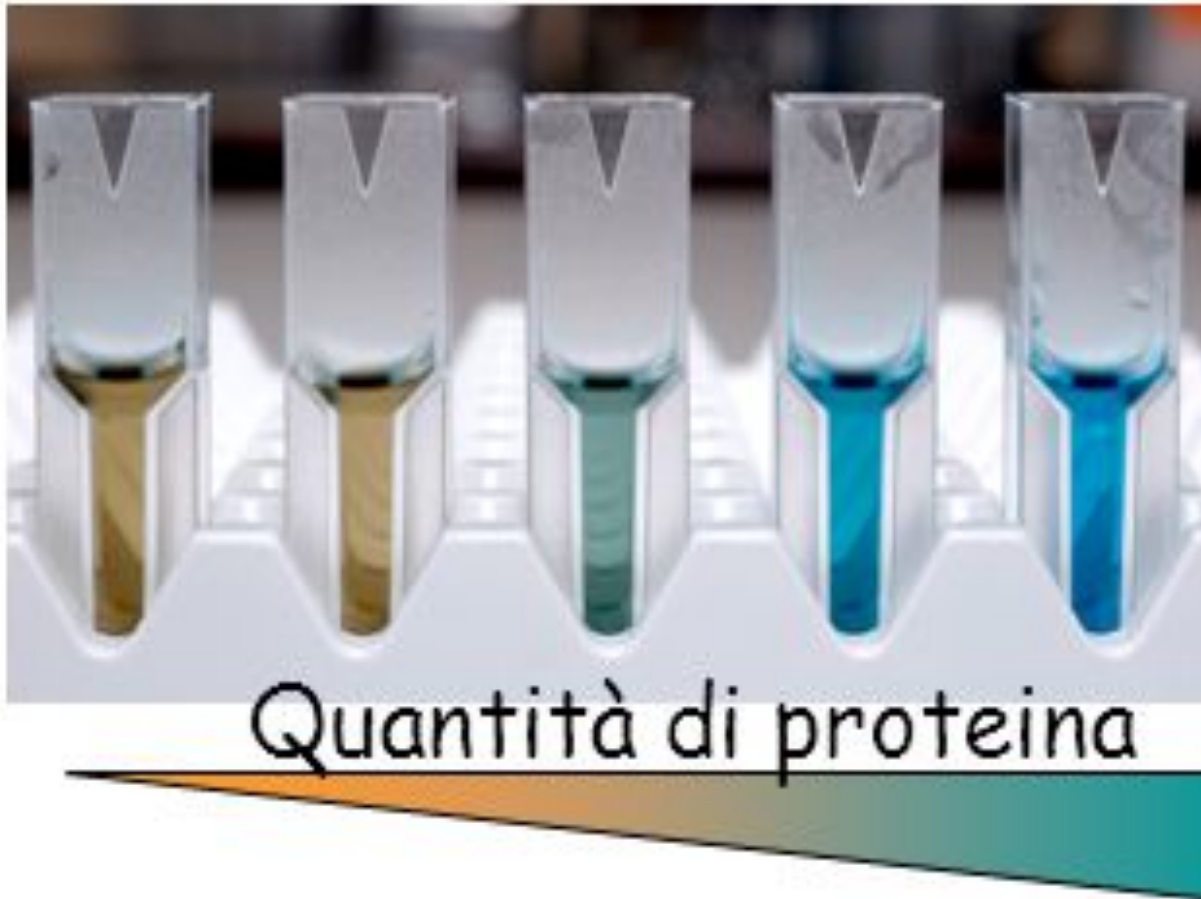
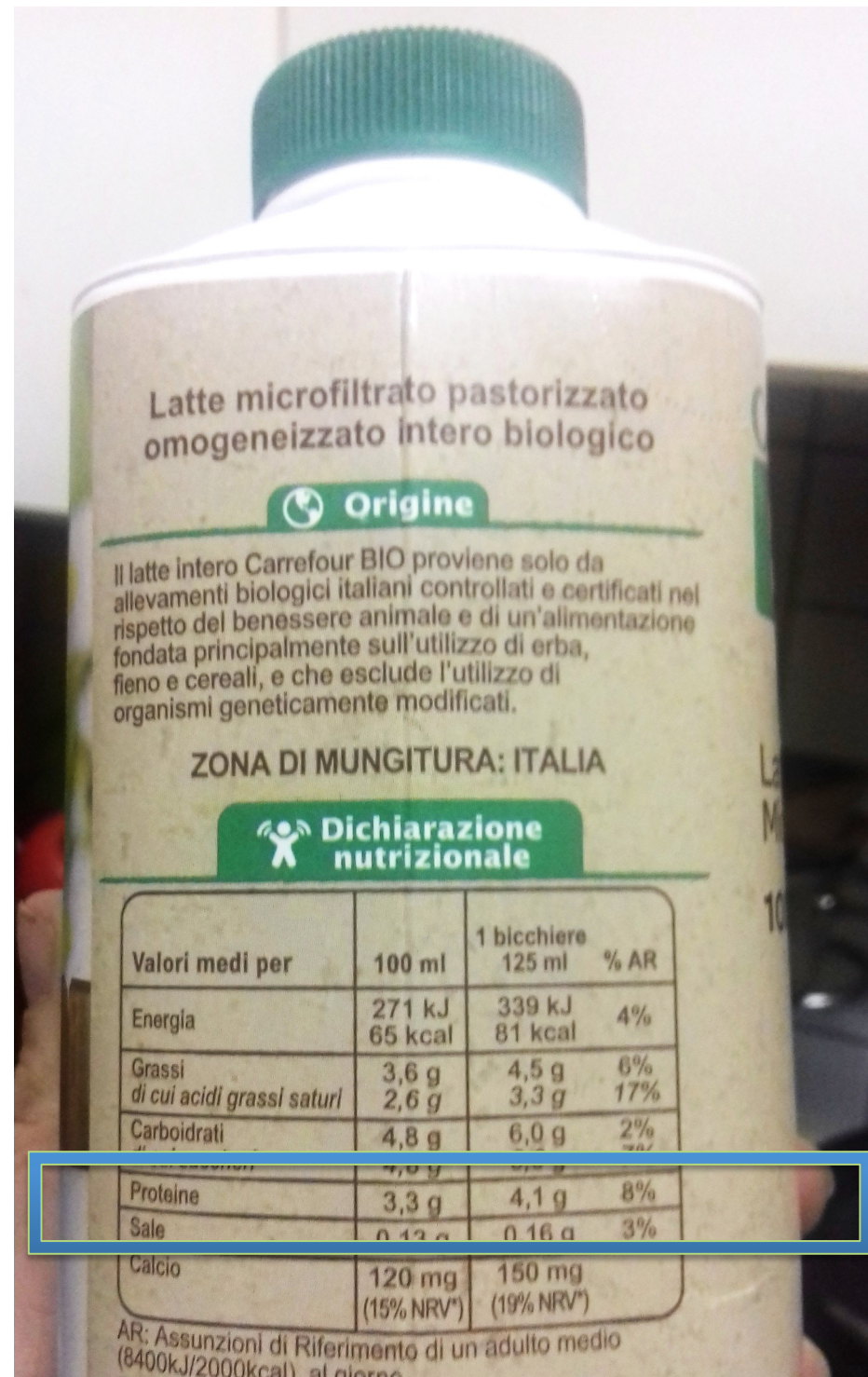


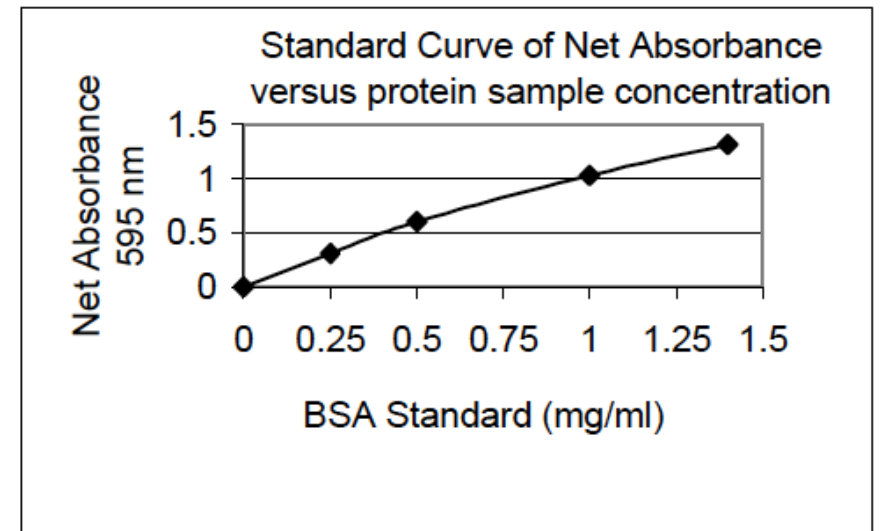
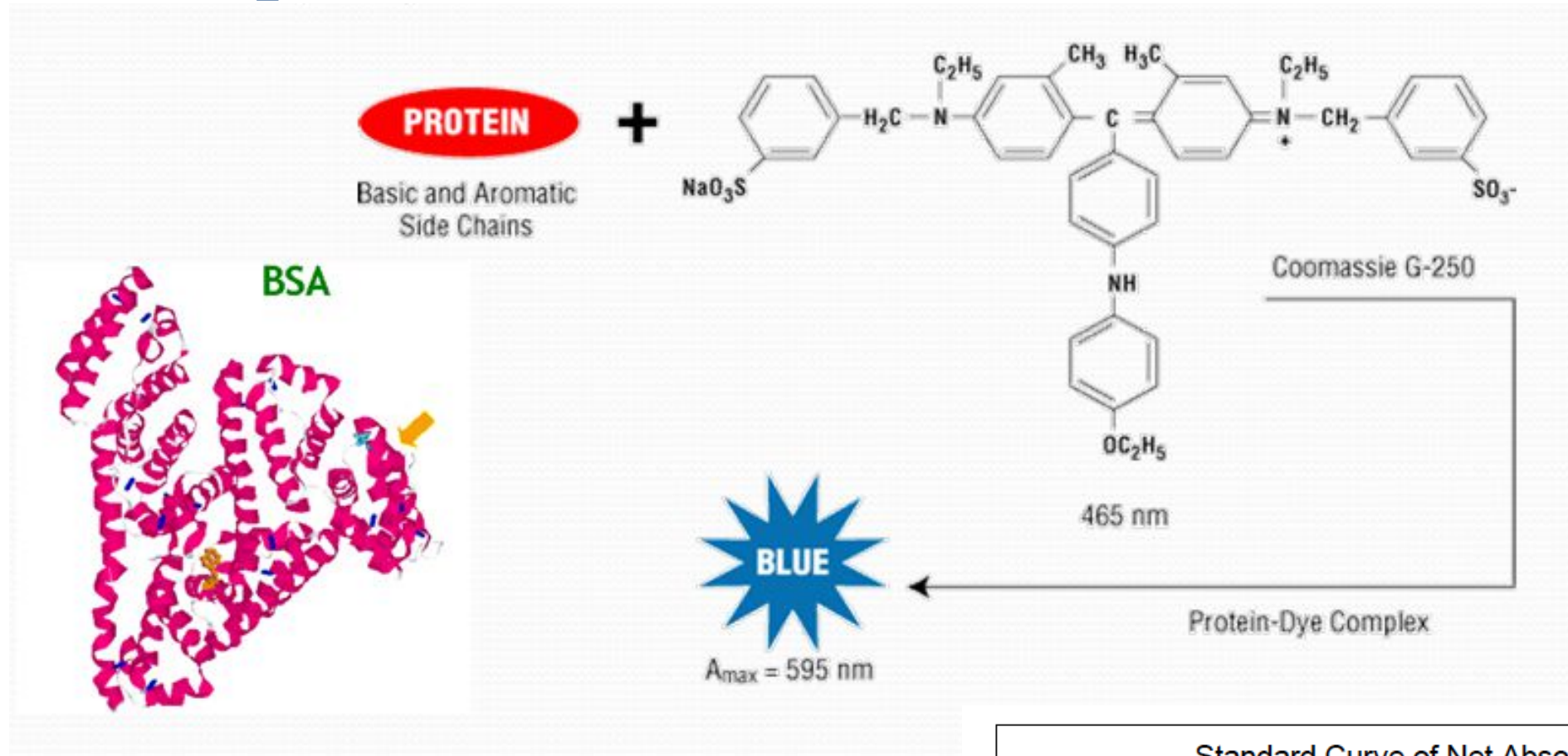
1. Quantificazione di proteine con Metodo di Bradford: esempio applicazione ad alimenti



2. Confronto con i dati riportati in etichetta



3. Principio metodo colorimetrico: reattivo di Bradford



4. Protocollo: allestimento di una retta di riferimento

Allestimento di una retta di taratura

- Operativamente si parte da una soluzione con una concentrazione 2 mg/ml di BSA e si preparano alcune diluizioni (utilizzare acqua bidistillata come diluente).
- Occorre preparare (in provette tipo eppendorf sulle quali sarà necessario indicare i valori delle concentrazioni di BSA!) 0.5 ml di ciascuna delle seguenti concentrazioni di BSA:
 - 1 mg/ml
 - 0.8 mg/ml
 - 0.5 mg/ml
 - 0.20 mg/ml
 - 0.10 ml/mg

Allestire utilizzando la tabella 1 uno schema della quantità in μl di soluzione di BSA concentrata e di diluente (acqua) per ciascuna diluizione.

Utilizzare la formula $C_1V_1=C_2V_2$ dove per esempio:

- $C_1 = 2 \text{ mg/ml}$
- $V_1 = x \text{ ml}$ di soluzione di BSA concentrata da prelevare
- $C_2 =$ la concentrazione voluta, es. 0.8 mg/ml
- $V_2 = 0.5 \text{ ml}$

Tabella 1

Concentrazione	Volume BSA concentrata (μl)	Volume di acqua (μl)
1.0		
0.8		
0.5		
0.2		
0.1		

- Per ciascuna diluizione trasferire ~~4~~ 33 μ l in un nuovo tubo contenente 1000 μ l (che equivale a 1 ml) del reagente colorante di Bradford, agitare per inversione e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente, trasferire in cuvetta.
- Si otterrà una serie di cuvette contenenti gli standard per costruire la retta di calibrazione (ricordarsi a quale concentrazione corrisponde ciascuna cuvetta!!!) più una cuvetta contenente solo il colorante e acqua, che indicheremo come BIANCO
- Leggere allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 595 nm le intensità di colorazione ottenute (ossia i valori di Δ assorbanza). I valori ottenuti saranno riportati nella tabella 2

Tabella 2

Conc. (mg/ml) (x)	Assorbanza 595nm (y)
1.0	
0.8	
0.5	
0.25	
0.1	

- Per l'elaborazione dei dati, utilizzando il computer, creare un grafico dove x=concentrazione in mg/ml e y=assorbanza, i punti sperimentali dovrebbero disporsi a definire una retta, i cui valori di pendenza ed intercetta (con il corrispondente coefficiente di correlazione) verranno estrapolati tramite l'uso di una calcolatrice scientifica (metodo dei minimi quadrati).
- La retta ottenuta (chiamata retta di calibrazione) ci permette di ottenere poi i valori di concentrazione dei nostri campioni come descritto qui di seguito.

Lettura della concentrazione dei campioni

1. Scegliere il campione da testare, formulare l'ipotesi scientifica e compilare la tabella 3.
2. Se pensate che ci siano tante proteine, diluire il campione in acqua bidistillata, preparando almeno 0.5 ml (che equivalgono a 500 μ l) di soluzione (NB: diluire 1:10 significa prendere 1 parte di campione da diluire in 10 parti totali, ossia + 9 parti di diluente e non + 10 parti di diluente! E' un errore frequente, soprattutto all'inizio, fate attenzione!)
3. Per ciascuna campione prelevare 33 μ l e porre in un nuovo tubo contenente 1000 μ l di colorante di Bradford (come per la retta di taratura!). Dopo 15' d'incubazione con il colorante, per ogni campione occorre misurare l'assorbanza 595 nm mediante l'uso dello spettrofotometro. Riportare i valore nella tabella 3.
4. L'assorbanza ottenuta sarà correlata a una concentrazione corrispondente tramite la retta di taratura: l'assorbanza (y) corrisponderà ad un valore di x concentrazione dedotto dall'equazione della retta. Ottenuti i valori di concentrazione, se necessario, moltiplicare per il fattore di diluizione per ottenere il valore di concentrazione di proteine nei campioni.

5. Protocollo: misura dei campioni incogniti

Lettura della concentrazione dei campioni

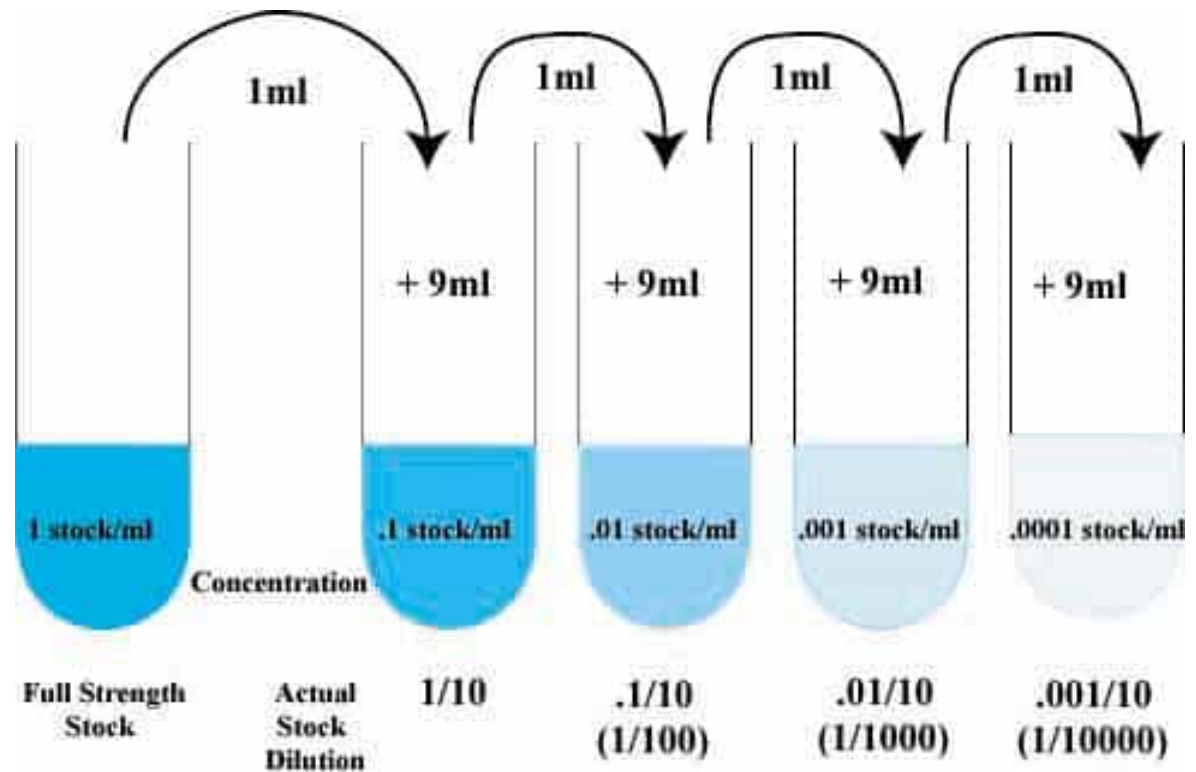
Scegliere il campione da testare, formulare l'ipotesi scientifica e compilare la tabella 3.

CAMPIONE	IPOTESI: CI SONO PROTEINE? QUANTE?	MISURA ASSORBANZA	VERIFICA SPERIMENTALE E QUANTIFICAZIONE

6. Se necessario diluizione dei campioni incogniti

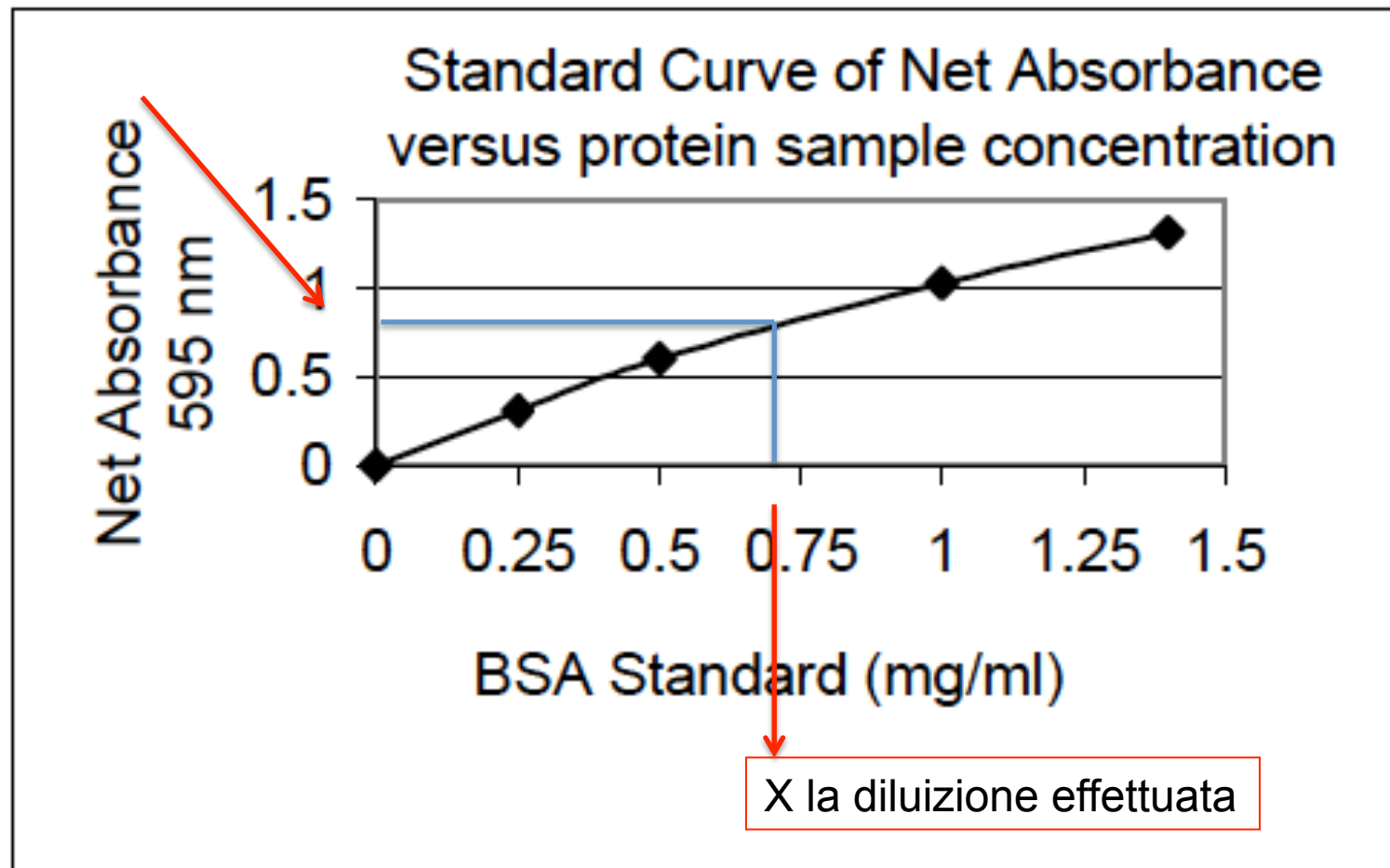
Se pensate che ci siano tante proteine, diluire il campione in acqua bidistillata, preparando almeno 0.5 ml (che equivalgono a 500 μ l) di soluzione (NB: diluire 1:10 significa prendere 1 parte di campione da diluire in 10 parti totali, ossia + 9 parti di diluente e non + 10 parti di diluente! E' un errore frequente, soprattutto all'inizio, fate attenzione!)

Per ciascuna campione prelevare 33 μ l e porre in un nuovo tubo contenente 1000 ml di colorante di Bradford (come per la retta di taratura!). Dopo 15' d'incubazione con il colorante, per ogni campione occorre misurare l'assorbanza 595 nm mediante l'uso dello spettrofotometro. Riportare i valore nella tabella 3.



7. Determinazione della concentrazione

L'assorbanza ottenuta sarà correlata a una concentrazione corrispondente tramite la retta di taratura: l'assorbanza (y) corrisponderà ad un valore di x concentrazione dedotto dall'equazione della retta. Ottenuti i valori di concentrazione, se necessario, moltiplicare per il fattore di diluizione per ottenere il valore di concentrazione di proteine nei campioni



8. Altri approcci: es. la determinazione del glucosio

Dosaggio del glucosio

Metodo colorimetrico per la determinazione di D-glucosio in cibi, bevande e altri materiali

Principle:

(glucose oxidase)



(peroxidase)

