

27. Métodos para la cuantificación de proteínas

Emilio Fernández Reyes y Aurora Galván Cejudo

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

RESUMEN

En esta práctica se utilizarán tres métodos para la cuantificación de proteínas: Biuret, Bradford y BCA. Para cada uno de los métodos se realizarán: una curva estándar, el cálculo del coeficiente de extinción y el rango de sensibilidad. Se realizará la cuantificación de dos muestras problemas de baja y alta concentración, respectivamente, y se discutirá las ventajas e inconvenientes de cada uno de los métodos.

Palabras clave: cuantificación de proteínas, Biuret, Bradford, BCA

Abreviaturas: BCA: ácido bicinconínico

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Métodos para la cuantificación de proteínas: ventajas e inconvenientes

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una técnica de rutina básica cuando se aborda un esquema de purificación de una proteína concreta, cuando se quiere conocer la actividad específica de una preparación enzimática, para el diagnóstico de enfermedades, así como para otros muchos propósitos.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV, b) para la formación de derivados químicos, o c) la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes. En la Tabla I se recogen los métodos más usados así como sus respectivas sensibilidades. Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas e inconvenientes, las principales se recogen en la Tabla II.

Tabla I. Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad

Método	Rango de sensibilidad (μg)	Coefficiente de extinción o Cálculo de la concentración
Métodos de Absorción		
A_{280}	100-3000	$\epsilon_{280} = 1 \text{ mL/mg cm}$
A_{205}	3-100	$\epsilon_{205} = 31 \text{ mL/mg cm}$
$A_{280} - A_{260}$	100-3000	Proteína (mg/mL) = $(1.55A_{280} - 0.76A_{260})$
$A_{235} - A_{280}$	25-700	Proteína (mg/mL) = $(A_{235} - A_{280})/2.51$
$A_{224} - A_{236}$	5-180	Proteína (mg/mL) = $(A_{224} - A_{236})/0.6$
$A_{215} - A_{225}$	2-45	Proteína ($\mu\text{g/mL}$) = $144(A_{215} - A_{225})$
Métodos Derivados Colorimétricos		
Biuret	1000-10000	$\epsilon_{545} = 0.06 \text{ mL/mg cm}$
Lowry	25-100 a 500 nm 2-30 a 660 nm 1-2 a 750 nm	Usar curva estándar
Bradford	1-15	$\epsilon_{595} = 81 \text{ mL/mg cm}$
BCA	0.5- 10	Usar curva estándar
Métodos Derivados Fluorimétricos		
o-ftalaldehido	1-5 $\lambda_{\text{excitación}}$ a 340 nm $\lambda_{\text{emisión}}$ a 475 nm	Usar curva estándar

Tabla II. Principales métodos para la cuantificación de proteínas, principales ventaja e inconvenientes

Método	Ventajas	Inconvenientes
Métodos de Absorción	No se pierden las muestras	Interfieren muchos compuestos que absorben en el UV
Métodos Derivados Colorimétricos		
Biuret	Bastante específico para proteínas Muestra pocas interferencias Es barato	Tiene poca sensibilidad
Lowry	Tiene bastante sensibilidad	No todas las proteínas reaccionan igual Muestra muchas interferencias como detergentes no iónicos, sulfato amónico etc.
Bradford	Muy sensible	Muestra interferencias con detergentes
BCA	Es el método mas sensible Es el que muestra menos interferencias	
Métodos Derivados Fluorimétricos		
o-ftalaldehido	Muy sensible	La interferencia de aminas contaminantes en la muestra No todas las muestras reaccionan igual

1.2. Método de Biuret

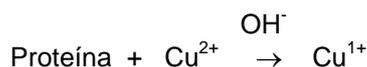
Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. 1Cu^{2+} se acompleja con 4 NH. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados (por ejemplo en suero).

1.3. Método de Bradford

Se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 μg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

1.4. Método de BCA

El ácido bicinconínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos.



1.5. Objetivos

Con esta práctica se pretende introducir al alumno en los diferentes métodos para la cuantificación de proteínas: su fundamento, sus ventajas e inconvenientes. Se utilizarán tres métodos (Biuret, Bradford y BCA), para cada uno de ellos se realizará una curva estándar, se determinará el coeficiente de extinción, el rango de sensibilidad, y se realizará la cuantificación de dos muestras problemas.

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

Tubos de ensayo

Pipetas de automáticas regulables de 20-100 μl y de 200-1000 μl

Espectofotómetro
 Agua destilada
 Soluciones estándar de proteína
 Reactivo de Biuret
 Reactivo de Bradford
 Reactivo de BCA

3. PROTOCOLO A REALIZAR

3.1. Método de Biuret

Añadir 1 ml del reactivo de biuret a los tubos estándar y muestras problemas preparadas como se indica en la Tabla III.

Dejar a temperatura ambiente y leer la Absorbancia a 545 nm frente al blanco. El color es estable 1 hora.

Tabla III. Protocolo tipo para la cuantificación de proteínas por el método de Biuret

Tubos	Reactivos			Resultados	
	Estándar (20 mg/ml)	H ₂ O	R. Biuret	A ₅₄₅ nm	[proteína]
Blanco	0 µl	100 µl	1 ml		
1	25 µl	75 µl	1 ml		
2	50 µl	50 µl	1 ml		
3	75 µl	25 µl	1 ml		
4	100 µl	0 µl	1 ml		
	Muestras				
M1	100 µl	0 µl	1 ml		
M2	100 µl	0 µl	1 ml		

- Representa la curva estándar.
- Calcula el coeficiente de extinción.
- Calcula las concentraciones de proteínas de las muestras M1 y M2.

3.2. Método de Bradford

Añadir 1 ml del reactivo de Bradford a los tubos estándar y muestras problemas preparadas como se indica en la Tabla IV.

Dejar a temperatura ambiente y leer Absorbancia a 595 nm frente al blanco. El color es estable 1 hora.

Tabla IV. Protocolo tipo para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Tubos	Reactivos			Resultados	
	Estándar (0,5 mg/ml)	H ₂ O	R. Bradford	A ₅₉₅ nm	[proteína]
Blanco	0 µl	100 µl	1 ml		
1	25 µl	75 µl	1 ml		
2	50 µl	50 µl	1 ml		
3	75 µl	25 µl	1 ml		
4	100 µl	0 µl	1 ml		
	Muestras				
M1	100 µl	0 µl	1 ml		
M2	100 µl	0 µl	1 ml		

- Representa la curva estándar.
- Calcula el coeficiente de extinción.
- Calcula las concentraciones de proteínas de las muestras M1 y M2.

3.3. Método de BCA

Añadir 1 ml del reactivo de trabajo de BCA a los tubos estándar y muestras problemas preparadas como se indica en la Tabla V.
Incubar 10 min a 60 °C y leer Absorbancia a 562 nm frente al blanco.

Tabla V. Protocolo estándar para la cuantificación de proteínas por el método de BCA

Tubos	Reactivos			Resultados	
	Estándar (0,1 mg/ml)	H ₂ O	R. BCA	A ₅₆₂ nm	[proteína]
Blanco	0 µl	100 µl	1 ml		
1	25 µl	75 µl	1 ml		
2	50 µl	50 µl	1 ml		
3	75 µl	25 µl	1 ml		
4	100 µl	0 µl	1 ml		
	Muestras				
M1	100 µl	0 µl	1 ml		
M2	100 µl	0 µl	1 ml		

- Representa la curva estándar.
- Calcula el coeficiente de extinción.
- Calcula las concentraciones de proteínas de las muestras M1 y M2.

3.4. Compuestos que interfieren en la determinación de proteínas

Repetir las curvas estándar para cada uno de los tres métodos pero incluyendo se pueden incluir :

- 10 µl de 1M EDTA ,
- 10 µl de Tritón X-100, ó
- 10 µl de SDS 20%

Determinar cómo estos compuestos afectan a la cuantificación de proteínas por uno u otro método.

4. RESULTADOS ESPERADOS

El método de Biuret (poco sensible) permitirá cuantificar la cantidad de proteínas en la muestra M1 pero no en la M2. Por el contrario los métodos mas sensibles (Bradford y BCA) permitirán cuantificar la muestra M2, pero la M1 se saldrá de rango. Para poder cuantificar la muestra M1 haría falta hacer diluciones de la misma.

5. EJERCICIOS, DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

- ¿Qué método es el más sensible?, y ¿el menos sensible?.
- ¿Qué problemas tienes para determinar la concentración de proteínas de las muestras M1 o M2. con cada una de estos métodos?. ¿Cómo lo resolverías?.
- Discute tus resultados de acuerdo con los datos de la Tabla VI .

- Decide qué método de determinación de proteínas elegirías para la cuantificación de proteínas en: suero, orina, LCR, durante una purificación enzimática, en un extracto bacteriano concentrado, en preparaciones de membranas plasmáticas solubilizadas con SDS, en preparaciones de membranas mitocondriales solubilizadas con Tritón X-100.

Tabla VI. Algunos compuestos que interfieren en la determinación de proteínas

Compuesto	Interferencia en el Método de BCA	Interferencia en el Método de Lowry
50 mM EDTA	Si	Si
4 M Cloruro de guanidina	No	Si
1% Triton X-100	No	Si
40% Sacarosa	No	Si
20% Sulfato amónico	Si	Si
3% Sulfato amónico	No	Si

ANEXO 1: REACTIVOS

Reactivo de Biuret

Reactivo preparado del siguiente modo. Disolver 3,8 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6,7 g NaEDTA en 700 ml de H_2O . Mientras se agita añadir 200 ml de NaOH 5N y luego 1g de KI como estabilizante. Guardar en frasco de plástico.

Reactivo de Bradford

Reactivo preparado del siguiente modo: mezclar 10 mg de Comassie Blue G-250 con 10 ml de fosfórico al 88% y 4,7 ml de etanol absoluto. Añadir H_2O hasta 100 ml. Filtrar a través de papel de filtro y guardar en la oscuridad.

Reactivo de BCA

Reactivo preparado del siguiente modo.

Reactivo A: BCA 1%, Na_2CO_3 2%, tartrato sódico 0,16%, NaOH 0,4% y NaHCO_3 0,95%. Ajustar a pH 11,25 con NaOH.

Reactivo B: CuSO_4 al 4%

Reactivo de trabajo: mezclar 100 volúmenes de A con 2 volúmenes de B.

Soluciones estándar de proteínas

Seroalbúmina bovina 20 mg/ml

Seroalbúmina bovina 0,5 mg/ml

Seroalbúmina bovina 0,1 mg/ml

Muestras M1 y M2

La muestra M1 debe tener una concentración de proteínas entre 10 – 20 mg/ml

La muestra M2 debe tener una concentración de proteínas entre 0,1- 0,5 mg/ml

6. BIBLIOGRAFÍA

Bradford MM (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.

Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.

Sueller CH (1985): *A Practical guide to enzymology*, Editorial, John Wiley & Sons, New York.