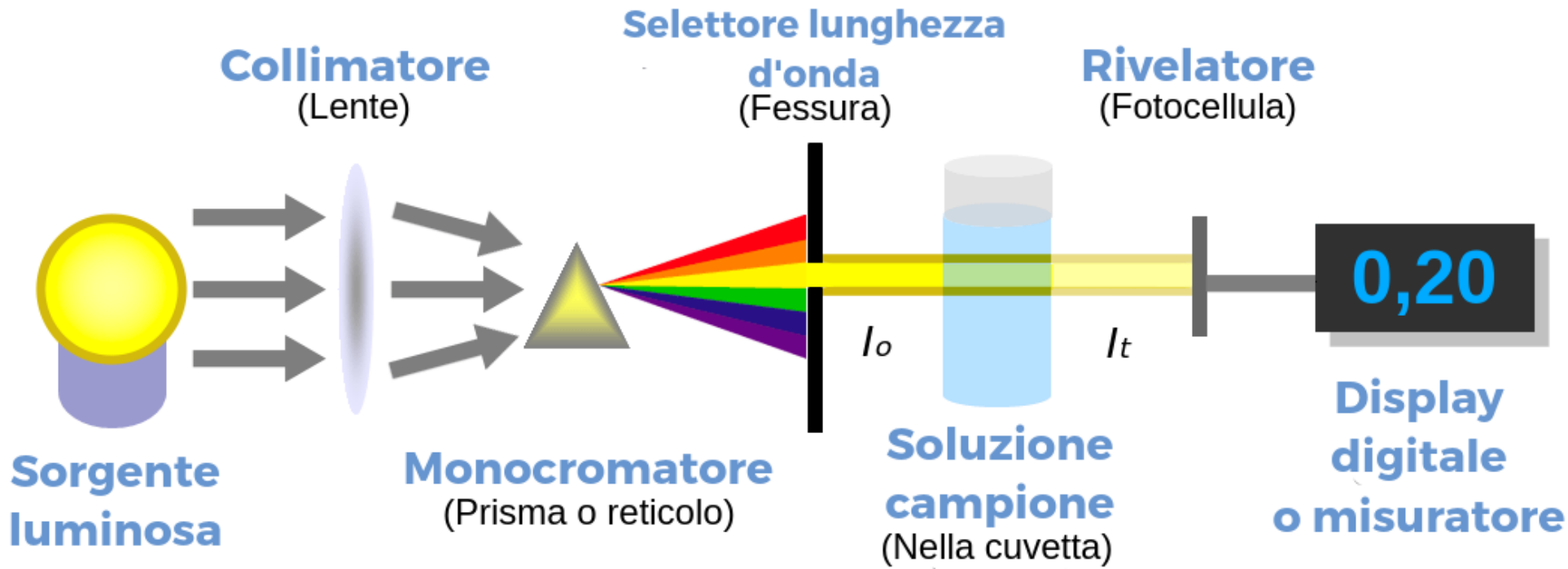
Spettrofotometria e saggio di Bradford

Dai massimi di assorbimento alla stima della concentrazione proteica



Laboratorio di biochimica · Biologia, III anno


Collimatore
(Lente)
Selettore lunghezza d'onda
(Fessura)
Rivelatore
(Fotocellula)
0,20
I_o
I_t
Sorgente luminosa
Monocromatore
(Prisma o reticolo)
Soluzione campione
(Nella cuvetta)
Display digitale o misuratore

Analisi quali/quantitativa

SPETTRO UV-VISIBILE

Quali lunghezze d’onda assorbe ciascun campione A, B e C?

Si registra lo spettro da 200 a 700 nm e si cercano i massimi di assorbimento.

SAGGIO DI BRADFORD

Quanta proteina contiene il campione X?

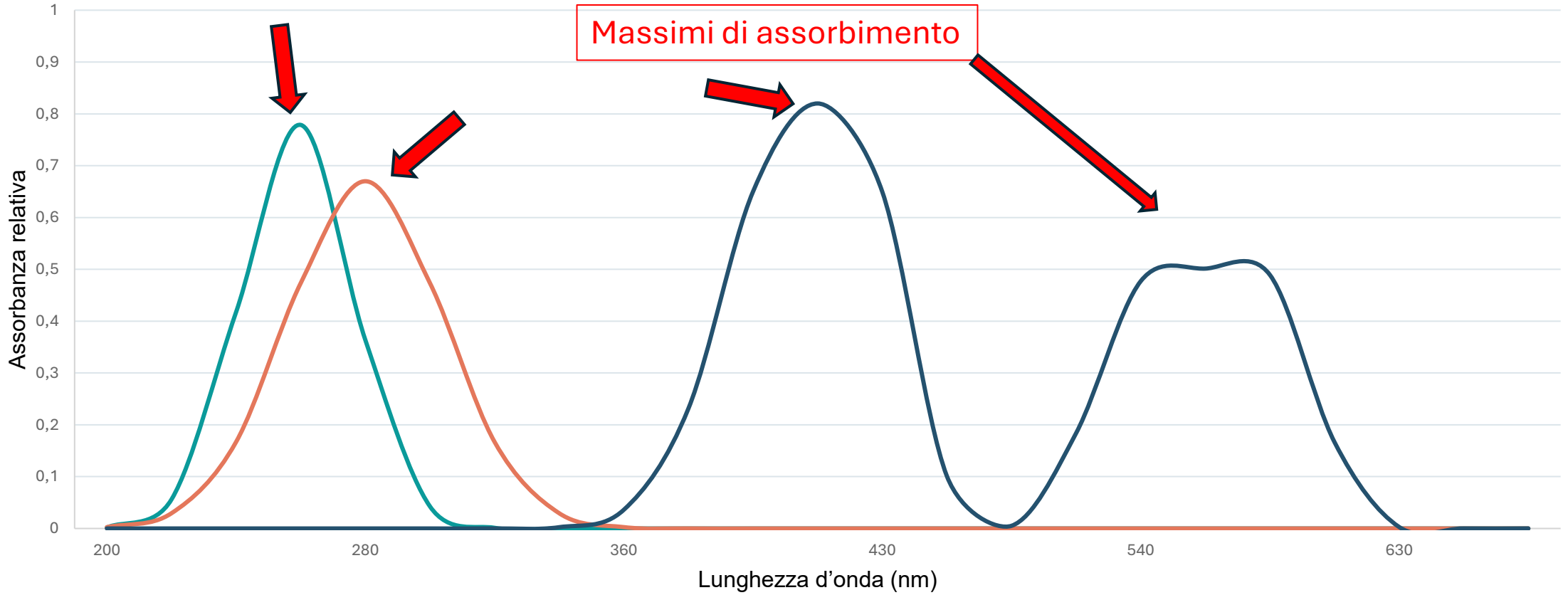
Si confronta l’assorbanza a 595 nm con standard di albumina sierica bovina (BSA).



Lo spettro di assorbimento

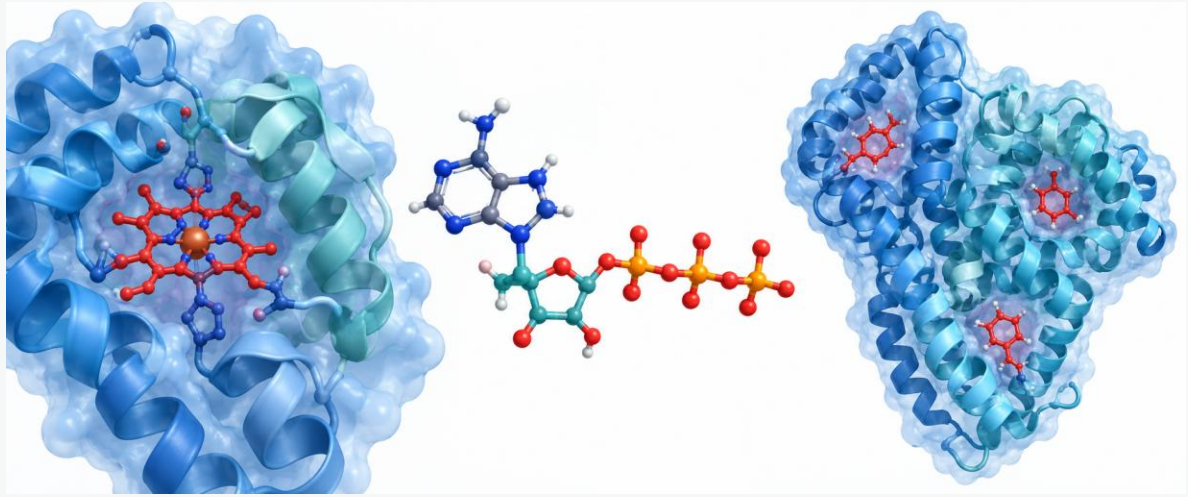
Raggi X	fino a 7 nm
UV	180-340 nm
VIS	340-800 nm
IR	10^3-10^5 nm
Onde radio	10^6-10^{10} nm

Il grafico mette in relazione assorbanza e lunghezza d'onda.



Schema qualitativo: le curve non sono dati sperimentali e non sono in scala.

I cromofori come indizi



transizioni elettroniche caratteristiche sia di composti organici sia di composti inorganici.

Il gruppo di atomi in cui approssimativamente sono localizzati gli orbitali molecolari tra cui avviene la transizione viene chiamato cromoforo

I cromofori più comuni sono caratterizzati da legami chimici multipli e sono detti perciò insaturi: tra essi il gruppo etilenico C=C, acetilenico C≡C, carbonilico C=O.

nucleotidi · circa 259 nm

Assorbono soprattutto le basi azotate.

proteine · circa 280 nm

Contribuiscono principalmente triptofano e tirosina; sotto 230 nm contribuisce anche lo scheletro peptidico.

HbO_2 · circa 415, 541 e 576 nm

Il gruppo eme genera la banda Soret e le bande visibili caratteristiche.

Confrontate i massimi con gli spettri A, B e C.

La scansione UV-visibile

- Preparare il bianco in acqua e azzerare lo strumento.
- Usare cuvette di quarzo (plastica o vetro per uv) per la scansione 200–700 nm.
- Misurare A, B e C separatamente; evitare bolle e impronte.
- Individuare λmax e registrare l’assorbanza corrispondente.



Nel quaderno: asse x = λ (nm) · asse y = assorbanza (A). Disegnate lo spettro di un campione.

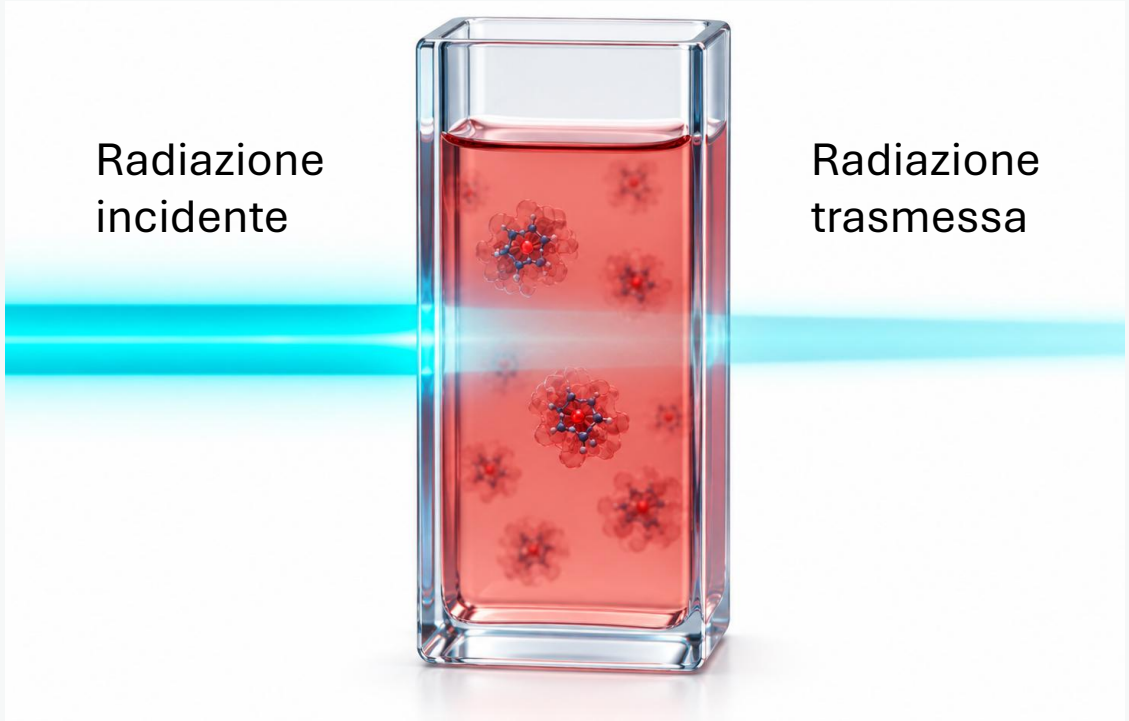
Lambert–Beer sul campione C

$$A_{540} = \varepsilon_{540} \cdot l \cdot c$$

$$c = A_{540} / (\varepsilon_{540} \cdot l)$$

$$\varepsilon_{540} = 13{,}5\ mM^{-1}\ cm^{-1}$$

Misurate A a 540 nm e usate il cammino ottico l della cuvetta (di norma 1 cm).



Coerenza delle unità: ε e c devono riferirsi alla stessa base molare.

Bradford: un saggio colorimetrico

Il colorante Coomassie G-250 lega le proteine.

Il complesso proteina-colorante aumenta l’assorbimento misurabile a 595 nm.

Il campione X si confronta con standard di BSA a concentrazione nota.

La risposta dipende dall’interazione colorante-proteina. La curva standard permette di stimare X nelle stesse condizioni.

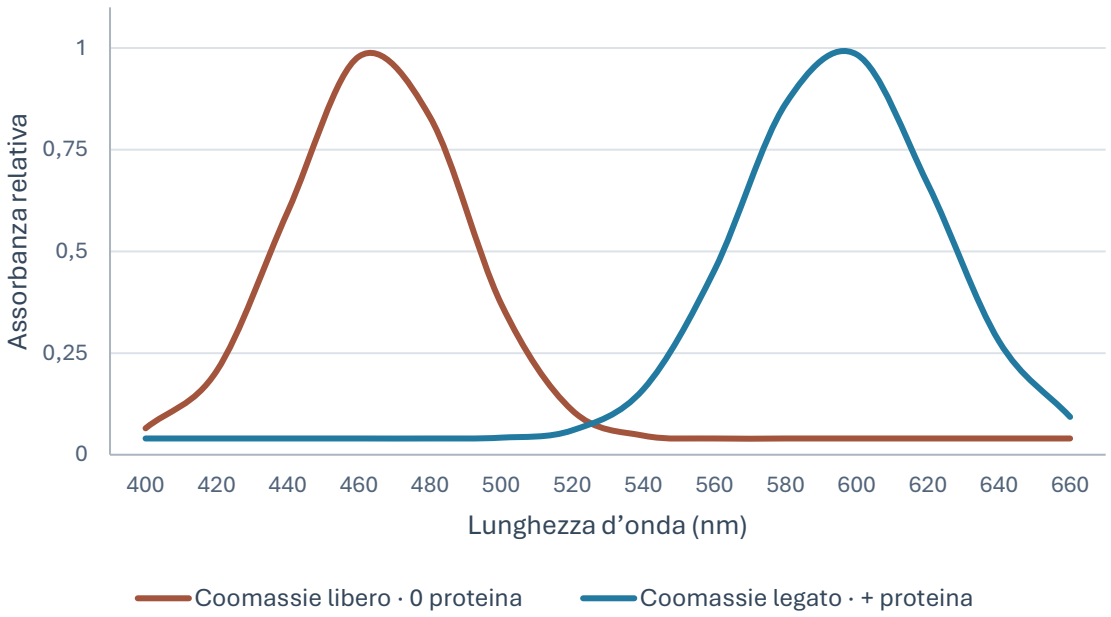


Saggio di Bradford

Il legame con le proteine sposta il massimo di assorbimento del Coomassie G-250

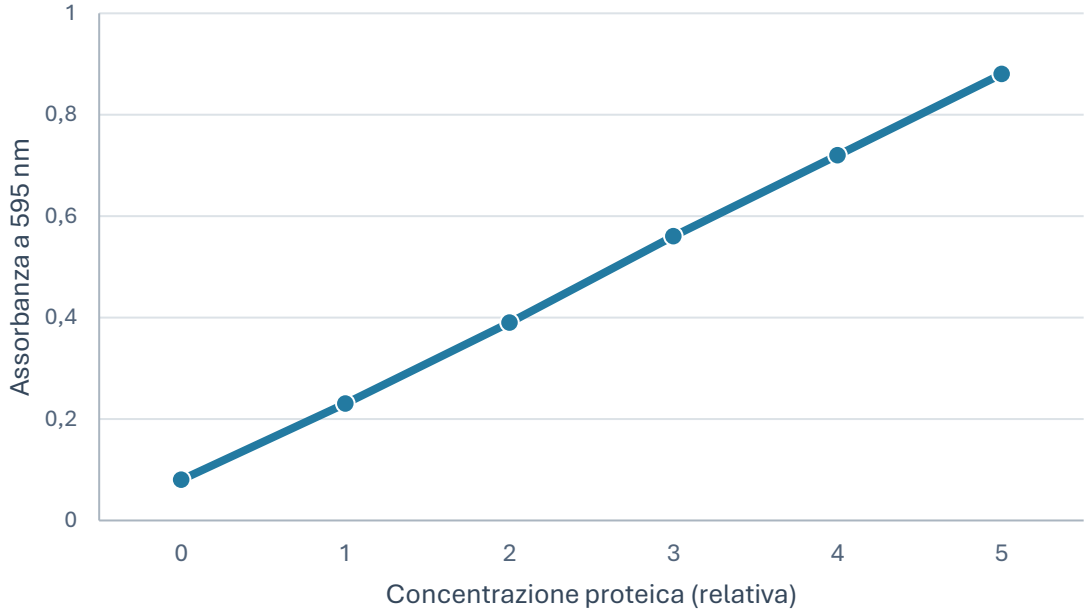
1 · Spettro del colorante

Il Coomassie libero assorbe a ~465 nm; legato alla proteina, a ~595 nm.



2 · Misura a 595 nm

Più proteina lega più colorante: A595 aumenta nel campo di misura.



Nel campione incognito si misura A595 e si ricava la concentrazione dalla curva standard.

Protocollo:

1) Utilizzando una soluzione a concentrazione nota di Albumina bovina (1 mg/ml)
2) preparare una serie di diluizioni a concentrazione nota

3) Miscelare Albumina bovina e Coomassie Brillant Blue

4) Vorticare

5) Incubare a temperatura ambiente per 5 min

6) Misurare il valore di $A_{595\ nm}$ delle soluzioni a concentrazione nota e della soluzione a concentrazione incognita

Riportare in un grafico i dati ottenuti per calcolare il valore di concentrazione incognito

Gli standard di albumina

Stock BSA: 1 mg/mL · volume finale: 50 µL per provetta

BSA finale (mg/mL)	Acqua (µL)	BSA 1 mg/mL (µL)
0 (bianco)		
0,25		
0,50		
1,00		

Il bianco contiene acqua al posto della BSA.

Calcolo del volume

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Per ogni standard: prelevate il volume di stock e completate a 50 µL con acqua.

Reazione e lettura a 595 nm

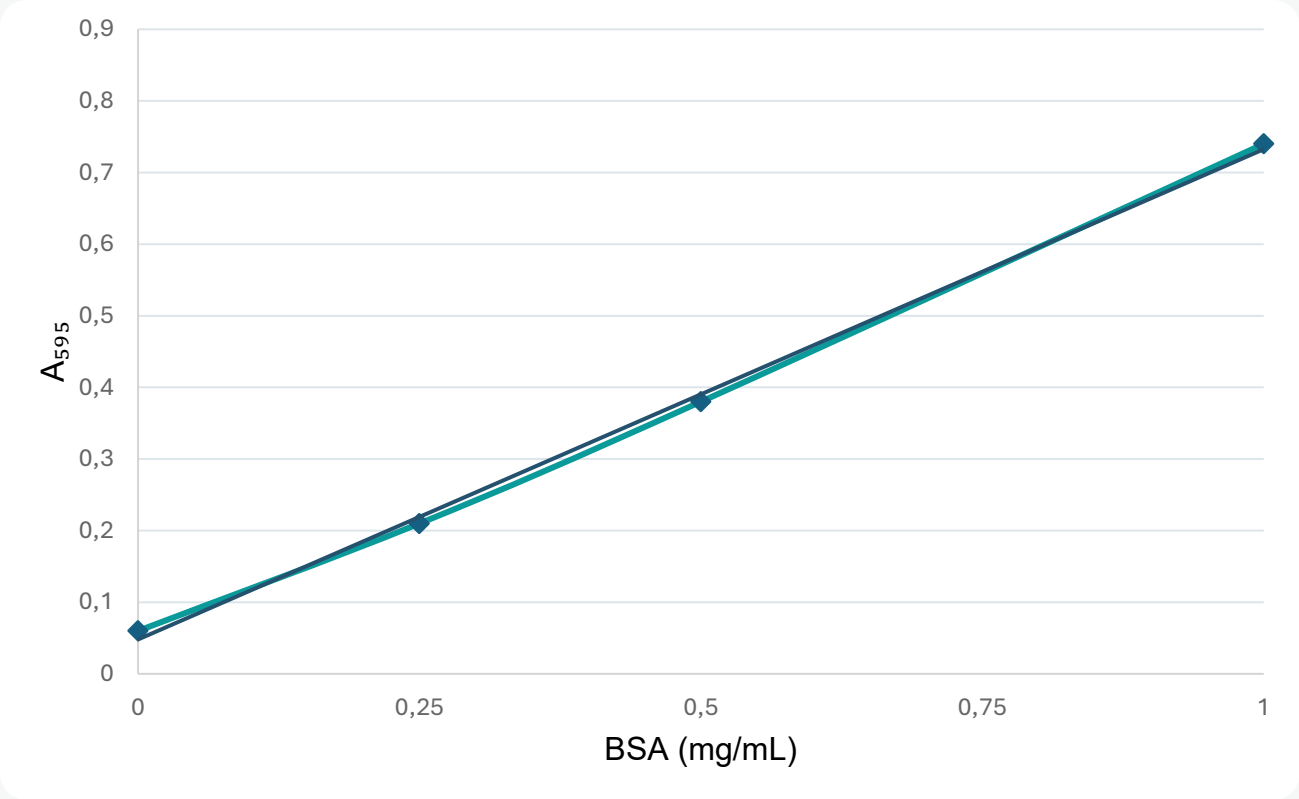
50 µL	Standard BSA oppure campione X
+ 1,5 mL	Reagente di Bradford
15 min	A temperatura ambiente, al buio
595 nm	Leggere A per standard e X



Bianco: reagente di Bradford + acqua.

Dalla curva standard a X

Tracciate A_{595} in funzione della concentrazione di BSA e ricavate la relazione della curva.



Se il tratto è lineare

$$A_{595} = m \cdot C + q$$

$$C_x = (A_x - q) / m$$

Interpolare X entro il campo coperto dagli standard. Se serve, diluire e ripetere la misura.

Curva e valori nel grafico sono simulati a scopo illustrativo.

Dettagli che migliorano la misura

Prima della lettura

- Cuvetta corretta: quarzo per UV, plastica visibile per Bradford.
- Superfici ottiche pulite, senza impronte o bolle.
- Bianco coerente con i reagenti del campione.

Durante il lavoro

- Puntali nuovi tra campioni e standard.
- Etichettare tutte le provette e mantenere gli stessi volumi.
- Camice, guanti e smaltimento secondo le regole del laboratorio.

Annotate sempre λmax, A misurata, diluizioni e cammino ottico.

Al termine dell’esercitazione

Avrete costruito una lettura spettroscopica dei campioni A, B e C.

Avrete stimato [HbO_2] del campione C con Lambert–Beer, chiarendo le unità di ε.

Avrete ricavato la concentrazione proteica di X dalla curva standard di Bradford.