Università degli Studi di Teramo

Corso di Laurea in Biotecnologie

Metodologie Biochimiche – II Anno

ESERCITAZIONE 4 – Quantificazione delle proteine totali da lisato cellulare con il saggio Bradford

Data: 10/11/2026

Il reattivo di Bradford (blu brillante di Coomassie G-250) vira dal bruno-rossastro al blu a contatto con le proteine; lo spostamento di assorbimento da 465 nm a 595 nm è proporzionale alla concentrazione proteica e obbedisce alla legge di Lambert-Beer nell'intervallo lineare di lavoro.

Step 1: Costruzione di una retta di taratura con la BSA;

Step 2: misurazione dell'assorbanza del lisato cellulare e ne calcolo della concentrazione proteica per interpolazione. Questo valore è necessario per normalizzare i risultati di saggi funzionali successivi (es. attività enzimatica, Western blot) e per valutare l'efficienza della lisi cellulare.

Richiami Teorici

✎ **Domanda**

Qual è la legge di Lambert-Beer? Spiegare il significato fisico di ciascun termine.

In quale intervallo di concentrazione proteica si rispetta la linearità per il saggio di Bradford standard?

✎ **Domanda**

Descrivere il meccanismo d'interazione tra il blu di Coomassie G-250 e le proteine. Quale proprietà chimica dei residui amminoacidici è determinante? Perché la BSA viene scelta come proteina standard?

✎ **Domanda**

Che cosa si intende per “retta di taratura”? Cos'è il coefficiente di determinazione R^2 e quale valore minimo è richiesto per considerare accettabile la vostra curva di calibrazione? Come si ricava la concentrazione del campione incognito dall'equazione della retta?

Materiali e Strumenti

Soluzioni (conservate in ghiaccio):

- Reattivo Bradford (1x, pronto all’uso)
- Soluzione madre BSA (1 mg/mL in dH2O)
- Acqua distillata (dH2O)

Campione:

- Lisato cellulare chiarificato dall'Esercitazione 2 — surnatante ottenuto dopo centrifugazione

Strumentazione:

- Spettrofotometro UV-visibile (impostato a 595 nm)
- Ghiaccio e vaschetta portacampioni
- Micropipette (20, 200, 1000 µL) e puntali
- Eppendorf da 1,5 mL
- Agitatore vortex
- Cuvette in polistirene (l = 1 cm), compatibili con spettrofotometro a 595 nm

Sicurezza e Smaltimento dei Rifiuti

NORME DI SICUREZZA

- Il blu di Coomassie è un colorante: indossate sempre guanti e camice per tutta la durata dell'esercitazione.
- Il reattivo di Bradford può contenere metanolo (a seconda della formulazione): lavorate in ambiente ben ventilato.
- Evitate il contatto con la pelle e gli occhi. In caso di contatto, lavate immediatamente con abbondante acqua.
- Raccogliete tutti i rifiuti contenenti Coomassie nell'apposito contenitore dedicato. NON smaltire nel lavandino.
- Cuvette rotte: smaltire nell'apposito contenitore per materiali taglienti.
- Il campione mitocondriale è di origine biologica: trattarlo come rifiuto biologico a rischio (contenitore giallo).

1. Preparazione della retta di taratura

a) Preparazione degli standard

Partendo dalla soluzione madre di BSA 1 mg/mL, preparate la serie di diluizioni riportata nella Tabella 1 in Eppendorf etichettate (B, S1–S6). Il volume totale per ogni standard è 100 µL, completato con dH_2O.

Provetta	Stock BSA (µL)	dH_2O (µL)	[BSA] finale (µg/mL)	Quantità finale (µg)
Bianco (B)	0	100	0	0
S1	2	98	20	2
S2	5	95	50	5
S3	10	90	100	10
S4	20	80	200	20
S5	40	60	400	40
S6	100	0	1000	100

Tabella 1. Standard di BSA per la retta di taratura

b) Aggiunta del reattivo di Bradford

- Aggiungete 900µL di reattivo di Bradford (pronto all'uso) a ciascuna Eppendorf (B, S1–S6).
- Agitate al vortex per 3 secondi. Osservate il viraggio di colore: dal bruno-rossastro al blu.
- Incubate a temperatura ambiente per 5 minuti.

c) Misura dell'assorbanza a 595 nm

- Eseguite lo zero allo spettrofotometro utilizzando la cuvetta del bianco (B): si corregge così il colore di fondo del reattivo.
- Trasferite circa 800 µL di ciascuno standard (S1–S6) in una cuvetta pulita e misurate l'assorbanza a 595 nm.
- Annotate immediatamente i valori di A_{595} sul quaderno di laboratorio.

2. Preparazione e misura del campione

Il campione da quantificare è il lisato cellulare chiarificato ottenuto al termine dell'Esercitazione 2 (surnatante raccolto dopo centrifugazione a 14.000 × g del pellet cellulare lisato con tampone di lisi). Poiché la concentrazione proteica totale è ignota, è necessario eseguire una diluizione preliminare per rientrare nell'intervallo lineare della curva di taratura. Mantenete il campione in ghiaccio per tutta la durata dell'operazione.

a) Diluizione del campione

- Preparate una diluizione 1:5: pipettate 20 µL di campione + 80 µL di dH_2O in una Eppendorf pulita.

b) Aggiunta del reattivo e lettura

- Aggiungete 900µL di reattivo di Bradford alla provetta con il campione diluito.
- Agitate al vortex 3 secondi e incubate 5 minuti a temperatura ambiente (stesso tempo degli standard).
- Misurate l'A_{595} in triplicato: preparate 3 aliquote separate.
- Annotate i 3 valori di assorbanza nel riquadro sottostante*:*

Dati grezzi — campione

Replica 1 — A_{595} = _____

Replica 2 — A_{595} = _____

Replica 3 — A_{595} = _____

Media A_{595} = _____

DS = _____

CV% = _____

3. Elaborazione dei dati (esempio in aula, poi ognuno costruisce la sua sul report)

a) Costruzione della retta di taratura

- Riportate in un grafico l'A_{595} (asse y) in funzione della [BSA] in µg/mL (asse x).
- Eseguite la regressione lineare: aggiungete una linea di tendenza lineare, visualizzate l'equazione $y = mx + b$ e il valore di R^2.
- Verificate che $R^2 \geq 0{,}99$. In caso contrario, identificate i punti anomali e discutete con il docente.

Parametri della regressione lineare

Pendenza m = _____

Intercetta b = _____

R^2 = _____

b) Calcolo della concentrazione

Formula per il campione originale:

C (campione originale) = [(A_{595} − b) / m] × fattore di diluizione

dove b = intercetta, m = pendenza della retta di taratura.

Risultato:

- **Concentrazione proteica (campione diluito) =**
- **Concentrazione proteica (campione originale) =**
- **Media ± DS (triplicato) =**
- **CV% =**