pasteur
- Πιπέτες μικρολίτρων
- Πλαστικοί σωλήνες μιας χρήσεως τύπου Eppendorf
- Στατώ για τους σωλήνες

Αντιδραστήρια

- Χρωστική Serva Blue G
- 1mg/ml αλβουμίνη από ορό βοδιού (BSA)
- 95% αιθανόλη
- 88% φωσφορικό οξύ
- Απαιτούμενη ποσότητα πρωτεΐνης για την εφαρμογή της μεθόδου: 25-200 μg/ml πρωτεϊνικού διαλύματος

Διαλύματα

- Stock διάλυμα Bradford

100ml 95% αιθανόλη

200ml 88% φωσφορικό οξύ

350mg χρωστική Serva Blue G

Σταθερό για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου. Από αυτό κάνετε αραιώση για την παρασκευή του επόμενου διαλύματος το οποίο προστίθεται στις αντιδράσεις σας.

- Διάλυμα Bradford

425ml νερό

15ml 95% αιθανόλη

30ml 88% φωσφορικό οξύ

30ml stock διάλυμα Bradford

Μετά την παρασκευή, το διάλυμα φιλτράρεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκούρο μπουκάλι. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αρκετές εβδομάδες αλλά πιθανόν να ξαναχρειαστεί φιλτράρισμα πριν τη χρήση του.

Χρήση της μεθόδου

1. Τοποθετήστε μια ποσότητα πρωτεϊνικού διαλύματος (μέγιστο 100μl) στο σωλήνα.
2. Προσθέστε ρυθμιστικό διάλυμα (ή απιονισμένο νερό) μέχρι να έχετε συνολικό όγκο 100μl.
3. Προσθέστε 1ml διαλύματος Bradford και ανακατέψτε καλά.
4. Καταγράψτε την A_{595} έπειτα από 2' (Read and Northcote,1981) αλλά πριν περάσει 1 ώρα (Bearden, 1978).

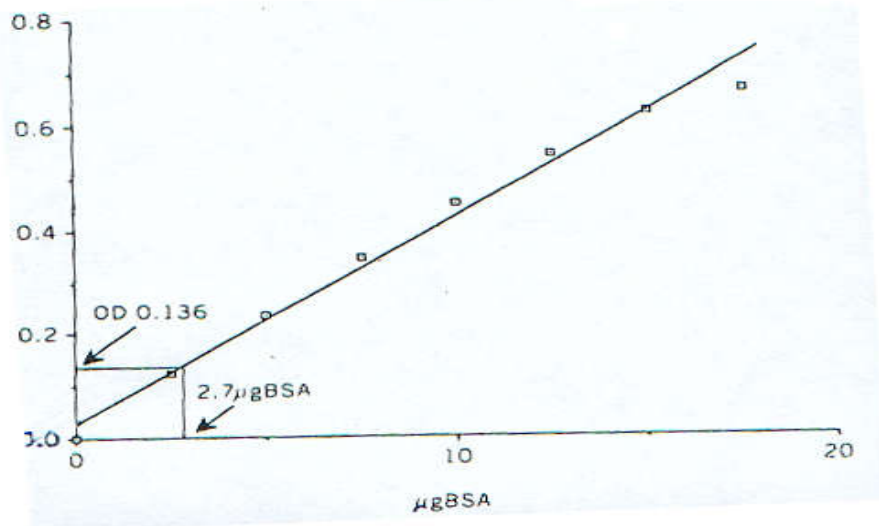
Καμπύλη αναφοράς

1. Μια καμπύλη αναφοράς από πρωτεϊνικό δείγμα γνωστής συγκέντρωσης που κατασκευάζεται ταυτόχρονα με τα διαλύματα άγνωστης συγκέντρωσης είναι απαραίτητη για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Πρέπει να μετρηθούν τουλάχιστον δυο δείγματα για κάθε συγκέντρωση (εάν θέλουμε να είμαστε ακριβείς, παίρνουμε το μέσο όρο των δυο απορροφήσεων για κάθε συγκέντρωση. Είναι προφανές πως οι τιμές των απορροφήσεων που αντιστοιχούν στην ίδια συγκέντρωση πρέπει να είναι παραπλήσιες!. Εάν χρησιμοποιηθεί η ίδια κυψελίδα πολυστυρενίου για τη μέτρηση όλων των δειγμάτων τότε πρέπει να μετρηθούν πρώτα τα δείγματα με το μικρότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο για την αποφυγή λανθασμένων μετρήσεων λόγω κακού καθαρισμού της κυψελίδας.
2. Επειδή το χρώμα που οφείλεται στο σχηματισμό του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής συνεχίζει να αναπτύσσεται, το διάλυμα Bradford πρέπει να προστίθεται σε όλα τα δείγματα (γνωστής και άγνωστης συγκέντρωσης) ταυτόχρονα. Αντίστοιχα ταυτόχρονα πρέπει να σημειώνεται και η απορρόφηση των δειγμάτων αυτών. Κάθε φορά που πρέπει να υπολογιστεί η συγκέντρωση ενός πρωτεϊνικού διαλύματος πρέπει να φτιάχνεται και καινούργια καμπύλη αναφοράς.
3. Ο πίνακας 1 δείχνει την οργάνωση των δεδομένων που απαιτούνται για την κατασκευή μιας καμπύλης αναφοράς. Είναι σημαντικό η καμπύλη να παραμένει γραμμική στην περιοχή των απορροφήσεων που δίνουν τα διαλύματα άγνωστης συγκέντρωσης, αλλιώς η απόκλιση μεταξύ της πραγματικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και αυτής που μετρείται μπορεί να είναι πολύ μεγάλη.

4. Αφού μετρηθεί η A_{595} , σχεδιάζεται η καμπύλη αναφοράς (εικόνα 2) με χρήση του μέσου όρου των τιμών απορρόφησης.
5. Η καμπύλη αναφοράς για τη μέθοδο Bradford παραμένει γραμμική συνήθως από 2,5 έως 15 μg BSA. Για το λόγο αυτό, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι απορροφήσεις των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης πρέπει να μην ξεφεύγουν από τα όρια αυτά και η ευθεία της καμπύλης πρέπει να σχεδιάζεται δίνοντας μεγαλύτερη έμφαση στα σημεία που βρίσκονται στο εσωτερικό παρά στα άκρα. Σε πολλές περιπτώσεις το ποσό της BSA (άξονας x) εκφράζεται ως συγκέντρωση (mg/ml).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Σύσταση των διαλυμάτων για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης και παραδείγματα μετρούμενων απορροφήσεων

# δείγματος	μg πρωτεΐνης	Πρότυπο διάλυμα BSA (1 mg/ml), μl	Ρυθμιστικό Αντίδρασης ή νερό	Διάλυμα Bradford ml	A_{595}
1	0	0	100	1	0,000
2	2,5	2,5	97,5	1	0,120
3	2,5	2,5	97,5	1	0,130
4	5	5	95	1	0,250
5	5	5	95	1	0,215
6	7,5	7,5	92,5	1	0,331
7	7,5	7,5	92,5	1	0,364
8	10	10	90	1	0,460
9	10	10	90	1	0,442
10	12,5	12,5	87,5	1	0,531
11	12,5	12,5	87,5	1	0,562
12	15	15	85	1	0,633
13	15	15	85	1	0,617
14	17,5	17,5	82,5	1	0,684
15	17,5	17,5	82,5	1	0,650
16	20	20	80	1	0,721
17	20	20	80	1	0,727



ΕΙΚΟΝΑ 2. Καμπύλη αναφοράς για τη μέθοδο Bradford

Πώς χρησιμοποιούμε την καμπύλη αναφοράς

Έστω ότι ένα πρωτεϊνικό διάλυμα άγνωστης συγκέντρωσης δίνει τις παρακάτω απορροφήσεις (παράλληλα μ' αυτές που παίρνουμε για την καμπύλη αναφοράς):

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Σύσταση των διαλυμάτων για την μέτρηση δειγμάτων και παραδείγματα μετρούμενων απορροφήσεων

# δείγματος (άγνωστο)	Δείγμα (μl)	Ρυθμισ. Διάλυμα ή νερό (μl)	Διάλυμα Bradford (ml)	A ₅₉₅	A ₅₉₅ M.O.	μg πρωτεΐνης	μg/μg (mg/ml)
1	5	95	1	0,059			
2	5	95	1	0,101	0,082	-	-
3	5	95	1	0,085			
4	10	90	1	0,135			
5	10	90	1	0,146	0,136	2,7	0,27
6	10	90	1	0,127			
7	50	50	1	0,700			
8	50	50	1	0,717	0,718	16,4	0,33
9	50	50	1	0,738			

Ο υπολογισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στο άγνωστο διάλυμα μπορεί να γίνει ως εξής:

1. Βρείτε το μέσο όρο στις τιμές της απορρόφησης για ένα συγκεκριμένο όγκο δείγματος, π.χ. για τα δείγματα #4-6, $(0,125+0,136+0,117)/3=0,136$
2. Χρησιμοποιώντας την καμπύλη αναφοράς βρείτε την ποσότητα της BSA που αντιστοιχεί στην απορρόφηση που έχετε μετρήσει, π.χ. για τα δείγματα #4-6, μια οριζόντια γραμμή στην $OD_{595}=0,136$ τέμνει την καμπύλη αναφοράς σε ένα σημείο που αντιστοιχεί σε 2,7μg. Εναλλακτικά ο υπολογισμός μπορεί να γίνει από την εξίσωση της ευθείας.
3. Υπολογίστε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης διαιρώντας την ποσότητα της πρωτεΐνης με τον όγκο του δείγματος, π.χ. για τα δείγματα #4-6, $2,7 \mu\text{g}/10\mu\text{l}=0,27\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($=0,27\text{mg}/\text{ml}$).
4. Παίρνοντας το μέσο όρο των δύο αποδεκτών τιμών έχουμε $(0,27+0,33)/2=0,30\text{mg}/\text{ml}$.

Πείραμα 1^γ: Προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης σε διάλυμα με τη μέθοδο Bradford

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Αναφέρονται λεπτομερώς στην προσομοίωση που βρίσκεται στη θεωρία.

Επιπλέον:

- Πρωτεϊνικά δείγματα που έχετε κρατήσει από τις ενότητες (A και B).
- Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης βοδιού (bovine serum albumin, BSA), 1 mg/ml σε νερό
- Δείγμα εμπορικής (καθαρής) α-λακταλβουμίνης άγνωστης συγκέντρωσης

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε σωλήνες EPPENDORF 1,5ml, προσθέστε νερό και πρωτεΐνες σύμφωνα με τις τρεις πρώτες στήλες του Πίνακα 3. Ο σωλήνας 1 χρησιμοποιείται ως τυφλό, ενώ οι σωλήνες 2–6 για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς. Ο συνολικός όγκος δείγματος-νερού είναι 100 μl. Εάν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος είναι πολύ χαμηλή (το δείγμα είναι πολύ αραιό), η ποσότητά του στην αντίδραση μπορεί να αυξηθεί μέχρι 100 μl (παραλείποντας στην περίπτωση αυτή, εντελώς το νερό). Ανάλογα, εάν η τιμή της απορρόφησης είναι πολύ υψηλή το δείγμα πρέπει να αραιωθεί πριν προστεθεί στην αντίδραση. Οι όγκοι για τα διαλύματα εκτός καμπύλης αναφοράς (δείγματα) απλά προτείνονται ενδεικτικά και αν οι τιμές απορρόφησης που προκύπτουν δεν σας ικανοποιούν πρέπει να τους προσαρμόσετε ανάλογα. Η χρωστική προστίθεται τελευταία στο διάλυμα. Μόλις την προσθέσετε ανακατέψτε το διάλυμα στο σωλήνα. **Μην περιμένετε να προσθέσετε χρωστική σε όλους τους σωλήνες για να το κάνετε αυτό!** Επωάζετε για 5' και παίρνετε την απορρόφηση στα 595nm. Η μέτρηση της απορρόφησης σε όλους τους σωλήνες θα πρέπει να γίνει μέσα σε μια ώρα.

Για λόγους οικονομίας χρόνου μετρήστε ένα δείγμα για κάθε συγκέντρωση και όχι δύο όπως το παράδειγμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Σύσταση των διαλυμάτων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και τη μέτρηση των δειγμάτων.

# σωλήνα	H ₂ O (μl)	BSA (μl)	Δείγμα (μl)	διάλυμα Bradford (ml)
1	100	0	-	1
2	95	5	-	1
3	92,5	7,5	-	1
4	90	10	-	1
5	87,5	12,5	-	1
6	85	15	-	1
7	95	-	Τυρόγαλα 5	1
8	0	-	ρυθμ/κο Α 100	1
9	50	-	ρυθμ/κο Β 50	1
10	95	-	α λακτ/νη (άγνωστο) 5	1

Πρέπει να τονιστεί ότι η καμπύλη αναφοράς για τη μέθοδο αυτή παραμένει ευθεία για ποσότητα BSA από 2,5 μg έως 15 μg περίπου. Εάν τα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης έχουν τιμές απορρόφησης έξω από το εύρος αυτό, το περιθώριο λάθους αυξάνεται σημαντικά. Γι' αυτόν ακριβώς το λόγο, κατά το σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς πρέπει να δίνεται περισσότερη έμφαση στα 'ενδιάμεσα' σημεία (δηλ. στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- R. Boyer, *J.Chem. Educ.* **68**, 430-432 (1991). “ Purification of Milk Whey a-Lactalbumin by Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography”.
- R. Boyer, **Concepts in Biochemistry**, (1999), Brooks/Cole (Pacific Grove, CA),pp. 102-105. Protein purification and analysis.
- K. Ebner, **Acct. Chem. Res.** **3**, 41-47 (1970). Biological role of a-Lactalbumin.
- R. Garrett and C. Grisham, **Biochemistry**, 2nd ed. (1999), W.B Saunders (Orlando, FL), pp.153-157. Protein techniques.
- L. Hall and P. Campbell, in **Essays in Biochemistry**, Vol.22, R. Marshall and K. Tipton, Editors (1988), Academic Press (London), pp. 1-26. A review on a-Lactalbumin.
- E. Harris and S. Angal, Editors, **Protein Purification Applications: A Practical Approach, Vol. 2** (1990), IRL Press (Oxford). An excellent book for undergraduates.
- C. Mathews, K. van Holde, and K. Ahern, **Biochemistry**, 3rd ed. (2000), Benjamin/Cummings (San Francisco), pp. 148-152. Isolation and purification of proteins.
- J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, and G. Belfrage, **Nature** **258**, 598-599 (1975). ‘Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation’.
- L. Stryer, **Biochemistry**, 4th ed. (1995), W. H. Freeman (New York), pp. 45-52. Isolation, purification, and characterization of proteins.
- D. Voet and J. Voet, **Biochemistry**, 2nd ed. (1995), John Wiley & Sons (New York), pp. 72-104. Study of proteins.
- D. Voet, J. Voet, and C. Pratt, **Fundamentals of biochemistry** (1999), John Wiley & Sons (New York), pp. 96-107. An introduction to protein purification and analysis.
- M. M. Bradford, **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**, *Analytical Biochemistry* **72**, **1976**, 248-254.
- S. M. Read and D. H. Northcote, **Minimization of Variation in the Response to Different Proteins of the Coomassie Blue G Dye-Binding Assay for Protein**, *Analytical Biochemistry* **116**, **1981**, 53-64.
- JC Jr. Bearden, **Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay**, *Biochim Biophys Acta* **533**, **1978**, 525-529.