



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΠΑΤΡΩΝ  
UNIVERSITY OF PATRAS

ΤΜΗΜΑ ΔΕΙΦΟΡΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

---

**6<sup>η</sup> Εργαστηριακή Άσκηση: Φασματοσκοπία - Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford, Μέθοδος Lowry**

**Γαλάνη Αγγελική, Χημικός PhD, Ε.ΔΙ.Π. - Διονυσοπούλου Εύα Βιολόγος PhD, Ε.ΔΙ.Π.**

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

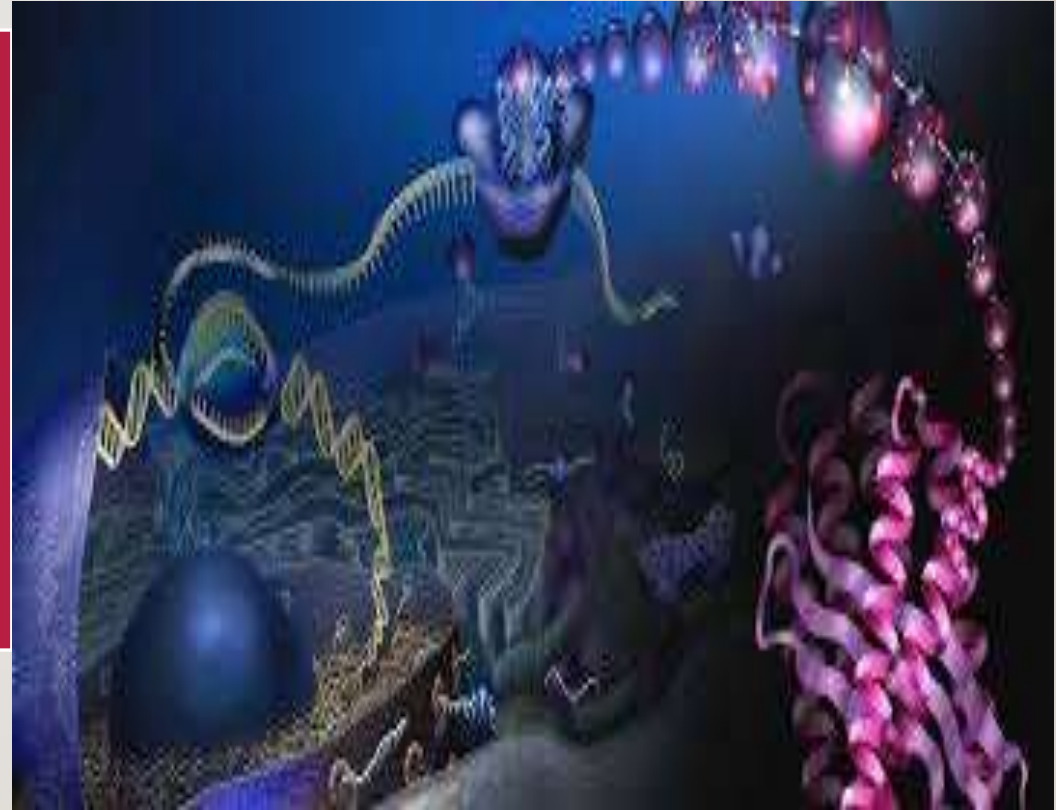
---



## ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

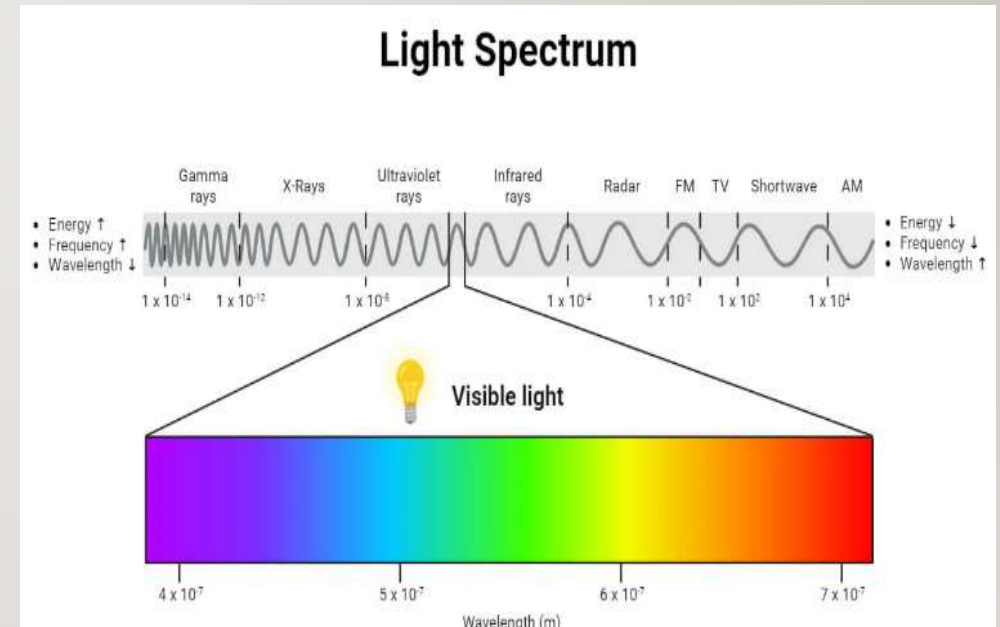
- Μια από τις πιο χρήσιμες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη βιοχημεία είναι η φασματοσκοπία

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μπορεί να γίνει άμεσα στην περιοχή του υπεριώδους στα 280 nm ή έμμεσα χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία ορατού σε συνδυασμό με χρωματομετρικές μεθόδους όπως για παράδειγμα ο προσδιορισμός κατά Lowry ή η μέθοδος Bradford



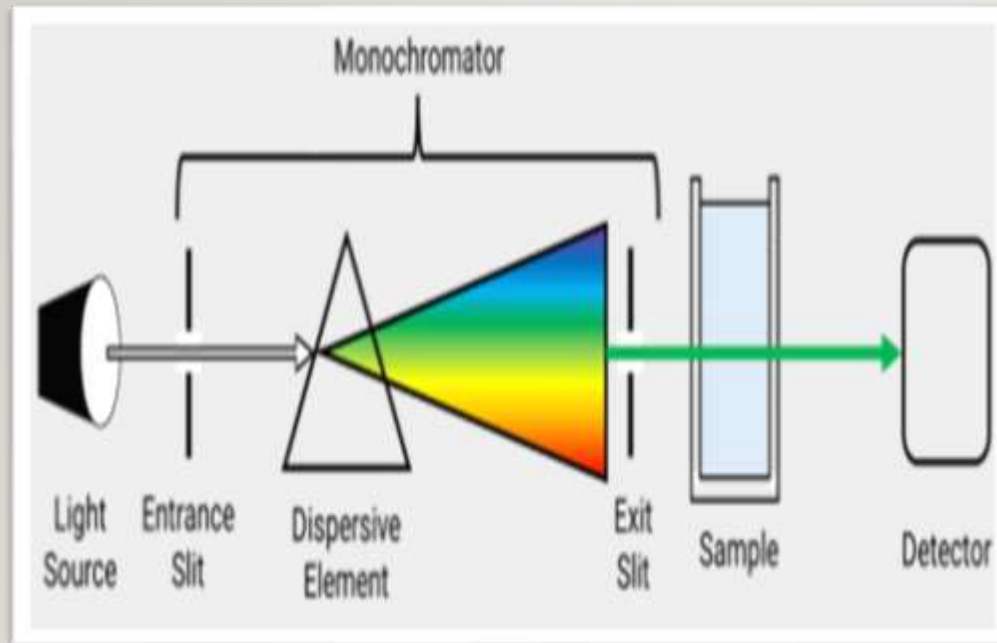
# ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

- ✓ Μεγάλη ευαισθησία ( $\mu\text{g}$  ή και  $\text{ng}$ )
- ✓ Δεν αλλοιώνει το δείγμα που αναλύεται
- ✓ Είναι γρήγορη και εύκολη στη χρήση
- ✓ Έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών ποσοτικής και ποιοτικής ανάλυσης
- ✓ Πρόκειται για μέθοδο με σχετικά χαμηλό κόστος ανάλυσης



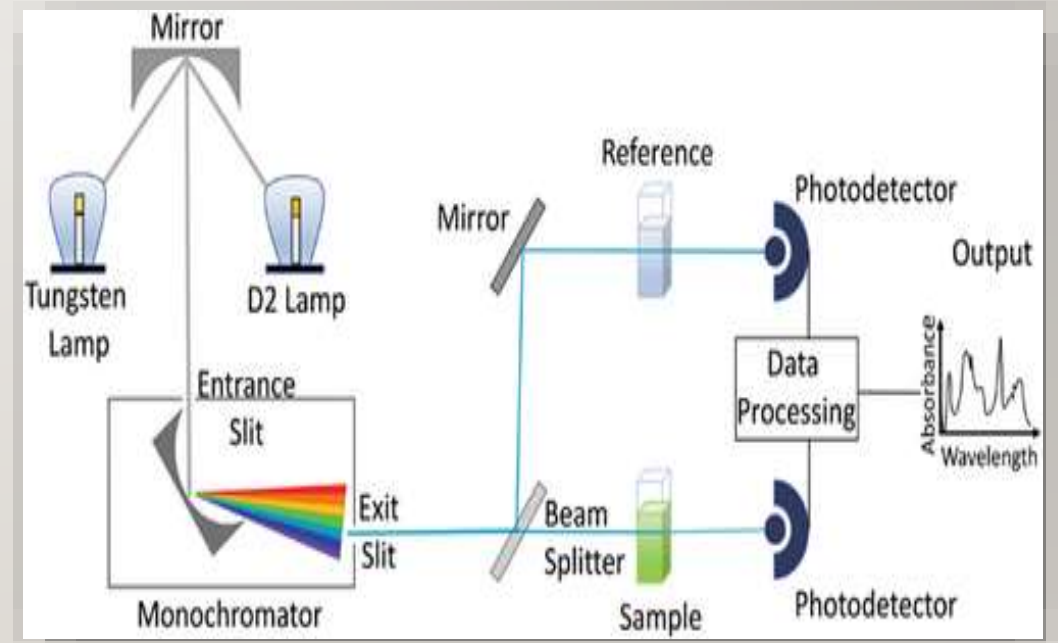
# ΒΑΣΙΚΗ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

## ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ ΔΙΠΛΗΣ ΔΕΣΜΗΣ



<https://jascoinc.com/learning-center/theory/spectroscopy/uv-vis-spectroscopy/instrumentation/>

## ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ ΔΙΠΛΗΣ ΔΕΣΜΗΣ



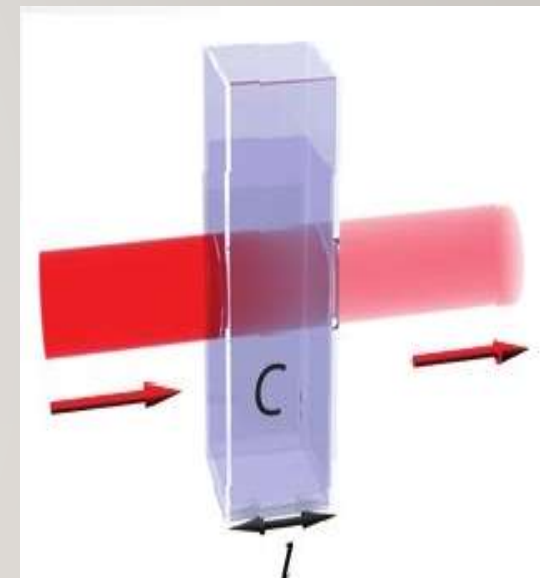
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cjce.23344>

$$A = \log(I_0/I)$$
$$\log T = A$$

## NΟΜΟΣ Lambert -Beer

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

- A: η απορρόφηση
- $\epsilon$  ο συντελεστής απορροφητικότητας ή απόσβεσης σε ορισμένο μήκος κύματος
- l η απόσταση (cm), που διανύει το φως μέσα στο διάλυμα της ουσίας
- C η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας (mol/L)
- $I_0$  και I: η ένταση της προσπίπτουσας και εξερχόμενης ακτινοβολίας αντίστοιχα
- T: η διαπερατότητα



Στο κενό η απορρόφηση A είναι 0 και η διαπερατότητα T = 100%

Ποσοτική ανάλυση  
Ανάλυση

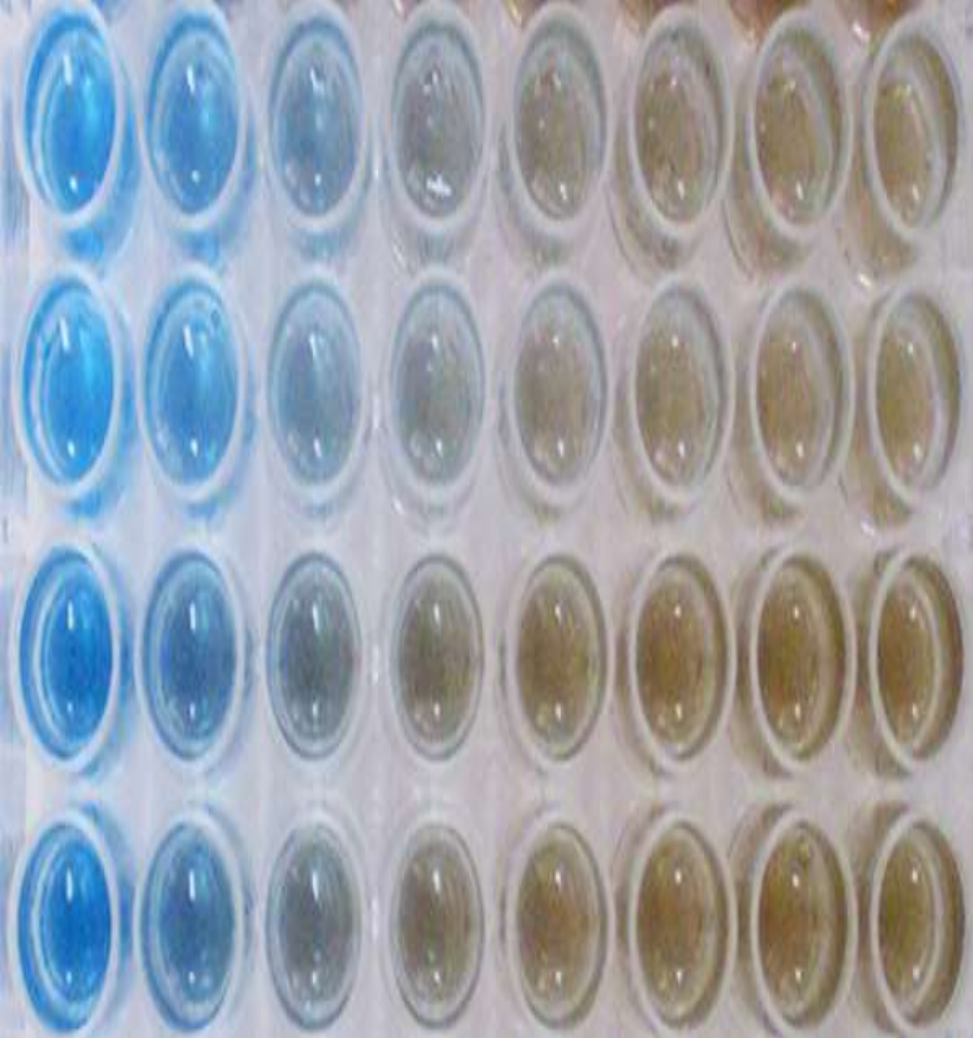


Ποιοτική Ανάλυση



<https://www.jove.com/science-education/11225/uv-vis-spectroscopy-of-dyes>





**1<sup>ο</sup> Πείραμα**  
**Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με**  
**τη μέθοδο Bradford**

**2<sup>ο</sup> Πείραμα**  
**Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη**  
**μέθοδο Lowry**

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD

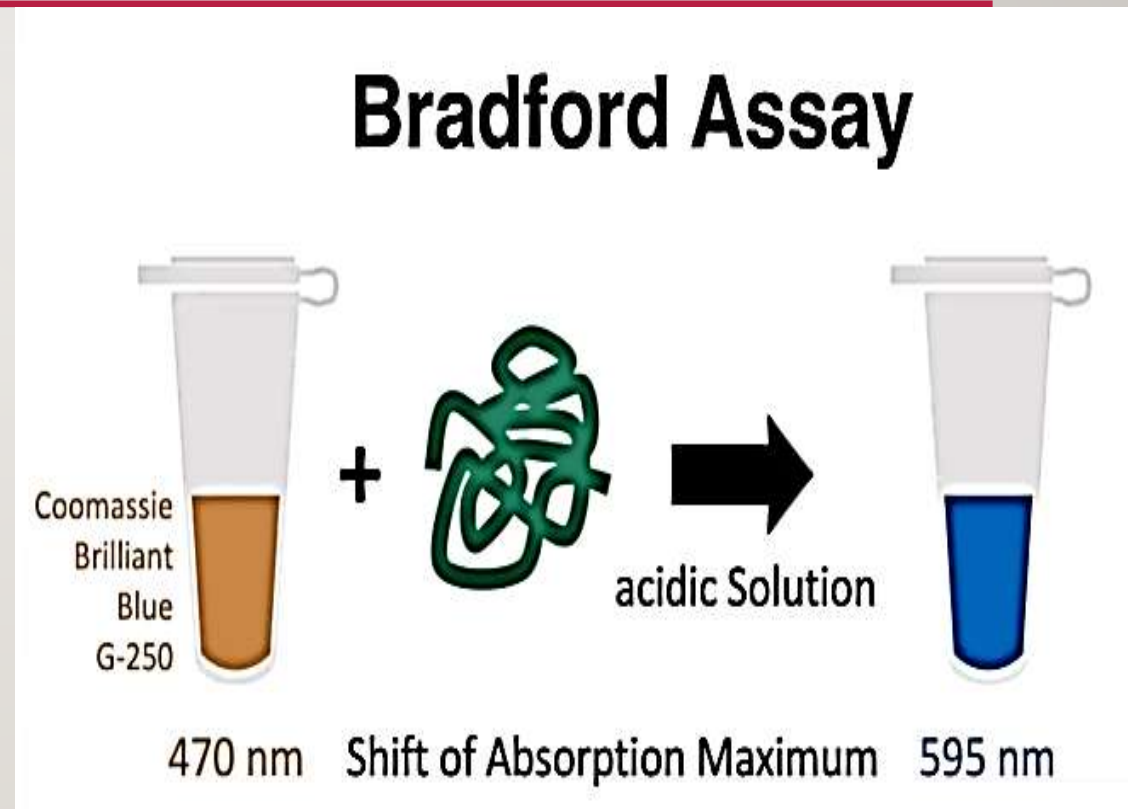
---

- Ο προσδιορισμός κατά Bradford βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες αντιδρούν με κάποια χημικά αντιδραστήρια και δίνουν έγχρωμα προϊόντα.
- Αποτελεί ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδο στη βιοχημεία.



# ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Οι πρωτεΐνες σε υδατικά διαλύματα αντιδρούν με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, σε όξινο περιβάλλον δίνοντας κυανό χρώμα με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm
- Το χρώμα σχηματίζεται σχεδόν αμέσως και είναι σταθερό για μια ώρα σχεδόν, ενώ δεν επηρεάζεται, ή επηρεάζεται ελάχιστα από άλλες ουσίες που συνυπάρχουν στο διάλυμα.



<https://www.youtube.com/watch?v=7o65va089S4>

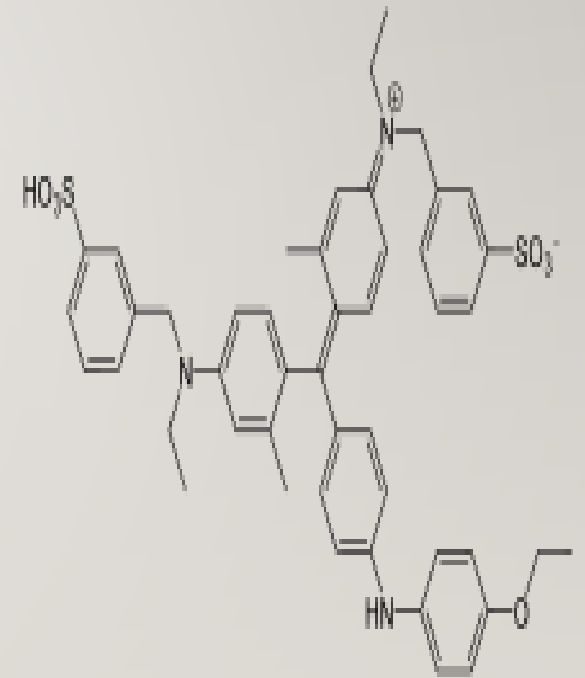
# ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΣΚΕΥΗ - ΟΡΓΑΝΑ

- 95% αιθανόλη, 85% φωσφορικό οξύ, Πρότυπο Αλβουμίνης Βόειου Ορού (Bovine Serum Albumin BCA) συγκέντρωσης 1 mg/mL, έτοιμο αντιδραστήριο Bradford (30 mL για κάθε ομάδα), για την παρασκευή του Coomassie Brilliant Blue G-250, άγνωστο διάλυμα
- Δοκιμαστικοί σωλήνες, στήριγμα δοκιμαστικών σωλήνων, κυψελίδες, πιπέτες αυτόματες, σιφώνια
- Φασματοφωτόμετρο



# ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ BRADFORD


- Ζυγίζονται 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250.
- Προθέτονται 50 ml αιθανόλης 95%.
- Προσθέτονται αργά και προσεκτικά 100 ml φωσφορικού οξέος 85%. Ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης.
- Προστίθεται στο διάλυμα χρωστικής/αιθανόλης/φωσφορικού οξέος 850 ml απεσταγμένου νερού. (Φιλτράρετε τυχόν ιζήματα).
- Το αντιδραστήριο Bradford διατηρείται στους 4°C για μήνες σε γυάλινη σκούρα φιάλη.



# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

---

Παρασκευάζεται αραιωμένο διάλυμα όγκου 50 mL με αρραίωση του αντιδραστηρίου Bradford με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 4:1



Σε 6 δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται διάλυμα αλβουμίνης (0,05 mg/mL) απεσταγμένο νερό και αραιωμένο αντιδραστήριο Bradford σύμφωνα με τον Πίνακα της επόμενης διαφάνειας

| Σωλήνες | Διάλυμα Αλβουμίνης | Απ. Νερό |
|---------|--------------------|----------|
| ΤΥΦΛΟ   | -                  | 1,0 mL   |
| 1       | 0,2 mL             | 0,8 mL   |
| 2       | 0,4 mL             | 0,6 mL   |
| 3       | 0,6 mL             | 0,4 mL   |
| 4       | 0,8 mL             | 0,2 mL   |
| 5       | 1,0 mL             | -        |
| 6       | Άγνωστο (1mL)      | -        |

Προσθέτουμε  
Αντιδρ Bradford  
σε όλους ως  
εξής:

| Αντιδραστήριο Bradford (αραιωμένο) |
|------------------------------------|
| 5 mL                               |
| 5 mL                               |
| 5 mL                               |
| 5 mL                               |
| 5mL                                |
| 5 mL                               |
| 5 mL                               |

Αναμονή για 5 min και στη συνέχεια  
Μηδενίζουμε με το τυφλό και μετράμε την απορρόφηση στα 595 nm για τα πρότυπα  
(σωλήνες 1-5) και για το άγνωστο

# ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα, δεν υπολογίζεται ο όγκος του αντιδραστηρίου Bradford στο δείγμα

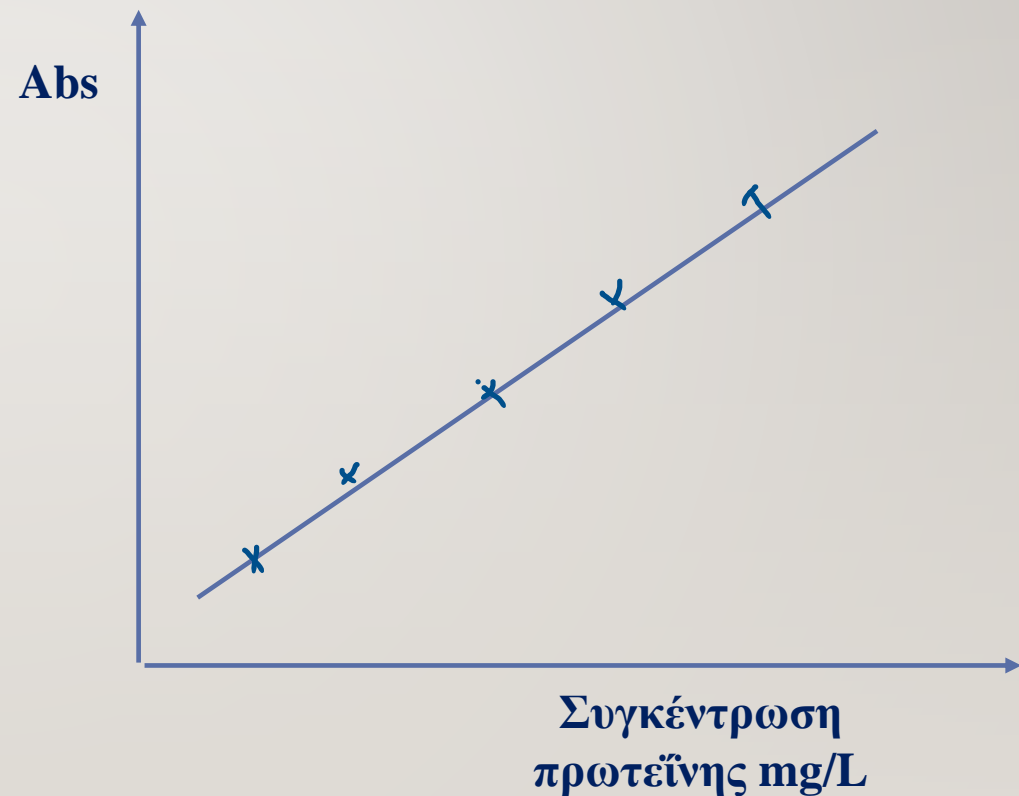
| Δείγμα  | Συγκέντρωση Πρωτεΐνης (mg/L) | Absorbance |
|---------|------------------------------|------------|
| 1       |                              |            |
| 2       |                              |            |
| 3       |                              |            |
| 4       |                              |            |
| 5       |                              |            |
| Άγνωστο |                              |            |



# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

- Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη (απορρόφηση συναρτήσει συγκέντρωσης).
- Από την εξίσωση της ευθείας της πρότυπης και την απορρόφηση του αγνώστου υπολογίζεται η συγκέντρωση του αγνώστου.



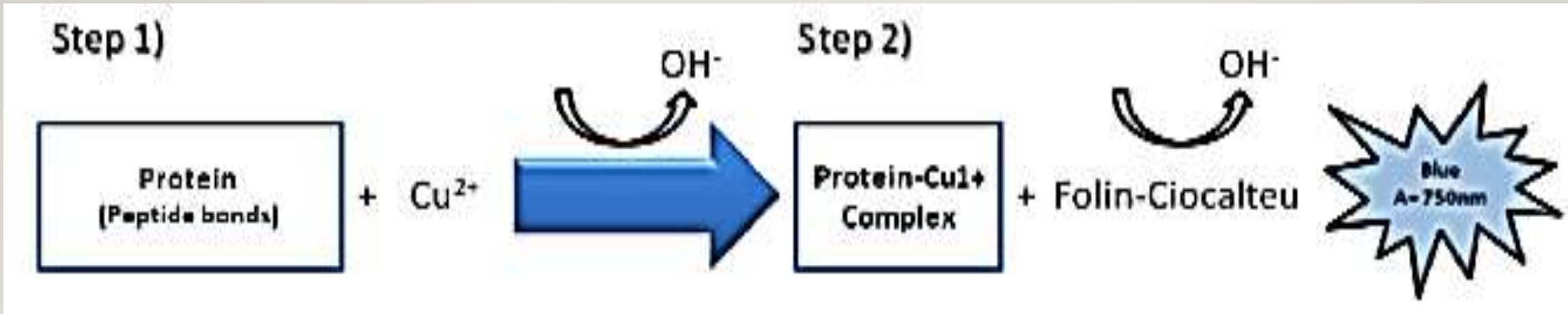
# ΜΕΘΟΔΟΣ LOWRY

---

- Μέθοδος Lowry είναι μια από τις πλέον ευαίσθητες μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά
- Ο βιοχημικός Oliver H. Lowry ανακάλυψε σχετικό αντιδραστήριο τη δεκαετία του 1940 κάνοντας δημοσίευση το 1951 με υψηλό αριθμό αναφορών, και από τότε η μέθοδος είναι ευρύτατα χρησιμοποιούμενη σε βιοχημικά εργαστήρια.

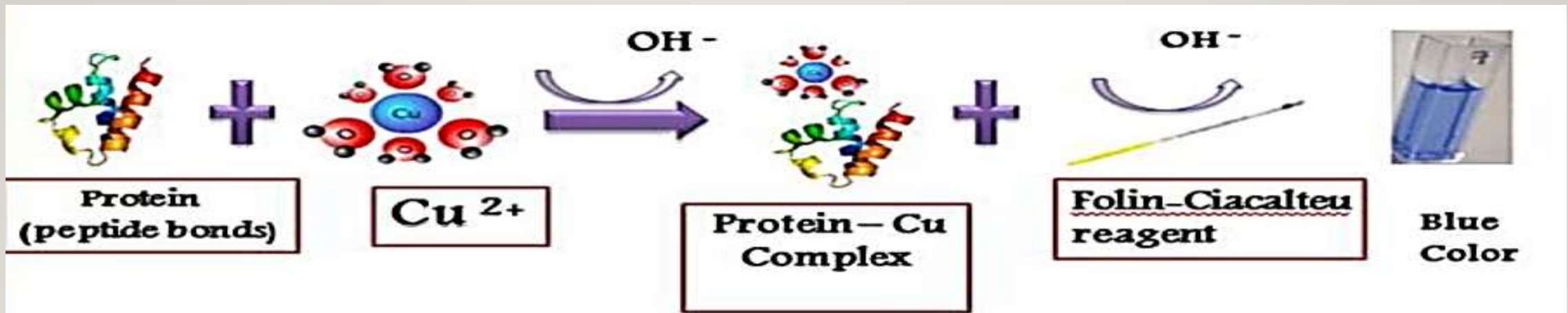
Η μέθοδος βασίζεται σε δύο χημικές αντιδράσεις

- Η πρώτη είναι η αντίδραση των ιόντων χαλκού με πρωτεΐνες σε αλκαλικές συνθήκες και ο σχηματισμός χηλικών συμπλόκων με βαθύ μπλε χρώμα
- Η δεύτερη είναι η αντίδραση του σχηματιζόμενου συμπλόκου με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (πολυφωσφομολυβδανικό και πολυφωσφοβολφραμικό οξύ).



## 2 αντιδράσεις που οδηγούν σε σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων

- **Αντίδραση Biuret** κατά την οποία  $\text{Cu}^{2+}$  αντιδρούν με πεπτιδικούς δεσμούς πρωτεϊνών κάτω από αλκαλικές συνθήκες με αποτέλεσμα να ανάγονται σε  $\text{Cu}^+$
- **Αντίδραση Lowry** το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αντιδρά με το σύμπλοκο πρωτεΐνης- $\text{Cu}^+$  σχηματίζοντας προϊόν με μπλε-μωβ χρώμα που απορροφά στα 650-700 nm

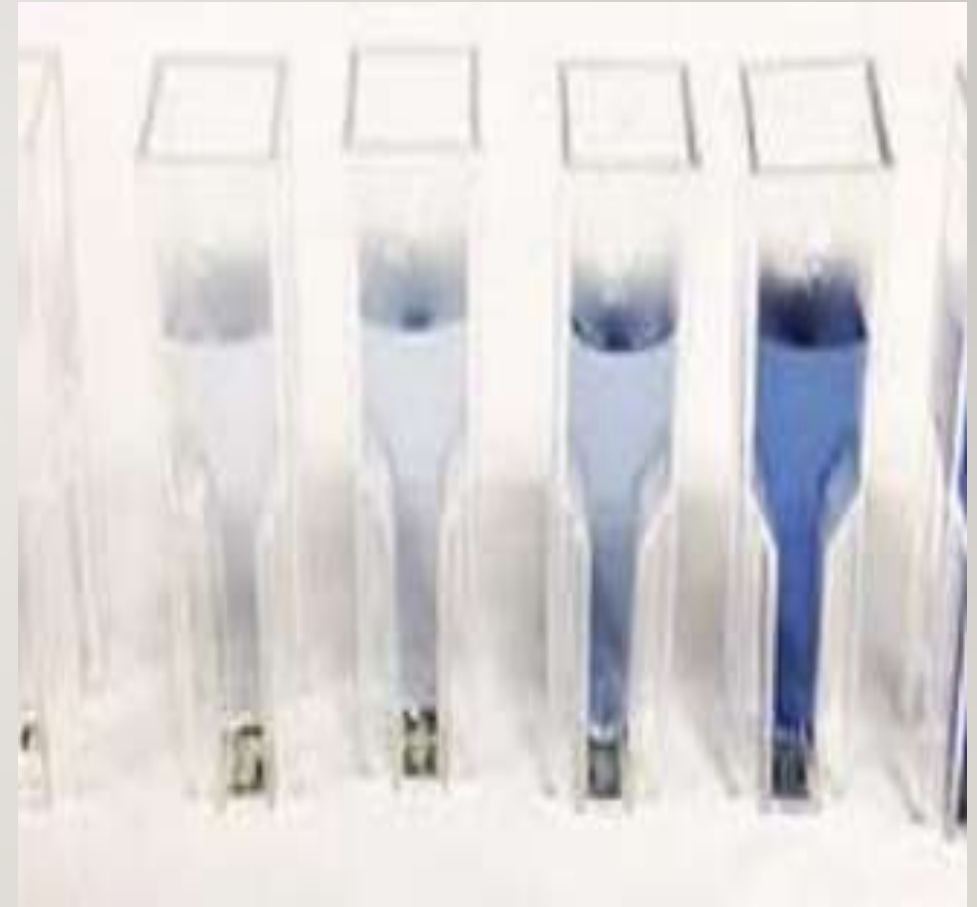


Στο παρόν πείραμα θα πραγματοποιηθεί  
παραλλαγή της μεθόδου Lowry με παράλειψη  
του σταδίου αναγωγής του αντιδραστηρίου  
Folin-Ciocoltean

(Κώστας Μπούρτζης Καθηγητής, Εύα Διονυσοπούλου Ε.Δι.Π.  
«Εργαστηριακές Ασκήσεις Περιβαλλοντικής Βιοχημείας», Τμήμα  
Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Αγρίνιο 2011

# ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΣΚΕΥΗ - ΟΡΓΑΝΑ

- Αλκαλικό διάλυμα Benedict (αντιδραστήριο Benedict και διάλυμα NaOH 4% σε αναλογία 1:5), στερεό κιτρικό νάτριο, στερεό άνυδρο ανθρακικό νάτριο, στερεός θειικός χαλκός, πρωτεϊνικό διάλυμα αλβουμίνης (1 mg/mL)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες, στήριγμα δοκιμαστικών σωλήνων, κυψελίδες, πιπέτες αυτόματες, σιφώνια
- Φασματοφωτόμετρο



# ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ BENEDICT

---

- Ζυγίζονται 173 g κιτρικού νατρίου και 100 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου και διαλύονται με θέρμανση και ανάδευση σε 600 mL απεσταγμένου νερού. Η θέρμανση συνεχίζεται μέχρι πλήρους διάλυσης.
- 17,3 g στερεού θειϊκού χαλκού διαλύονται σε 200 mL απεσταγμένου νερού με θέρμανση και ανάδευση.
- Τα διαλύματα αναμιγνύονται και το νέο διάλυμα που προκύπτει αραιώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 1000 mL

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Παρασκευάζονται 5 πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης ( σε d.H<sub>2</sub>O) συγκεντρώσεων 0,125mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL και 1 mg/mL και σε 6 δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται αντιδραστήρια σύμφωνα με τον παρακάτω Πίνακα:

| Νο Σωλήνα   | Διάλυμα πρωτεΐνης  | Αλκαλικό διάλυμα Benedict |
|-------------|--------------------|---------------------------|
| 1 (τυφλό)   | 1 mL (0.000 mg/mL) | 3 mL                      |
| 2           | 1 mL (0,125 mg/mL) | 3 mL                      |
| 3           | 1 mL (0,250 mg/mL) | 3 mL                      |
| 4           | 1 mL (0,500 mg/mL) | 3 mL                      |
| 5           | 1 mL (0,750 mg/mL) | 3 mL                      |
| 6           | 1 mL (1,000 mg/mL) | 3 mL                      |
| 7 (άγνωστο) | 1 mL               | 3 mL                      |

Ανάδευση σε  
Vortex  
Αναμονή 20 min

Μέτρηση  
Απορρόφησης  
στα 540 nm



# ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

| Νο Σωλήνα   | Διάλυμα πρωτεΐνης  | Abs<br>(540 nm) |
|-------------|--------------------|-----------------|
| 1 (τυφλό)   | 1 mL (0.000 mg/mL) |                 |
| 2           | 1 mL (0,125 mg/mL) |                 |
| 3           | 1 mL (0,250 mg/mL) |                 |
| 4           | 1 mL (0,500 mg/mL) |                 |
| 5           | 1 mL (0,750 mg/mL) |                 |
| 6           | 1 mL (1,000 mg/mL) |                 |
| 7 (άγνωστο) | 1 mL               |                 |

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

- Σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη.
- Από την εξίσωση ευθείας της πρότυπης και την τιμή απορρόφησης του αγνώστου, προσδιορίζεται η συγκέντρωση του αγνώστου.



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Βιοχημεία 6<sup>η</sup> ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ -1<sup>η</sup> ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ Reginald H. Garrett, Charles M. Grisham, Εκδόσεις Utopia, 2019
- Διαμαντής Σιδεράς, Αναπλ Καθηγητής, «Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας», Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Αθήνα 2023
- Κοντοπίδης Γεώργιος, Αναπλ Καθηγητής, «Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας», Τμήμα Κτηνιατρικής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2019
- Κώστας Μπούρτζης Καθηγητής, Εύα Διονυσοπούλου Ε.ΔΙ.Π. «Εργαστηριακές Ασκήσεις Περιβαλλοντικής Βιοχημείας», Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Αγρίνιο 2011
- <https://www.moleculardevices.com/applications/protein-detection-quantitation-and-analysis>
- <https://goldbio.com/documents/3604/Bardford%20Protein%20Assay.pdf>
- <https://www.creative-proteomics.com/resource/protocol-for-bradford-protein-assay.htm>
- <https://www.youtube.com/watch?app=desktop&v=7CTYSBkCNQQ>
- <https://www.youtube.com/watch?v=7o65va089S4>