

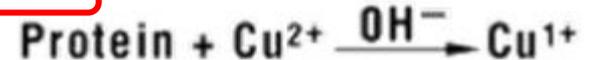
# COLORAZIONI

## METODO BCA

Molto simile alla colorazione di Lowry, ma basato sull'acido **bicinconinico** e utilizzabile su micropiastra.

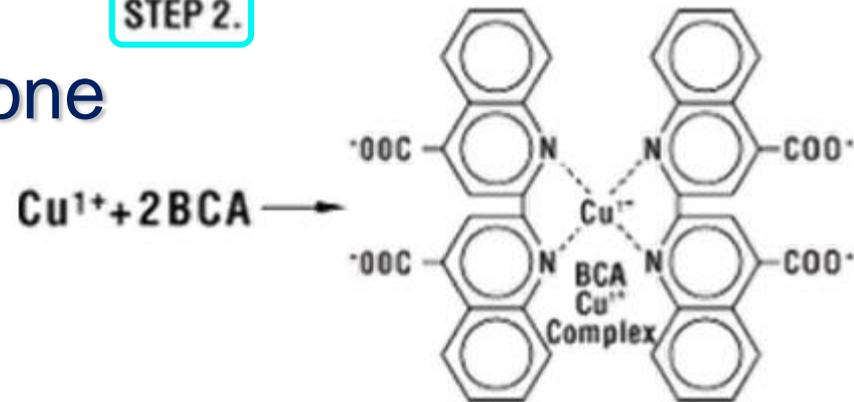
In ambiente **alcalino**  $\text{Cu}^{2+}$  è ridotto a  $\text{Cu}^{1+}$  dalle molecole proteiche.

STEP 1.



Due molecole di BCA chelano uno ione  $\text{Cu}^{1+}$  e a tale interazione è associato lo sviluppo del colore viola, con un massimo di assorbimento a **562 nm**.

STEP 2.



Fortemente dipendente dalle temperature di lavoro.

# INTERFERENTI NEL METODO BCA

| <b>Substance</b>          | <b>Compatible Conc.</b> | <b>Substance</b>       | <b>Compatible Conc.</b> |
|---------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| NP-40                     | 5.0%                    | Glucose**              | 10 mM                   |
| Emulgen                   | 1.0%                    | EDTA                   | 10 mM                   |
| Hepes                     | 100 mM                  | Sodium Chloride        | 1.0 M                   |
| <b>DTT</b>                | <b>1 mM</b>             | NaOH                   | 0.1 M                   |
| Guanidine•HCl             | 4.0 M                   | Ammonium Sulfate       | 1.5 M                   |
| Triton X-100              | 5.0%                    | Sodium Acetate, pH 5.5 | 200 mM                  |
| Octyl- $\beta$ -Glucoside | 5.0%                    | SDS                    | 5.0%                    |
| Urea                      | 3.0 M                   | Brij-35                | 5.0%                    |
| Sucrose**                 | 40%                     | Lubrol                 | 1.0%                    |
| Glycine, pH 2.8           | 100 mM                  | CHAPS                  | 5.0%                    |

**Sensibile a moltissimi interferenti.**

# COLORAZIONI

## METODO BRADFORD (1976)

Si basa sul legame del **coomassie G-250** alle proteine.

Utilizzabile **su micropiastra** e solo su peptidi superiori a 3 kDa.

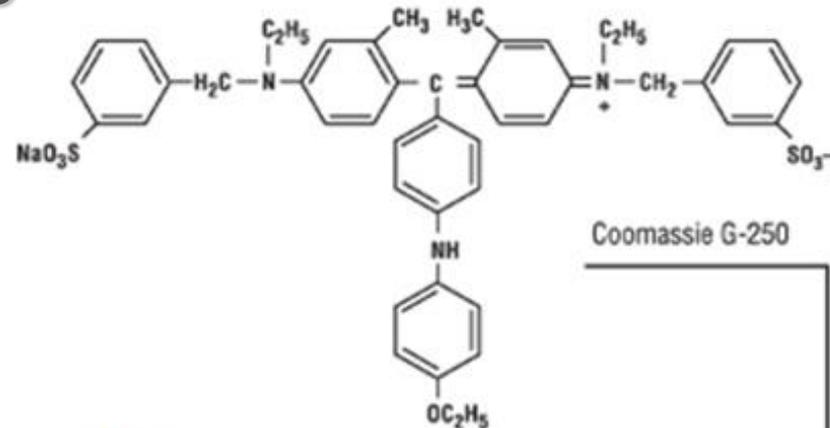
Veloce, facile e sensibile.

**Compatibile** con moltissimi sali, buffers, chelanti...**tranne** alcuni **detergenti**.

Proteine

con catene laterali basiche

+



Coomassie G-250



$A_{\max}$  : 465 nm  $\rightarrow$  595 nm

Protein-Dye Complex

# METODO BRADFORD

Lega Arginina (8 volte più degli altri)

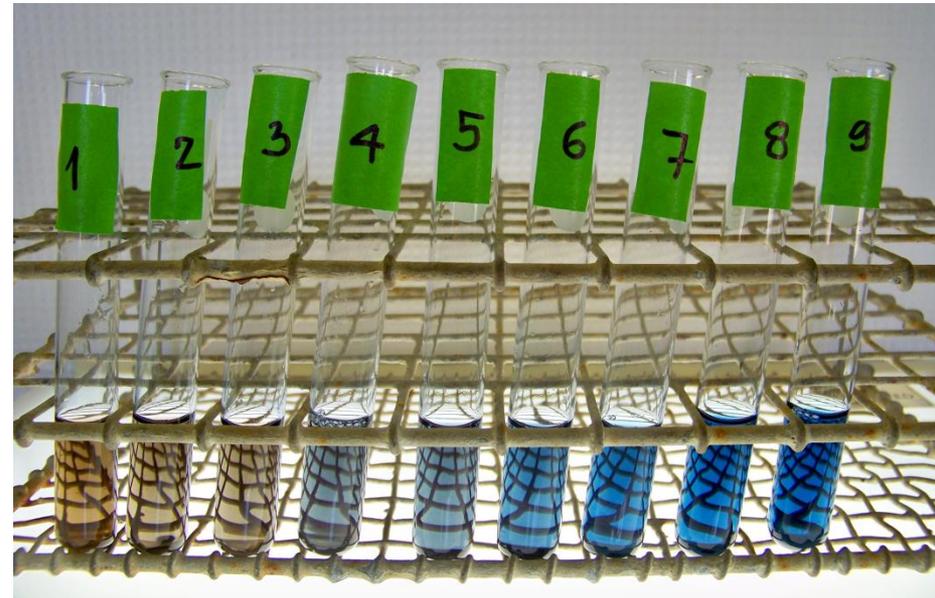
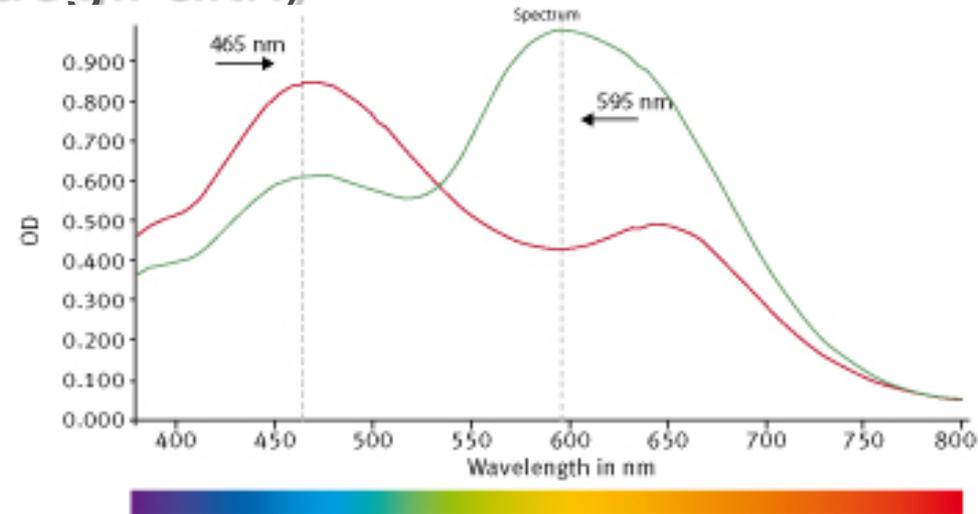
Triptofano

Tirosina

Istidina

I gruppi acidi sulfonici del colorante si legano alla proteina per attrazione elettrostatica.

Forma anionica (**blu**)  
assorbimento a 595 nm



# PROTOCOLLO

BSA = Albumina da siero bovino

| Campione | Albumina<br>(BSA) | Volume     |
|----------|-------------------|------------|
| n°       | mg/L              | ( $\mu$ L) |
| 1°       | 2000              | 100        |
| 2°       | 1000              | 50         |
| 3°       | 500               | 50         |
| 4°       | 250               | 50         |
| 5°       | 125               | 50         |
| 6°       | 62.5              | 50         |
| 7°       | 31.2              | 50         |
| 8°       | 15.6              | 50         |
| 9°       | 7.8               | 100        |
| 10°      | 0                 | 50         |
| 11°      | Campione          | 50         |
| 12°      | Campione          | Replica    |

Diluizioni in tampone  
fosfato (**PBS**)

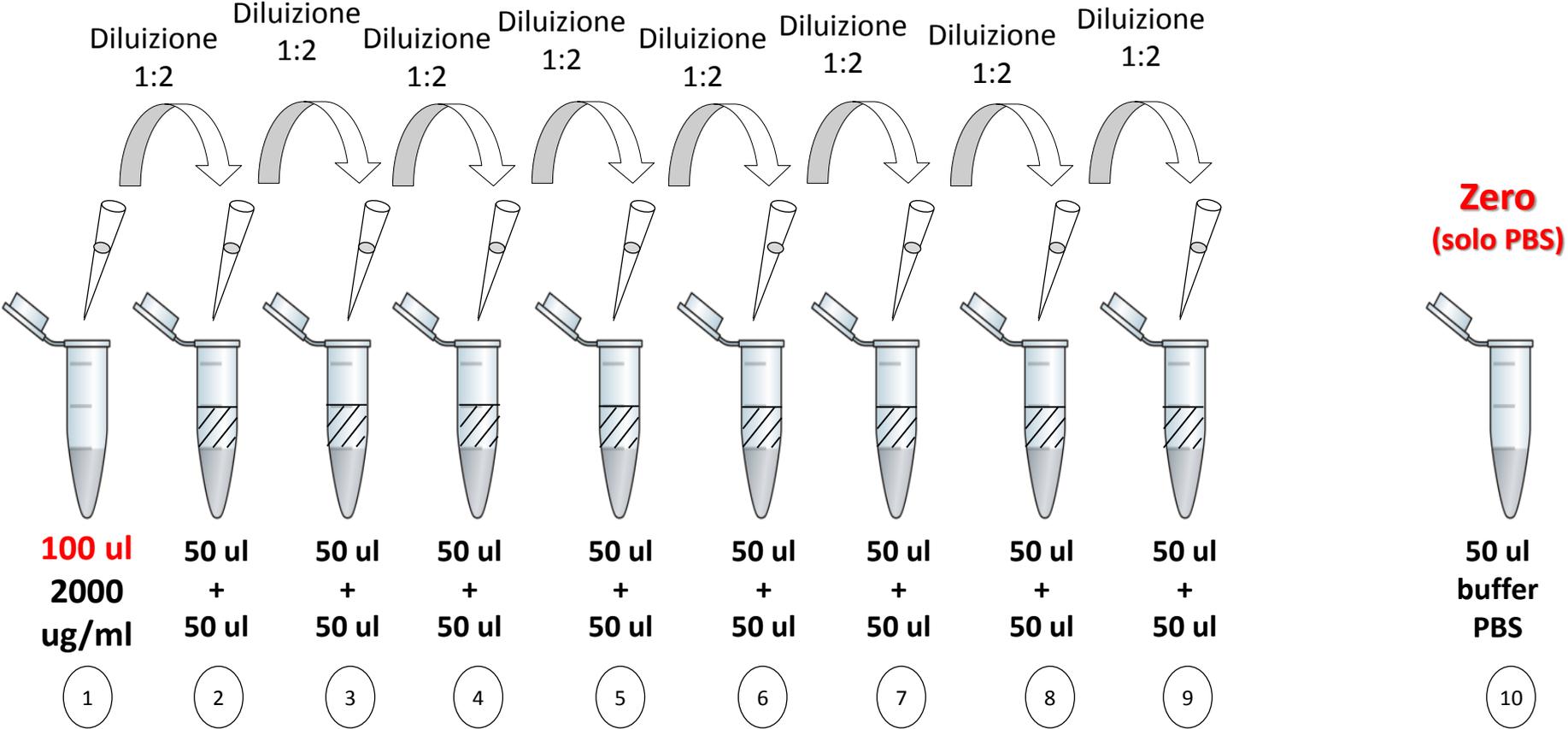
## BCA

100  $\mu$ L Mix (1:50) + 10  $\mu$ L dil. BSA  
**INCUBAZIONE** di 30' a 25° o 37°C  
(per la massima efficienza).

## BRADFORD

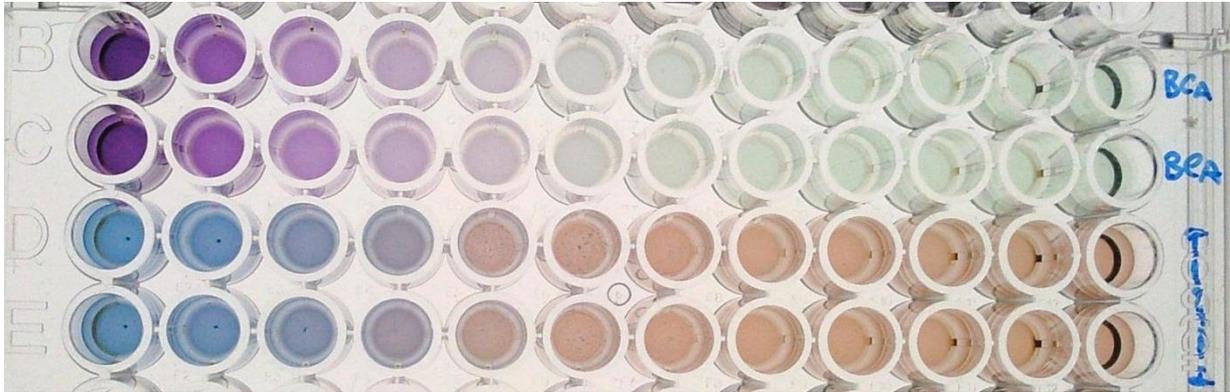
100  $\mu$ L colorante + 10  $\mu$ L dil. BSA  
**NESSUNA INCUBAZIONE**

# DILUIZIONI SCALARI

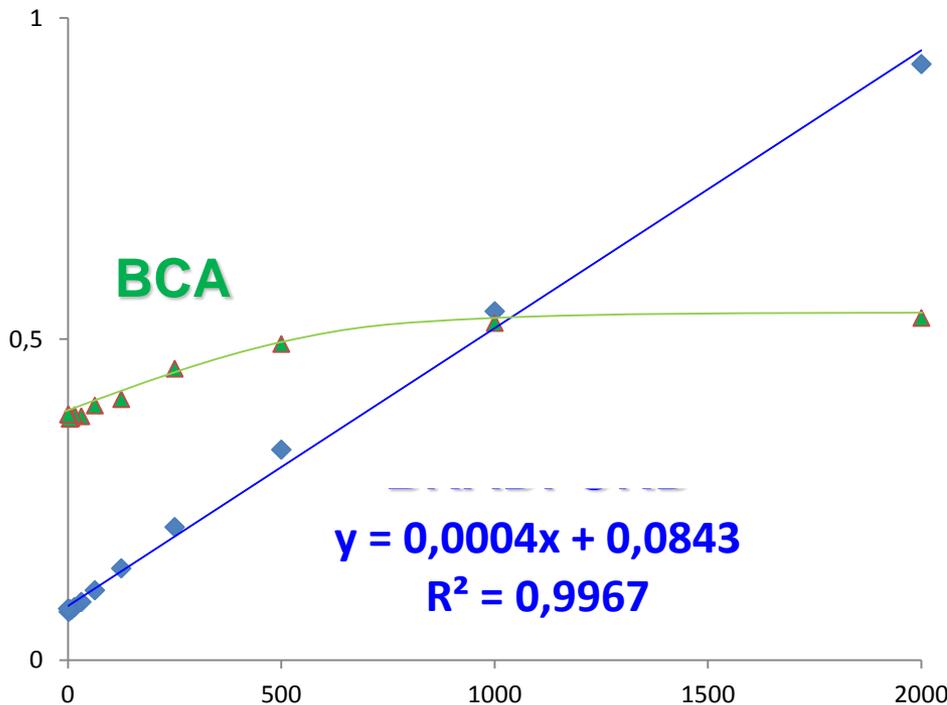


# COMPARAZIONE FRA LE COLORAZIONI

µg/mL di BSA    2000 1000 500 250 125 62,5 ..... 0



Max  
assorbimento  
a **562 nm**.  
Max  
assorbimento  
a **595 nm**.



**Lettura a 620 nm**

Uno dei **coloranti** ha sensibilità e linearità di risposta nettamente superiori.

**NOTA BENE**

E' lo stesso standard,

ma crea 2 curve di  
taratura così diverse!

Dipendenza della colorazione dalla composizione amminoacidica.