

	<p>Governo do Estado do Rio Grande do Norte Secretaria de Estado da Educação, da Cultura e dos Desportos - SECD UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN Faculdade de Ciências da Saúde - FACS Disciplina: Citologia e Organização Biomolecular 12 Créditos – 180h e-mail: wogel.uern@gmail.com fone: (84) 3318-3708 Mossoró –RN</p>	
	<p>ROTEIRO PARA AULA PRÁTICA Aula 2: Quantificação de Proteínas Totais pelo Método de Bradford</p>	

I. Introdução:

As proteínas desempenham papéis extremamente importantes, na maioria dos processos biológicos, atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através das membranas celulares e outros. O desenvolvimento de metodologias para determinar proteínas tem, cada vez mais, se tornado de fundamental relevância em várias áreas do conhecimento, como por exemplo, em análises clínicas.

O método de Bradford é uma técnica para determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “*Comassie brilliant blue*” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595nm.

II. Materiais e Reagentes

1. Amostra de Soro;
2. Solução do Reagente de Bradford (Diluído 4x);
3. Solução de Soro Albumina Bovina (BSA) (1 mg/mL).;
4. Água milli-Q autoclavada;
5. Microtubos;
6. Micropipetas.

III. Métodos:

1. Construir a curva padrão de proteínas utilizando-se como padrão Soro Albumina Bovina (BSA) (1 mg/mL). Para tanto, prepare as concentrações como descrito na Tabela 1;

Tabela 1. Procedimento para obtenção da curva padrão de proteínas utilizando-se como padrão BSA (1 mg/mL).

Concentração Protéica	Absorbância	Volume/BSA	Volume/H ₂ O	Reagente de Bradford
0 µg/mL		0 µL	50 µL	950 µL
5 µg/mL		5 µL	45 µL	950 µL
10 µg/mL		10 µL	40 µL	950 µL
15 µg/mL		15 µL	35 µL	950 µL
20 µg/mL		20 µL	30 µL	950 µL
30 µg/mL		30 µL	20 µL	950 µL
40 µg/mL		40 µL	10 µL	950 µL
50 µg/mL		50 µL	0 µL	950 µL

2. Diluir a amostra de soro (1:10) - 5 µL da Amostra + 45 µL de água milli-Q autoclavada;
3. Adicionar 950 µL do Reagente de Bradford;
4. Após a adição do Reagente de Bradford, levar cada microtubo ao vortex;
5. Aguardar de 10 – 15 minutos e efetuar a leitura no espectrofotômetro a 595 nm;
6. Após a leitura, plotar os dados em um gráfico do Excel.

IV. Questão Clínica Aplicada:

Como essa técnica pode auxiliar no diagnóstico clínico laboratorial, e em quais casos poderemos aplicá-la?