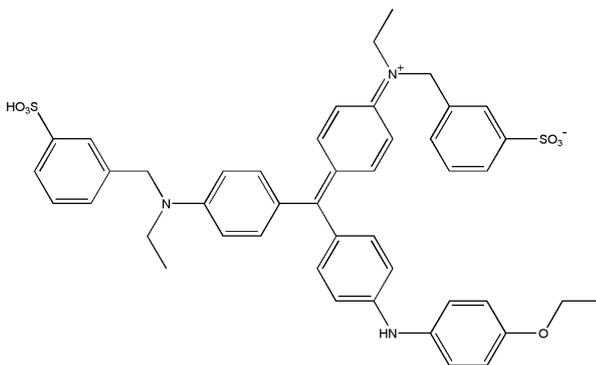


Dosaggio della proteina di fusione GST-GFP mediante saggio di Bradford

Una necessità che si presenta molto spesso in laboratorio è quella di dosare rapidamente la quantità di proteine presenti in un campione, sia esso un estratto cellulare, un siero, un omogenato di tessuto o un campione purificato. Questa esigenza viene soddisfatta abitualmente utilizzando tecniche che sfruttano la capacità delle molecole stesse o di loro derivati di assorbire la luce visibile o UV.

Il **saggio di Bradford** si basa sulla reazione delle proteine con il Coomassie Brilliant Blue G-250 (lo stesso colorante utilizzato per la rivelazione delle bande proteiche dopo l'elettroforesi su gel di poliacrilammide), un composto disulfonato del trifenilmetano di colore rosso-bruno. Questo colorante si lega ai residui di arginina (molto efficientemente), triptofano, tirosina ed istidina ed interagisce con le proteine, donando il suo elettrone libero a gruppi ionizzabili. Questa interazione destabilizza il *fold*ing proteico, esponendo regioni idrofobiche a cui le regioni non polari del blu di Coomassie si legano mediante interazioni di Van der Waals. Una volta legato, il colorante nella sua forma anionica diventa blu e se ne può seguire l'assorbanza a 595 nm che è proporzionale alla quantità di proteine.

Per ottenere una misura quantitativa dei campioni è necessario costruire una curva di taratura con una proteina standard a concentrazione nota. Normalmente si usa la albumina serica bovina (BSA), una proteina facilmente disponibile e poco costosa. Si esegue quindi inizialmente il saggio di Bradford su soluzioni di BSA a concentrazione nota (ad esempio da 1 a 10 µg/ml), se ne misura l'assorbanza a 595 nm e si mette in grafico in funzione delle corrispondenti concentrazioni. Si esegue poi il test per i campioni a concentrazione ignota. Una volta determinati i valori di assorbanza per questi, per interpolazione con la retta di taratura si ricavano le concentrazioni di proteina ignote. Nel saggio è importante includere almeno due campioni in cui non sono state aggiunte proteine, ma solo i vari reagenti. Questi campioni (detti *blank*) costituiscono il riferimento zero, cioè forniscono il valore di assorbanza che va sottratto da tutti i campioni perché non è dovuto alle proteine ma ai reagenti stessi.



Struttura del Coomassie Brilliant Blue G-250

Materiali

Soluzione standard BSA 0.1 mg/ml
Reattivo di Bradford
Acqua deionizzata
Campione GST-GFP

Procedura

Preparare i seguenti campioni in doppio:

	acqua (μl)	campione (μl)	reattivo Bradford (μl)	A_{595}	
Blank	800	-	200		
BSA 1 μg	800	10	200		
BSA 2 μg	800	20	200		
BSA 5 μg	750	50	200		
BSA 10 μg	700	100	200		
GST-GFP	800	5	200		
GST-GFP	800	10	200		

Mescolare accuratamente dopo l'aggiunta del reattivo di Bradford

Incubare a T ambiente 5 min

Leggere l'assorbanza a 595 nm

Costruire la retta di taratura (fare la media dei valori ottenuti per i punti in doppio) e determinare la concentrazione del campione GST-GFP

