



Određivanje koncentracije proteina kolorimetrijskom metodom

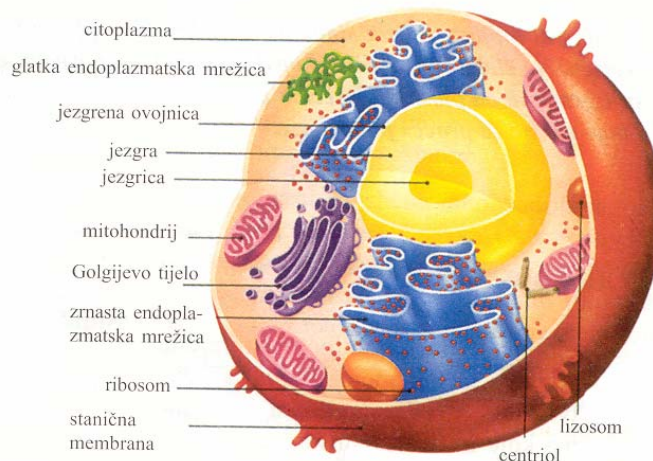
Metoda po Bradford-ovoj (1976)

Pribor i reagensi:

- BSA standard (albumin iz govedeg seruma, eng. Bovine Serum Albumin)
- rukavice
- mikropločice
- pipete
- CBB reagens (Coomasie Brilliant Blue)



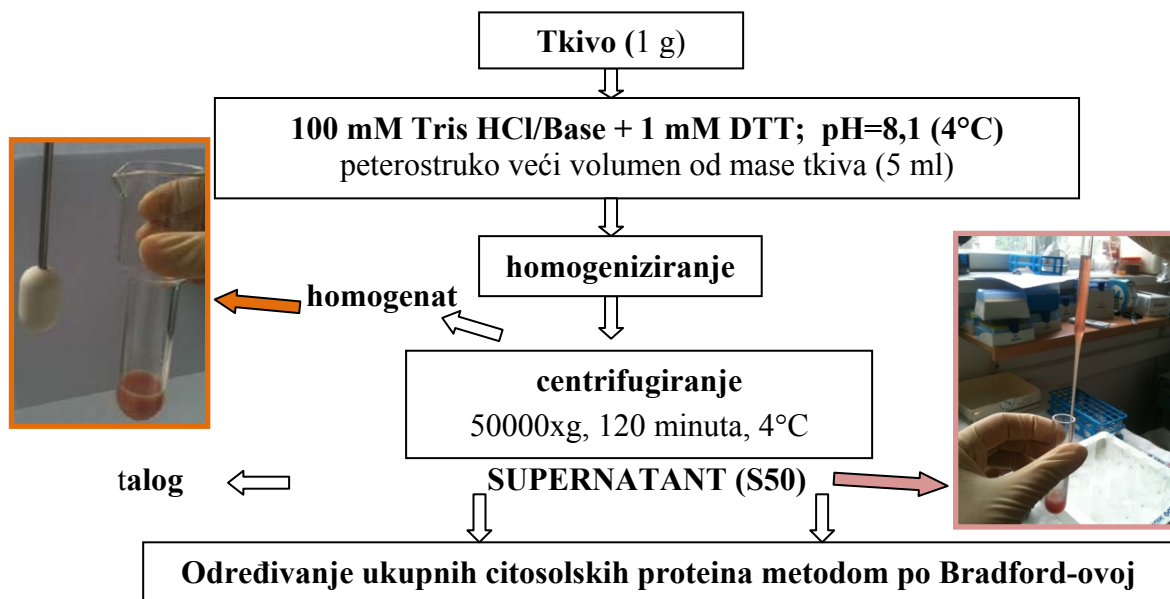
Narušavanjem normalne ravnoteže organizma vanjskim utjecajima dolazi do niza promjena, koje se mogu pratiti na razini populacije, tkiva ili stanice. Promjene na staničnoj razini utječu na sintezu ili funkciju proteina, zbog njihove uloge u odvijanju životnih procesa. **Time određivanje ukupnog sadržaja staničnih proteina predstavlja rani biopokazatelj antropogenih ili drugih utjecaja na indikatorski organizam u staništu u kome živi.** Jedna od metoda za kvantitativno određivanje staničnih proteina je kolorimetrijska metoda po Bradford-ovoj. Metoda se temelji na obojenju otopljenih proteina s reagensom Coomasie Brilliant Blue G-250 (CBB) pri čemu dolazi do vezanja anionske boje za NH_3 skupine proteina, što je praćeno promjenom boje reagensa (smeđa u plavu) i pojavom apsorpcijskog maksimuma kod 595 nm. **Koncentracije proteina se određuju u staničnom citosolu.**



Stanice su osnovne građevne jedinice tkiva koja tvore različite organe i organske sustave. Osnovni dijelovi eukariotske stanice koji se mogu uočiti svjetlosnim mikroskopom su jezgra i citosol. Unutar jezgre je smješten cjelokupni genetički materijal stanice, a u citosolu se nalaze svi organeli bitni za život stanice (mitohondriji, ribosomi, endoplazmatska mrežica, Golgijevo tijelo, lizosomi). Citosol ili citoplazma je osnovna supstanca koja ispunjava stanice. Sačinjava je 80% vode i obično je prozirna. **U citosolu se nalaze i proteini (uključujući enzime), vitamini, ioni, nukleinske kiseline i nukleoidi, aminokiseline, šećeri, ugljikohidrati, masne kiseline, itd.**



Točnost mjerenja ovisi o nizu postupaka kojima je svrha očuvati nativnu strukturu proteina.



Shematski prikaz obrade tkiva u svrhu odvajanja citosolske frakcije i određivanja ukupnih proteina

Na temelju linearne ovisnosti apsorbancije o sadržaju proteina, kvantitativno se određuje koncentracija proteina. **Nepoznate koncentracije proteina u uzorcima staničnog citosola se očitavaju iz kalibracijskog pravca načinjenog nizom razrjeđenja otopine albumina goveđeg seruma (BSA) i izražavaju kao mg proteina u ml citosola.**

