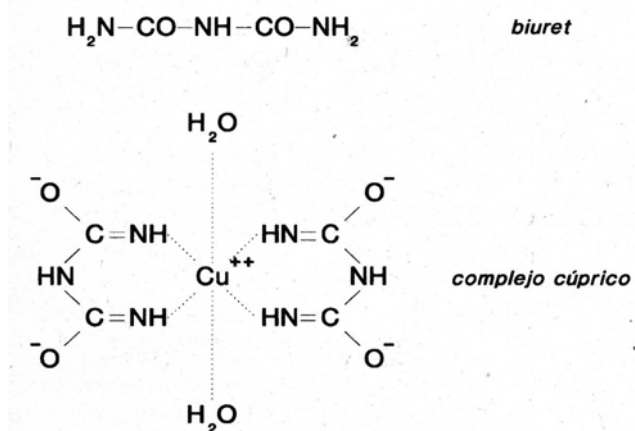


DETERMINACION DE PROTEINAS: METODO DE BRADFORD

INTRODUCCION

Existen varios métodos para determinar la concentración de proteínas de una muestra, tales como la determinación de la absorbancia a 280 nm, o mediante la formación de derivados coloreados de las proteínas, base de los métodos de BIURET o de LOWRY. En estos casos se forma un complejo coloreado de cobre con el enlace peptídico; en el método de Lowry, además del complejo anterior también se forma un derivado de las tirosinas que contribuye a la absorbancia total.



El método que vamos a utilizar durante estas prácticas se basa en un principio diferente: se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ac. fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este método depende, pues de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Su principal ventaja es que resulta más rápido y fácil de emplear que otros métodos alternativos, y más sensible que la medida de absorbancia a 280 nm.

Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se requiere la preparación de una curva de calibrado empleando una proteína patrón, que generalmente suele ser la seroalbúmina bovina.

OBJETIVO

Determinar la concentración de proteínas de leche de vaca desnatada.

MATERIAL

1- Reactivo de Bradford (“Muy importante”. No confundir el coomasie G-250 con el coomasie R-250).

Azul de coomasie G-250	5 mg
Etanol	2.5 ml
Ac. fosfórico	5 ml
agua	Hasta 50 ml

Mezclar en el orden indicado, disolver con agitación y a continuación filtrar.

2- Patrón de albúmina. Disolver 10 mg de albúmina bovina en 10 ml de agua destilada, con lo que tenemos una disolución madre con una concentración de 1 mg/ml.

METODO

1-Preparar la curva patrón de albúmina bovina en un rango desde 0 hasta 60 μg ; de tal manera que el volumen final en cada tubo sea de 300 μl . Mezclar para ello el volumen adecuado de la disolución madre de albúmina bovina de un 1 mg/ml y el correspondiente volumen necesario de agua, de acuerdo con la siguiente tabla.

μg (prot)	0	10	20	30	40	50	60
μl (alb)	0	10	20	30	40	50	60
μl (agua)	300	290	280	270	260	250	240
μl total	300	300	300	300	300	300	300

2-Preparación de tres diluciones de la muestra problema:

Hacer una dilución 1:20 de la leche comercial; a continuación realizar las diferentes diluciones de acuerdo con la siguiente tabla.

Leche diluida	A	B	C
V. leche (μl)	20	25	30
V. agua (μl)	280	275	270
V. total	300	300	300

Finalmente añadir 3 ml del reactivo de Bradford a todos los tubos; tanto a las diluciones que contienen la albúmina como a las que contienen la leche diluida. Agitar los tubos y a continuación proceder a la lectura de la absorbancia a 595 nm en el colorímetro.

RESULTADOS

1- Elaboración de la recta patrón. Para ello representar en el papel milimetrado adjunto la absorbancia de cada uno de los tubos que contenían albúmina bovina frente a la cantidad de proteínas correspondiente. Si se dispone de una calculadora con capacidad para hacer rectas de regresión, compruebe el coeficiente de correlación de la recta obtenida. En cualquier caso determine la pendiente de la recta.

2- Para las tres diluciones del problema, interpolar la absorbancia obtenidas sobre la recta representada para saber la cantidad de proteínas presentes en cada una de ellas. Alternativamente, haga el cálculo mediante la pendiente de la recta.

3- Teniendo en cuenta los volúmenes de muestra usados en cada caso y teniendo en cuenta la dilución realizada, calcúlese la concentración de proteínas en la muestra analizada. Dar el resultado en gramos de proteína por 100 ml de leche.