دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی
شهید صدوقی یزد

اندازه گیری پروتئین به روش براد فورد

The Bradford Method for Protein Quantitation

ترجمه و تنظیم:

سید مجید باقری

کارشناس ارشد گروه فیزیولوژی

برگرفته شده از مقاله: Nicholas J. Kruger

روش براد فورد

چهار روش اسپکتروسکپی برای اندازه گیری پروتئین وجود دارد. یک روش اندازه گیری بر اساس جذب ذاتی اشعه ماوراء بنفش بوسیله پروتئین و سه روش دیگر وابسته به تغییر رنگ می باشد که شامل روش های لووری ، اسمیت و برادفورد می باشد. دو روش اول به دلیل نیاز به معرف های زیاد و نیز گران بودن چندان مورد توجه نیست اما روش سریع و دقیق اندازه گیری غلظت پروتئین که در زمینه های مختلف کاربرد دارد روش براد فورد است. این روش بوسیله براد فورد اولین بار ارائه شده و در بسیاری از آزمایشگاهها کاربرد دارد و بوسیله باند شدن رنگ Coomassie Brilliant blue G250 با پروتئین و تغییر دادن خواص جذب نوری رنگ انجام می شود. هنگامی که رنگ با یک اسید (اسید فسفریک) مخلوط می شود ماکزیمم نور را با یک طول موج ۴۶۵ نانومتر جذب می کند. باند شدن پروتئین با رنگ آبی انیونی باعث تغییر ماکزیمم جذب به ۵۹۵ نانومتر می شود. با افزایش غلظت پروتئین جذب نوری در ۵۹۵ نانومتر به طور خطی افزایش می یابد که این افزایش جذب را می توان بوسیله اسپکتروفتومتری تعیین کرد. مقدار پروتئین بوسیله مقدار رنگ آبی تولید شده تعیین می شود. رنگ به سهولت با باقیمانده های آرژینیل و لیزیل باند شده ولی با اسید امینه های آزاد باند نمی شود. اگر چه جذب رنگ کوماسی بلو در ۵۹۵ متناسب با غلظت پروتئین افزایش می یابد لازم است یک ارتباط صحیح بین میزان جذب و مقدار پروتئین برقرار شود. برای این منظور، باید یک سری استانداردهای پروتئین از یک محلول پروتئین با غلظت مشخص آماده نمود. هنگامیکه A595 هر استاندارد اندازه گیری شد می توان منحنی مقدار پروتئین هر استاندارد را بدست آورید. پس از اندازه گیری A595 نمونه نامشخص، با استفاده از منحنی استاندارد می توان مقدار پروتئین را با توجه به به جذب نوری نمونه بدست آورد. روش اندازه گیری براد فورد در پروتئین های مختلف تغییرات گسترده ای دارد. برای حل این مشکل روش های تغییر یافته ای ایجاد شده است. در اینجا به شرح دو روش اندازه گیری براد فورد می پردازیم. یک روش، روش استاندارد که برای اندازه گیری پروتئین بین ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم می باشد و روش میکرو که برای اندازه گیری پروتئین بین ۱ تا ۱۰ میکروگرم استفاده می شود.

مواد:

معرف: معرف بوسیله حل کردن ۱۰۰ میلی گرم Coomassie blue G250 در ۵۰ سی سی اتانول ۹۵٪ ساخته می شود. سپس محلول با ۱۰۰ سی سی اسید فسفریک ۸۵٪ مخلوط شده و آب مقطر به این محلول اضافه می کنیم تا حجم نهایی به ۱ لیتر برسد. این معرف می بایست با فیلتر شماره ۱ فیلتر شده و سپس در یک ظرف کهربایی رنگ در دمای اتاق نگهداری شود. این معرف در طی چند هفته پایدار می شود. در طی این مدت ممکن است رنگ رسوب کرده باشد که در زمان استفاده باید فیلتر شود.

استاندارد پروتئین:

گاما گلوبولین گاوی در یک غلظت ۱ میلی گرم /سی سی در آب مقطر به عنوان استوک استفاده می شود. این استاندارد باید در دمای ۲۰- درجه نگهداری شود. غلظت دقیق پروتئین باید در جذب نوری ۲۸۰ نانومتر تعیین شود. جذب ۱ میلی گرم /سی سی این محلول ۱.۳۵ می باشد.

ظروف پلاستیکی و شیشه ای استفاده شده در در این آزمایش باید کاملا تمیز شود. از کوت اسپکتروفتومتر سیلیکا نباید استفاده شود زیرا رنگ با این مواد باند می شود. مقدار کمی رنگ که به ظروف پلاستیکی یا شیشه ای می چسبد باید بوسیله متانول جدا شود.

روش ها:

روش اندازه گیری استاندارد:

۱- پی پت بین ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم از پروتئین در ۱۰۰ میکرولیترحجم کلی به داخل لوله آزمایش می ریزیم. اگر تعیین غلظت نمونه مشکل است به صورت یک رنج محلول را رقیق کنید. (۱، ۱۰/۱، ۱۰۰/۱، ۱۰۰۰/۱،)

۲- برای کالیبره کردن منحنی حجم های دوبرابر پیپت ۱۰-۱۰-۴۰-۶۰-۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از ۱ میلی گرم در سی سی محلول استاندارد گاما گلوبولین بداخل لوله آزمایش ریخته اب مقطر و حجم هر کدام را بوسیله آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر می رسانیم. با پیپت ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر را به داخل یک لوله آزمایش دیگر می ریزیم و به عنوان بلانک استفاده میکنیم. ۵ سی سی از عامل پروتئینی به هر لوله اضافه کرده و

خوب به هم میریزیم و این لوله آزمایش را به عنوان بلانک استفاده می کنیم. مواظب باشید محلول کف نکند.

۳- ۵ سی سی معرف پروتئین به هر لوله اضافه کنید و بوسیله معکوس کردن لوله خوب مخلوط کنید.

۴- میران A595 هر نمونه و استاندارد را نسبت به بلانک بین ۲ دقیقه تا ۱ ساعت بعد از مخلوط کردن اندازه گیری کنید. ۱۰۰ میکروگرم استاندارد باید باید یک A595 حدود ۰.۴ را باید بدست بدهد. منحنی استاندارد خطی نیست و جذب نوری بستگی به عمر معرف اندازه گیری دارد.

روش MICROASSAY

این روش اندازه گیری حساس تر می باشد و در مواقعی که مقدار پروتئین محدود باشد استفاده می شود.

۱- نمونه های بین ۱و ۱۰ میکروگرم در یک حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر به داخل لوله های میکروفیوژ پلی اتیلن ۱.۵ سی سی می ریزیم. اگر میزان غلظت نمونه معلوم نیست یک رنج رقیق شده را اندازه گیری کنید(۱،۱/۱،۱/۱۰،۱/۱۰۰،۱/۱۰۰۰).

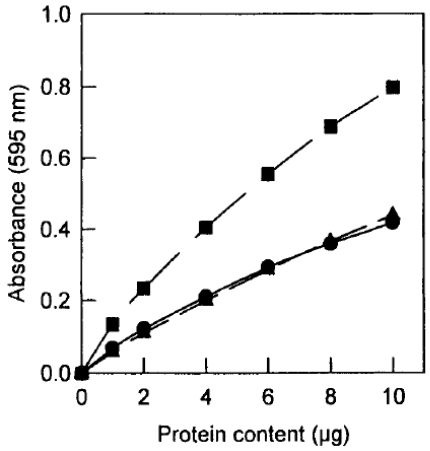
۲- برای کالیبره کردن منحنی حجم های دوبرابر پیپت ۱۰-۲۰-۴۰-۶۰-۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از۱۰۰ میکرو گرم در سی سی محلول گاما گلوبولین استاندارد بداخل لوله ازمایش میکروفیوژ ریخته و حجم محلول را با اب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر می رسانیم. با پیپت ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر را به داخل یک لوله آزمایش اضافه می ریزیم و به عنوان بلانک استفاده می کنیم.

۳- ۱ سی سی معرف پروتئین به هر لوله اضافه می کنیم و با آرامی مخلوط می کنیم. جذب هر نمونه را پس از ۲ تا ۶۰ دقیقه پس از اضافه کردن عامل پروتئین اندازه گیری می کنیم. A595 دارای ۱۰ میکروگرم گلوبولین ۰.۴۵ می باشد. شکل ۱ منحنی واکنش ۳ استاندار پروتئین را با روش میکرو نشان می دهد.

نکات:

۱- برادفورد بوسیله مواد شیمیایی مختلفی اندازه گیری می شود. بعضی از مواد شیمیایی ممکن است به طور معنی داری جذب نوری بلانک یا واکنش پروتئین به رنگ را تغییر دهند(جدول ۱). موادی که بیشتر باعث ایجاد مشکل در عصاره بیولوژیک می شوند آمفولیت ها و دترجنت ها می باشند. این مواد باید از محلول بوسیله دیالیز یا فیلتراسیون نمونه جدا شوند. حضور این مواد باعث تبدیل رنگ آزاد به شکل یونی می شود. این مساله باعث ایجاد مشکل در تعیین غلظت پروتئین می شود. هیدروکلرید گوانیدین و سدیم اسکوربات با رنگ برای اتصال به پروتئین رقابت می کنند و باعث تخمین نادرست پروتئین می شوند.

۲- باند شدن پروتئین با رنگ Coomassie blue G250 ماکزیممم جذب شکل یونی رنگ آبی را از ۵۹۰ به ۶۲۰ نانومتر تغییر می دهد. اگر چه این مسئله در طول موج ها بالا مشخص می شود و مقرون به اصلاح نیست.



۳- میزان حساسیت پروتئین های مختلف با روشی که در اینجا شرح داده شد متفاوت است(جدول ۲) چندین روش اصلاح شده پیشنهاد شده تا میزان این تغییرات به حداقل برسد. به طور کلی افزایش یافتن میزان رنگ یا pH محلول که در مواردی می توان با اضافه کردن NaOH به معرف میزان حساسیت اندازه گیری و نیز تغییرات مشاهده شده در پروتئین های مختلف را بهبود بخشید. pH مناسب بستگی به میزان و غلظت رنگ دارد. برای اندازه گیری پروتئین های غشایی می بایست توجه ویژه نمود. مقدار پروتئین های موجود در غشاء بسیار ناچیز می باشد.

Table 1
Effects of Common Reagents on the Bradford Assay

Compound	Absorbance at 600 nm	
	Blank	5 μg Immunoglobulin
Control	0.005	0.264
0.02% SDS	0.003	0.250
0.1% SDS	0.042[a]	0.059[a]
0.1% Triton	0.000	0.278
0.5% Triton	0.051[a]	0.311[a]
1*M* 2-Mercaptoethanol	0.006	0.273
1*M* Sucrose	0.008	0.261
4*M* Urea	0.008	0.261
4*M* NaCl	–0.015	0.207[a]
Glycerol	0.014	0.238[a]
0.1*M* HEPES, pH 7.0	0.003	0.268
0.1*M* Tris, pH 7.5	–0.008	0.261
0.1*M* Citrate, pH 5.0	0.015	0.249
10 m*M* EDTA	0.007	0.235[a]
1*M* $(NH_4)_2SO_4$	0.002	0.269

جدول ۱- اثرمعرف های معمول بر روش اندازه گیری برادفورد

داده بوسیله مخلول کردن ۵ میکرولیتر نمونه با ۵ میکرولیتر ترکیب مخصوص قبل از اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر معرف-رنگ می باشد

Table 2
Comparison of the Response of Different Proteins in the Bradford Assay

Protein	Relative absorbance	
	Assay 1	Assay 2
Myelin basic protein	139	—
Histone	130	175
Cytochrome c	128	142
Bovine serum albumin	100	100
Insulin	89	—
Transferrin	82	—
Lysozyme	73	—
α-Chymotrypsinogen	55	—
Soybean trypsin inhibitor	52	23
Ovalbumin	49	23
γ-Globulin	48	55
β-Lactoglobulin A	20	—
Trypsin	18	15
Aprotinin	13	—
Gelatin	—	5
Gramicidin S	5	—

برای هر پروتئین واکنش متناسب با غلظت مشابه سرم البومین گاو بیان می شود.

References:

1. 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.

2. Chial, H. J., Thompson, H. B., and Splittgerber, A. G. (1993) A spectral study of the charge forms of Coomassie blue G. *Anal. Biochem.* 209, 258-266. 20 Kruger

3. Compton, S. J. and Jones, C. G (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *AnaL Biochem.* 151,369-374.

4. Congdon, R. W., Muth, G. W., and Splittgerber, A. G. (1993) The binding interaction of Coomassie blue with proteins. *AnaL Biochem.* 213, 407-413.

5. Friendenauer, S. and Berlet, H. H. (1989) Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *AnaL Biochem.* 178, 263-268.

6. Reade, S. M. and Northcote, D. H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 116, 53-64.

7. Stoscheck, C. M. (1990) Increased uniformity in the response of the Coomassie blue protein assay to different proteins. *Anal. Biochem.* 184, 111-116.

8. Spector, T. (1978) Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for <0.5 to 50 lag of protein. *Anal. Biochem.* **86, 142-146.**

9. Peterson, G. L. (1983) Coomassie blue dye binding protein quantitation method, in *Methods in Enzymology*, vol. 91 (Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. N., eds.), Academic, New York, pp. 95-119.

10. Kirazov, L. P., Venkov, L. G., and Kirazov, E. P. (1993) Comparison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation of membrane-containing fractions. *Anal. Biochem.* 208, 44--48.

11. Wilson, C. M. (1979) Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie blue R and Fast green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 96, 263-278.

12. Sedmak, J. J. and Grossberg, S. E. (1977) A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* 79, 544-552.

13. Redinbaugh, M. G. and Campbell, W. H. (1985) Adaptation of the dye-binding protein assay to microtiter plates. *Anal. Biochem.* 147, 144-147.