

Определение белка:

метод окрашивания белков при помощи *Coomassie G250* (метод Бредфорд (*Bradford Method*))

Описываемый в данной методике метод основан на связывании белками красителя Coomassie Brilliant Blue G-250 и получил известность как "Метод Бредфорд".¹

Механизм связывания Coomassie заключается во взаимодействии анионной формы красителя с белком.²

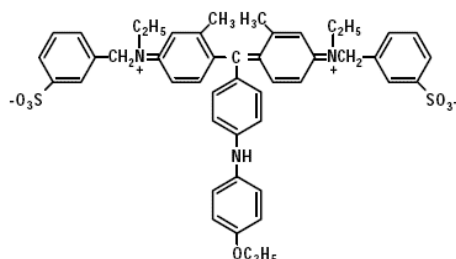


Рис. 1: Краситель Coomassie Brilliant Blue G-250

После добавления к раствору белка краситель связывается с белком. В результате связывания цвет красителя из красновато-коричневого становится голубым.

Связывание с белком осуществляется за счет электростатического взаимодействия сульфонильных групп красителя с аминокислотными остатками белка. Связывание красителя Coomassie происходит преимущественно с аргининовым остатком (Arg) и в меньшей степени с остатками гистидина (His), лизина (Lys), тирозина (Tyr), триптофана (Trp) и фенилаланина (Phe).

Силы Ван-дер-Ваальса и гидрофобное взаимодействие также принимают участие в связывании красителя с белком.

Количество связей, образуемых между Coomassie и белком, зависит от количества положительно заряженных групп, расположенных в молекуле белка. Считается, что 1.5-3 молекулы красителя связываются одной положительно заряженной группой.³

Исходный кислый раствор Coomassie имеет максимум поглощения при длине волны 465 нм. После связывания с белком и изменения окраски максимум поглощения смещается к 595 нм.

На связывание красителя с белком влияет присутствие детергентов^{4,5,6}, в то время, как целый ряд обычно применяемых в биологических манипуляциях реагентов не влияет на процесс образования окраски.

Таблица 1. Список реагентов, совместимых с процедурой окрашивания белков Coomassie Brilliant Blue G-250 по методу Бредфорд

Acetate, 0.6 M	Earle's salt solution	Phenol, 5%
Acetone	Formic acid, 1.0 M	Phosphate, 1.0 M
Adenosine, 1 mM	Fructose	PIPES, 0.5 M
Amino Acids	Glucose	Polyadenylic acid, 1 mM
Ammonium sulfate, 1.0 M	Glutathione	Polypeptides (MW<3000)
Ampholytes, 0.5%	Glycerol, 99%	Pyrophosphate, 0.2 M
Acid pH	Glycine, 0.1 M	rRNA, 0.25 mg/ml
ATP, 1 mM	Guanidine-HCl	tRNA, 0.4 mg/ml
Barbital	Hank's salt solution	total RNA, 0.30 mg/ml
BES, 2.5 M	HEPES buffer, 0.1 M	SDS, 0.1%
Boric acid	KCl, 1.0 M	Sodium phosphate
Cacodylate-Tris, 0.1 M	Malic acid, 0.2 M	Streptomycin sulfate, 20%
CDTA, 0.05 M	MgCl ₂ , 1.0 M	Triton X-100, 0.1%
Citrate, 0.05 M	Mercaptoethanol, 1.0 M	Tricine
Deoxycholate, 0.1%	MES, 0.7 M	Tyrosine, 1 mM
Dithiothreitol, 1 M	Methanol	Thymidine, 1 mM
DNA, 1 mg/ml	MOPS, 0.2 M	Tris, 2.0 M
EDTA, 0.1 M	NaCl, 5 M	Urea, 6 M
EGTA, 0.05 M	NAD, 1 mM	Vitamins
Ethanol	NaSCN, 3 M	
Eagle's MEM	Peptones	

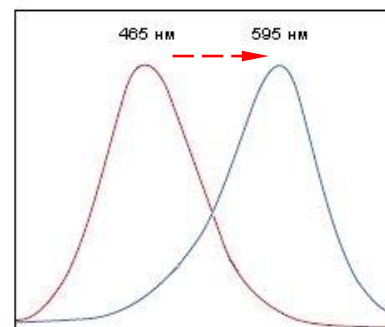


Рис. 2: Сдвиг максимума поглощения после связывания Coomassie с белком

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Compton, S.J. and Jones, C.G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **151(2)**, 369-374.
- Tal, M., Silberstein, A. and Nusser, E. (1980). Why does Coomassie Brilliant Blue® interact differently with different proteins? *J. Biol. Chem.* **260**, 9976-9980.
- Boccaccio, G.L. and Quesada-Allue, L.A. (1989). Interference of sodium dodecyl sulfate in the Bradford assay for protein quantitation. *An. Asoc. Quim. Argent.* **77(1)**, 79-88.
- Carroll, K. and O'Kennedy, R. (1988). Interference effects from Nonidet P-40 and urea in the Bradford protein assay. *Biochem. Soc. Trans.* **16(3)**, 382-383.
- Friedenauer, S. and Berlet, H.H. (1989). Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Anal. Biochem.* **178(2)**, 263-268.

Инструкция к набору *Coomassie G250* (метод Бредфорд)

Реактивы, входящие в набор, позволяют произвести около 250 определений (в зависимости от типа кюветы, в которой производится измерение) или 500 определений в варианте с 96-луночным планшетом.

Состав набора:

Реагент **Coomassie G250**.....50 мл

Бычий сывороточный альбумин (БСА), 10 мг/мл.....1 мл

Условия хранения: **Реагент Coomassie G250: +4 °С, БСА: -20 °С**

Введение

Набор рассчитан на проведение измерения белка в двух вариантах: *стандартный* и *планшетный*.

Измерения проводятся при длине волны 595 нм.

Входящий в набор БСА позволит построить калибровочный график, но следует учитывать, что разные белки отличаются по своим возможностям связывать краситель Coomassie. Эти отличия складываются из различий в размерах белка и аминокислотном составе. Поэтому, используя калибровочный график на основе БСА, следует измеряемый белок может отличаться от БСА со всеми вытекающими последствиями.

Подготовка стандартных разведений БСА

Следуйте рекомендациям по разведению БСА, приводимым в Таблице 2 и 3.

Таблица 2. Подготовка разведений для диапазона концентраций 100-1000 мкг/мл

№ (разведения готовятся в 2мл пробирке)	Объем добавляемого разводителя (обычно, дист. вода), мкл	Объем и концентрация добавляемого раствора БСА, мкл	Конечная концентрация БСА, мкг/мл
1	1800 мкл	200 мкл, р-р БСА 10 мг/мл	1000 мкг/мл
2	1900 мкл	100 мкл, р-р БСА 10 мг/мл	500 мкг/мл
3	1950 мкл	50 мкл, р-р БСА 10 мг/мл	250 мкг/мл
4	1800 мкл	200 мкл, р-р БСА 1 мг/мл из пробирки 1	100 мкг/мл
5	1900 мкл	100 мкл, р-р БСА 1 мг/мл из пробирки 1	50 мкг/мл
6	1950 мкл	50 мкл, р-р БСА 1 мг/мл из пробирки 1	25 мкг/мл

Таблица 3. Подготовка разведений для диапазона концентраций 2.5-50 мкг/мл

№ (разведения готовятся в 2мл пробирке)	Объем добавляемого разводителя (обычно, дист. вода), мкл	Объем и концентрация добавляемого раствора БСА, мкл	Конечная концентрация БСА, мкг/мл
1	1800 мкл	200 мкл, р-р БСА 10 мг/мл	1000 мкг/мл
2	1800 мкл	200 мкл, р-р БСА 1 мг/мл из пробирки 1	100 мкг/мл
3	1900 мкл	100 мкл, р-р БСА 1 мг/мл из пробирки 1	50 мкг/мл
4	1950 мкл	50 мкл, р-р БСА 1 мг/мл из пробирки 1	25 мкг/мл
5	1800 мкл	200 мкл, р-р БСА 100 мкг/мл из пробирки 2	10 мкг/мл
6	1900 мкл	100 мкл, р-р БСА 100 мкг/мл из пробирки 2	5 мкг/мл
7	1950 мкл	50 мкл, р-р БСА 100 мкг/мл из пробирки 2	2.5 мкг/мл

Проведение измерений

Пробирочный вариант

(в этом варианте измерения растворы смешиваются в 1.5 мл пробирках и затем содержимое пробирок переносится в кювету спектрофотометра для измерения или проводится измерение непосредственно в пробирках на соответствующем спектрофотометре. Количество смешиваемых реагентов могут быть пропорционально изменены исходя из объемов кюветы)

A. Стандартный протокол (диапазона концентраций 100-1000 мкг/мл)

1. Внесите в заранее подписанные пробирки по 800 мкл стандартных разведений БСА (номера разведений с 1 по 6, таблица 2) или образец с неизвестной концентрацией.
2. Внесите в пробирку, подписанную как "0" или "Контроль" 800 мкл дист. воды или того раствора, в котором проводится измерение образцов.
3. Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента **Coomassie**.
4. Перемешайте содержимое пробирок на вортексе.
5. Инкубируйте пробирки 5 мин при комнатной температуре (более подробные рекомендации смотрите в разделе **Дополнительная информация**).
6. Установите спектрофотометр на длину волны **595 нм**.
7. Измерьте значение поглощения раствора из пробирки "0" или "Контроль" и нормируйте это значение как нулевую точку.
8. Проведите измерения стандартных разведений (начинайте измерения с минимальной концентрации) и образца.
9. Используя полученные значения при измерении стандартных разведений, постройте стандартную кривую и с ее помощью рассчитайте концентрацию белка в образце.

B. Стандартный протокол (диапазона концентраций 2.5-50 мкг/мл)

1. Внесите в заранее подписанные пробирки по 800 мкл стандартных разведений БСА (номера разведений с 2 по 7, таблица 3) или образец с неизвестной концентрацией.
2. Внесите в пробирку, подписанную как "0" или "Контроль" 800 мкл дист. воды или того раствора, в котором проводится измерение образцов.
3. Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента **Coomassie**.
4. Перемешайте содержимое пробирок на вортексе.
5. Инкубируйте пробирки 5 мин при комнатной температуре (более подробные рекомендации смотрите в разделе **Дополнительная информация**).
6. Установите спектрофотометр на длину волны **595 нм**.
7. Измерьте значение поглощения раствора из пробирки "0" или "Контроль" и нормируйте это значение как нулевую точку.
8. Проведите измерения стандартных разведений (начинайте измерения с минимальной концентрации) и образца.
9. Используя полученные значения при измерении стандартных разведений, постройте стандартную кривую и с ее помощью рассчитайте концентрацию белка в образце.

Вариант измерений в 96-луночном планшете

A. Протокол для 96-луночного планшета (диапазона концентраций 100-1000 мкг/мл)

1. Внесите в лунки планшета по 150 мкл стандартных разведений БСА (номера разведений с 1 по 6, таблица 2) или образец с неизвестной концентрацией.
2. Внесите в лунку планшета, которая будет выполнять роль контроля, 150 мкл дист. воды или того раствора, в котором проводится измерение образцов.
3. Добавьте в каждую лунку планшета по 75 мкл реагента **Coomassie**.
4. Поместите планшет на 20 сек на шейкер.
5. Снимите планшет с шейкера и инкубируйте пробирки 5 мин при комнатной температуре (более подробные рекомендации смотрите в разделе **Дополнительная информация**).
6. Установите ридер на длину волны **595 нм** (более подробные рекомендации смотрите в разделе **Дополнительная информация**).
7. Измерьте значение поглощения лунок и вычтите из полученных значений величину поглощения в лунке, выполняющей роль контроля.
8. Используя полученные значения при измерении стандартных разведений, постройте стандартную кривую и с ее помощью рассчитайте концентрацию белка в образце.

B. Протокол для 96-луночного планшета (диапазона концентраций 2.5-50 мкг/мл)

1. Внесите в лунки планшета по 150 мкл стандартных разведений БСА (номера разведений с 2 по 7, таблица 2) или образец с неизвестной концентрацией.
2. Внесите в лунку планшета, которая будет выполнять роль контроля, 150 мкл дист. воды или того раствора, в котором проводится измерение образцов.
3. Добавьте в каждую лунку планшета по 75 мкл реагента **Coomassie**.
4. Поместите планшет на 20 сек на шейкер.

5. Снимите планшет с шейкера и инкубируйте пробирки 5 мин при комнатной температуре (более подробные рекомендации смотрите в разделе **Дополнительная информация**).
6. Установите ридер на длину волны **595 нм** (более подробные рекомендации смотрите в разделе **Дополнительная информация**).
7. Измерьте значение поглощения лунок и вычтите из полученных значений величину поглощения в лунке, выполняющей роль контроля.
8. Используя полученные значения при измерении стандартных разведений, постройте стандартную кривую и с ее помощью рассчитайте концентрацию белка в образце.

Дополнительная информация

Отличие в белках и как это сказывается на измерениях при помощи реагента Coomassie

Все имеющиеся на сегодняшний день методики по измерению концентрации белка в той или иной степени зависят от нескольких параметров:

- молекулярный вес (для измерения белков с молекулярным весом меньше 3000 Да лучше воспользоваться методом Лоури)
- аминокислотная последовательность
- изоэлектрическая точка
- наличие и структура дополнительных цепей или групп

Для получения максимально точного результата по измерению концентрации того или иного белка желательно в качестве контроля использовать именно этот белок с заранее известной концентрацией. Величина возможных отличий при измерении разных белков может составлять в среднем $\pm 40\%$.

Измерение адсорбции при другой длине волны

В случае, если измерение при длине волны 595 нм по каким-либо причинам не возможно, можно провести измерение на другой длине волны в интервале от 570 до 610 нм. Измерение при другой длине волны изменит чувствительность метода, но все равно позволит получить результат.

Влияние температуры и времени на величину адсорбции

Процесс связывания реагента **Coomassie** зависит от температуры и времени. С повышением температуры скорость связывания увеличивается, что приводит к повышению значения поглощения. То же самое происходит при продолжительном времени инкубации. Поэтому, при проведении измерений, старайтесь соблюдать одни и те же условия измерений – одно и то же время инкубации (обычно, 5 мин) и приблизительно тот же температурный режим.

При длительной инкубации (>40мин) начинает происходить образование нерастворимого комплекса белка с красителем. Измерение такого образца становится невозможным.

Отмывка кюветы после измерения

В процесс измерения краситель связывается со стеклом, образуя голубую пленку. Удалить связавшийся краситель можно этанолом. Налейте 96%-ный этанол в кювету, встряхните и оставьте кювету на несколько минут. Вылейте этанол и повторите процедуру еще несколько раз. Для удаления остатков красителя можно воспользоваться детергентами, например, детергент 7X.

Линейность результатов

Измерение величины адсорбции в широком диапазоне концентраций белка не имеет линейного характера. Для получения линейного участка приходится ограничиваться определенными диапазонами концентраций.

Используя различные соотношения количества раствора белка к количеству реагента Coomassie можно получить линейный участок практически к любому диапазону, но данные вариации не рассматриваются в данном описании и могут быть испробованы Вами самостоятельно.