

4. Oznaczanie stężenia białka metodą Bradforda

Białka należą do podstawowych biopolimerów wchodzących w skład komórki. Zmiany stężenia białek kontrolują procesy metaboliczne komórki. Oznaczenie stężenia białka umożliwia również określenie wartości energetycznej spożywczych produktów białkowych. Odczynnik Bradforda używany jest do określenia stężenia białka. Procedura oznaczenia stężenia białek wykorzystuje zjawisko tworzenia się kompleksu pomiędzy barwinkiem (Brilliant Blue G) a białkami. Kompleks białko-barwnik powoduje przesunięcie długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji barwnika z 465 do 595 nm. Wartość absorbancji jest proporcjonalna do stężenia białka. Jako wzorzec białka stosuje się albuminę bydlęcą. Liniowa zależność absorbancji od stężenia leży w zakresie stężenia białka 0,1-1,4 mg/mL.

Odczynniki i sprzęt:

1. Próbkę białka o nieznanym stężeniu (np. mleko)
2. Roztwór wzorcowy białka o stężeniu 1 mg/mL
3. Odczynnik Bradforda
4. 1% roztwór kwasu octowego
5. Probówki zwykłe szklane oraz wirówkowe
6. Pipety miarowe automatyczne: 20-200 μ l oraz 200-3000 μ l
7. Wirówka
8. Kuvety pomiarowe plastikowe
9. Spektrofotometr UV-Vis

Wykonanie doświadczenia:

1. Do próbki wirówkowej z 5 mL lekko ogrzanego mleka dodać powoli, mieszając, 2 mL 1% kwasu octowego. Wytrącony osad kazeiny odwirować przy 5000 RPM przez 5 min. Supernatant wykorzystać do ilościowego oznaczenia sumarycznej zawartości globulin i albumin w mleku.
2. Roztwór wzorcowy białka o znanym stężeniu początkowym (1 mg/mL) rozcieńczyć wodą destylowaną w taki sposób, aby otrzymać po 0,1 mL rozcieńczonych roztworów wzorca o stężeniach pokazanych w tabeli poniżej (kolumna 4).

Nr próbki	Objętość odczynnika Bradforda	Objętość roztworu białka	Stężenie roztworu białka
1	0,5 mL	0,1 mL (woda destylowana)	0 mg/mL
2	0,5 mL	0,1 mL (roztwór wzorca)	0,25 mg/mL
3	0,5 mL	0,1 mL (roztwór wzorca)	0,50 mg/mL
4	0,5 mL	0,1 mL (roztwór wzorca)	0,75 mg/mL
5	0,5 mL	0,1 mL (roztwór wzorca)	1,00 mg/mL
6	0,5 mL	0,1 mL (nieznana próbka)	X mg/mL

3. W 6 suchych probówkach umieścić po 0,5 mL odczynnika Bradforda i dodać jak najszybciej po 0,1 mL roztworu białka zgodnie z opisem umieszczonym w tabeli powyżej. Delikatnie wymieszać zawartość każdej próbki i inkubować w temperaturze pokojowej przez 20 min.
4. Po inkubacji, przy pomocy spektrofotometru UV-Vis, zmierzyć na płytce absorbancję próbek przy $\lambda=595$ nm. Nanosić 200 μ L roztworu do studzienki. Każde rozcieńczenie nanieść 2-krotnie na płytkę. Kompleks białko-barwnik jest trwały przez 60 minut. Absorbancja poszczególnych próbek powinna być zmierzona w jak najkrótszych odstępach czasu. Kuvety między pomiarami można płukać metanolem. Kuvety myje się zanurzając je na kilka godzin w 0,1 M roztworze HCl.
5. Na podstawie uzyskanych wyników, wykreślić krzywą wzorcową. Od wartości absorbancji dla każdej próbki należy odjąć wartość absorbancji próbki nr 1 (tylko odczynnik Bradforda). Z krzywej odczytać stężenie białka w nieznanej próbce (próbka nr 6). Określić sumaryczną zawartość globulin i albumin w mleku.

Zakres materiału:

Metody oznaczania stężenia białek, budowa i funkcje białek, wiązanie peptydowe, podział białek: fibrylarne, globularne, proste, złożone, struktury przestrzenne białek i oddziaływania, które je stabilizują