

Determinação da Concentração da Amostra Complexa por Bradford

Laboratório Max Feffer

Curva Padrão BSA

- 1) Utilize cubetas bem limpas e translúcidas. É aconselhável, se não forem novas, enxaguá-las com etanol, antes das leituras.
- 2) Preparar uma solução estoque (1ug/uL) de BSA de alta pureza.
- 3) A partir desse estoque, prepare 4 tubos eppendorfs (1.5 mL), contendo as seguintes quantidades em µg (valor absoluto). **Obs:** Não pense em termos de concentração para construir a curva padrão. Para o preparo dos pontos de leitura, utilize o mesmo tampão que utilizou para suas amostras:
 - i) Branco (20uL 50mM AmBic)
 - ii) 2ug (2 uL + 18uL 50mM AmBic)
 - iii) 4ug (4 uL + 16uL 50mM AmBic)
 - iv) 6 ug (6 uL+ 14uL 50mM AmBic)
 - v) 8ug (8 uL + 12uL 50mM AmBic)
 - vi) 10ug (10 uL + 10uL 50mM AmBic)
- 4) Ligue o espectrofotômetro. Ajuste os parâmetros: ligue a lâmpada (W) e ajuste o equipamento para o comprimento de onda 595 nm.
- 5) Dilua o reagente de Bradford em H₂O milliQ (1V:4V). Adicione volume suficiente (980 uL) para volume final de 1 mL.
- 6) Deixe que a reação ocorra por 5 minutos e faça as leituras. Sempre utilize o palito para mexer a amostra no momento da leitura, pois o reagente de Bradford tende a precipitar.

Concentração da Amostra:

- 1) Dessalinize a amostra previamente à quantificação, e ressuspendá-a em 50mM de AmBic preparado em H₂O milliQ = [0.2 g em 50 mL]. **O TCT interfere nas leituras.**

- 2) Caso utilize 1 uL de amostra, acrescente 19 uL de 50mM de AmBic e adicione 980 uL de reagente de Bradford diluído. Deixe reagir por 5 min e faça a leitura após zerar o equipamento utilizando sempre duas cubetas de branco (deixe sempre a cubeta de trás para referência!). A leitura de Absorbância é sempre um valor relativo ao branco.
- 3) De acordo com a curva padrão do BSA do dia 22/03/2012, obtém-se a quantidade da amostra em (ug/uL), utilizando-se a seguinte fórmula:

Concentração da amostra (ug/uL) = [Abs_595 nm/0.0532].

Obs: Caso utilize 2 μ L ou mais de amostra para leitura, lembre-se de considerar esse valor nos cálculos.

Obs: O volume do Reagente de Bradford utilizado **não** deve ser considerado nos cálculos, ok?!