**BRADFORD ASSAY**

* 1. **Genel Bilgiler**
* Bradford yöntemi, protein ölçümü için en çok kullanılan kolorimetrik (renk ölçümüne bağlı) assaydir.
* Yöntem, Coomassie® emiliminin asidik pH'ta protein bağlanmasından sonra maksimum 470 nm'den 595 nm'ye kaymasının gözlemlenmesine dayanır (Şekil 1).

A diagram of a neutral reaction

Description automatically generated

Şekil 1: pH bağımlı Coomassie ® Brilliant Blue G 250 absorbsiyonu, emilimi

* Bilinmeyen bir numunenin protein konsantrasyonu, bir kalibrasyon eğrisi yardımıyla belirlenebilir. Kolorimetrik reaksiyon, aromatik ve bazik amino asitlerin içeriğine bağlıdır.
* Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için standart olarak sığır serum albümininin (BSA) kullanılması önerilir.

**Bu yöntemin avantajları:**

* Hızlı
* Hassas
* Protein spesifik
* Stable dye protein complexes (Sabit boya protein kompleksleri, protein kompleksleri için sabit boya) ??
  1. **Gerekli Ek Ekipmanlar**
* 1,5 ml ve 15 ml numune tüpleri
* Tüplerin 12.000xg'de santrifüjlenmesi için uygun santrifüj
* Vortex
* 595 nm dalga boyunda ölçüme ve mikroküvet kullanımına uygun fotometre
* Mikrotiter plate tahlinde kullanabilmek için için ELISA-Okuyucu
* Plastik küvet (Quartz küvet olmamalı çünkü boya yüzeye tutunabilir)
  1. **Saklama Koşulları**
* Bradford Reagentının önerilen saklama sıcaklık aralığı +2°C ile +8°C arasıdır.
* Bu saklama koşulları altında, açılmamış reagent etiket üzerindeki yer alan son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

1. **Bradford Assay Prosedürü**
   1. **Micro Assay (1 – 25 μg Protein)**
      1. **Solüsyonların Hazırlanması**

* Bradford micro assay için 5x Bradford Reagent **seyreltilmeden** kullanılır.
* Lütfen reagentin bulunduğu şişeyi birkaç kez ters çevirerek **yavaşça** karıştırın.

**Çözeltiyi karıştırmak için şişeyi sallamayın!**

* Gereken reagent miktarını ölçüp alın ve kullanmadan önce oda sıcaklığına getirin.
* Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için referans protein şu şekilde seyreltilmelidir**: 5, 10, 15, 20, 25 μg/ml.**
* Assay **üçlü** determinasyon olarak gerçekleştirmelidir.
* Kalibrasyon eğrisi her test serisi için yeniden oluşturulmalıdır.
  + 1. **Referans Solüsyonların Hazırlanması**

**A table with numbers and text

Description automatically generated with medium confidence**

* Protein standartları, protein numunesi için kullanılan **aynı buffer** ile seyreltilmelidir.
  + 1. **Protein Miktarını Belirleme Prosedürü**
* Assayi üçlü determinasyon olarak gerçekleştirin.

800 μl distile su

+ buffer for blank ?

+ referans solüsyonlar

+örnekler

Test tüpleri içerisinde pipete edilir

↓

200 μl **5x Bradford Reagent** eklenir

↓

Test tüpleri kapatılır

↓

Test tüpleri vortekslenir

↓

**5 dakika** oda sıcaklığında inkübe edilir

↓

Solüsyonlar küvetlere transfer edilir

30 dakika içerisinde absorbance (optik yoğunluk) 595 nm (A595nm)’de ölçülür

* + 1. **Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması**
* Assayden elde edilen absorbans sonuçlarıyla bir tablo oluşturun.
* Referans protein çözeltileri için elde edilen değerlerden, bilinmeyen numunedeki protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan bir kalibrasyon eğrisi oluşturun.

**Tablo 1,** BSA ile bir kalibrasyon eğrisi oluşturmak için örnek absorbans sonuçlarını göstermektedir (örnekler distile H2O içinde çözüldü/seyreltildi)

**Grafik 1,** sonuç olarak ortaya çıkan kalibrasyon eğrisini göstermektedir.

**Tablo 1: BSA referans solüsyonlarının assay veri tablosu örneği**

A table with numbers and symbols

Description automatically generated

**Grafik 1:** Tablo 1'deki assay verilerinden yapılan BSA kalibrasyon eğrisi.

Bu standart eğri, üçlü noktalarda standart olarak BSA kullanılarak üretildi.

Veriler, R2 değeri 0.9941 olan y = 0.0342x + 0.0357 satırı ile doğrusal regresyona uygundur.

A graph of calibration

Description automatically generated

Hesaplama, referans solüsyonların lineer (doğrusal) regresyonu ve ardından regresyon denklemi aracılığıyla örnek solüsyonların protein konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değerlerinin dönüşümü ile yapılır.

Not:

Aşağıdaki (below yazmış ama bence üstteki) veriler bir kalibrasyon eğrisinin yerine kullanılmamalıdır. Her assayde BSA referans solüsyonlarının absorbansı burada sunulanlardan farklı olacaktır.

* 1. **Macro Assay (100 – 1000 μg/ml protein)**
     1. **Solüsyonların Hazırlanması**
* Lütfen reagentin bulunduğu şişeyi birkaç kez ters çevirerek yavaşça karıştırın.

**Çözeltiyi karıştırmak için şişeyi sallamayın!**

* Gereken reagent miktarını ayırın ve kullanmadan önce oda sıcaklığına getirin.
* Makro testi gerçekleştirmek için 5x Bradford Reagentini 1:5 (hacimce 1 kısım artı hacme göre 4 kısım H2O bidest (double distilated water)) seyreltin ve solüsyonu filtreleyin.

Anladığım 🡪 1 hacim 5x Bradford Reagentı, 4 hacim iki kere distile edilmiş su ile dilüe et ve solüsyonu filtrele.

* 1x Bradford çözümü oda sıcaklığında 1 hafta saklanabilir.
* Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için referans protein şu şekilde seyreltilmelidir: **100, 125, 250, 500, 1000 μg/ml.**
* Assay, **üçlü** determinasyon olarak gerçekleştirilir.
* Kalibrasyon eğrisi her test serisi için **yeni** oluşturulmalıdır.
  + 1. **Referans Solüsyonların Hazırlanması**

A table with numbers and a label

Description automatically generated with medium confidence

* Protein standartları, protein numunesi için kullanılan **aynı buffer** ile seyreltilmelidir.
  + 1. **Protein Miktarını Belirleme Prosedürü**
* Assayi üçlü determinasyon olarak gerçekleştirin.

100 μl distile su

+ buffer for blank ?

+ referans solüsyonlar

+örnekler

Tüp içerisinde pipete edilir

↓

**5 ml 1x Bradford Reagent** eklenir

↓

Test tüpleri kapatılır

↓

Test tüpleri vortekslenir

↓

**5 dakika** oda sıcaklığında inkübe edilir

↓

Solüsyonlar küvetlere transfer edilir

30 dakika içerisinde absorbance (optik yoğunluk) 595 nm (A595nm)’de ölçülür

* + 1. **Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması**
* Assayden elde edilen absorbans sonuçlarıyla bir tablo oluşturun.
* Referans protein çözeltileri için elde edilen değerlerden, bilinmeyen numunedeki protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan bir kalibrasyon eğrisi oluşturun.
* **Tablo 2,** BSA ile bir kalibrasyon eğrisi oluşturmak için örnek absorbans sonuçlarını göstermektedir (örnekler dist. H2O içinde çözüldü/seyreltildi)
* **Grafik 2,** sonuç olarak ortaya çıkan kalibrasyon eğrisini göstermektedir.

**Table 2:** **BSA referans solüsyonlarının assay veri tablosu örneği**

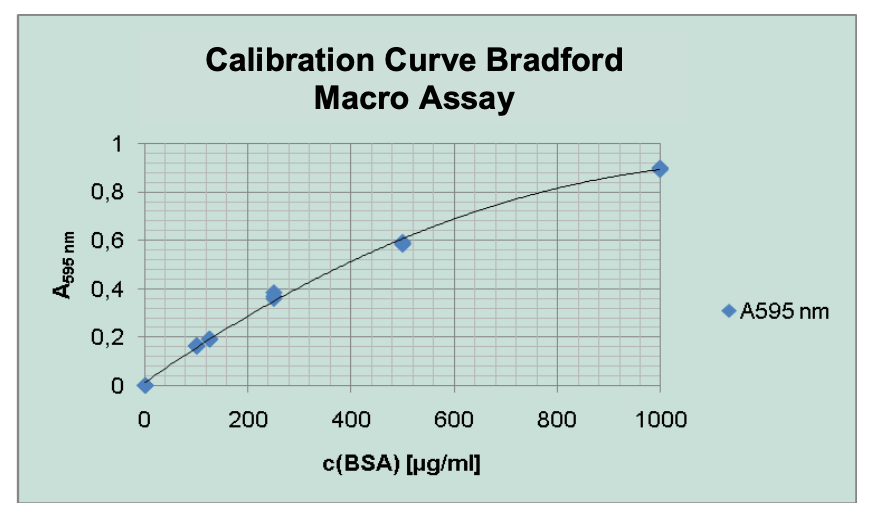
**A table with numbers and a few words

Description automatically generated with medium confidence**

**Grafik 2: Tablo 2'deki assay verilerinden yapılan BSA kalibrasyon eğrisi.**

Bu standart eğri, üçlü noktalarda bir standart olarak BSA kullanılarak üretildi.

Veriler, y = -5\*10-7x2 + 0,0014x + 0,0205 satırına göre polinom regresyonuna uygundur ve R2 değeri 0,9979'dur.



Hesaplama, referans çözeltilerin polinom regresyonu ve ardından örnek çözeltilerin protein konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değerlerinin regresyon denklemi aracılığıyla dönüştürülmesiyle yapılır.

**Not:**

Aşağıdaki veriler bir kalibrasyon eğrisinin yerine kullanılmamalıdır. Her assayde BSA referans solüsyonlarının absorbansı burada sunulanlardan farklı olacaktır.

* 1. **Microtiter Plateler Kullanalarak Protein Miktarının Belirlenmesi**
     1. **Solüsyonların Hazırlanması**
* Lütfen reagentin bulunduğu şişeyi birkaç kez ters çevirerek **yavaşça** karıştırın.

**Çözeltiyi karıştırmak için şişeyi sallamayın!**

* Gereken reagent miktarını ölçüp alın ve kullanmadan önce oda sıcaklığına getirin.
* Testi microtitre platelerde gerçekleştirmek için 5x Bradford Reaktifi 2:7,5'i seyreltin (hacimce 2 kısım artı hacme göre 5,5 kısım H2O bidest.).
* Anladığım 🡪 2 hacim 5x Bradford Reagent + 5.5 hacim çift distile edilmiş H2O
* Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için referans protein şu şekilde seyreltilmelidir: 20, 30, 40, 50, 60, 80 ve 100 μg/ml.
* Assay, üçlü determinasyon olarak gerçekleştirilir.
* Kalibrasyon eğrisi her test serisi için **yeni** oluşturulmalıdır.
  + 1. **Referans Solüsyonların Hazırlanması**

A table with numbers and text

Description automatically generated with medium confidence

* + 1. **Örnek Seyreltme (Dilüsyon)**

**Lütfen** testten önce örneği seyreltin.

Örnek:

1:20 dilüsyon: 10 µl örnek + 190 µl seyreltici

1:40 dilüsyon: 5 µl örnek + 195 µl seyreltici

* + 1. **Protein Miktarını Belirleme Prosedürü**
* Assayi üçlü determinasyon olarak gerçekleştirin.

50 μl distile su

+ buffer for blank ? (BSA?)

+ referans solüsyonlar

+örnekler

Microtiter plate’in wellleri içerisinde pipete edilir

↓

**200 μl 2:7.5 Bradford Reagent** eklenir

↓

**5 dakika** oda sıcaklığında inkübe edilir

↓

30 dakika içerisinde absorbance (optik yoğunluk) 595 nm (A595nm)’de ölçülür

* + 1. **Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması**

Tahlilden elde edilen absorbans sonuçlarıyla bir tablo oluşturun. Referans protein çözeltileri için elde edilen değerlerden, bilinmeyen numunedeki protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan bir kalibrasyon eğrisi oluşturun.

1. **Kaynaklar**

• **Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method fort he quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72: 248-254.

• **Compton, S.J. and Jones, C.J.** Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. Anal. Biochem. 1985; 151: 369-374.

• **Davies, E.M.** Protein assays: A review of common techniques. Amer. Biotech. Lab. 1988; July 28-37.

**Regresyon Nedir?**

* İki veya daha fazla değişken arasındaki ilişkiyi analiz etme metodudur.
  + x – Bağımsız değişken
  + y – Bağımlı değişken

Doğrusal Regresyon

Bence Excel de de yapılabilir 🡪 Youtube

R Studio – Belki daha rahat anlaşılır

<https://www.datasciencearth.com/r-uygulamalari-bolum-1-basit-dogrusal-regresyon-analizi/>

<https://www.datasciencearth.com/r-uygulamalari-bolum-7-dogrusal-olmayan-regresyon-modelleri/>

Phyton – Bilmiyorum

<https://medium.com/codeai/regresyonanalys-9863ed85fa52>

**Micro Bradford Assay için R Studio’da Doğrusal Regresyon Grafiği Oluşturma (Tablo 1)**

**Kaynak 🡪** [**https://rforbiochemists.blogspot.com/2015/04/lets-draw-graph-of-protein-assay.html**](https://rforbiochemists.blogspot.com/2015/04/lets-draw-graph-of-protein-assay.html)

**Örnek Tablo 🡪**

A table with numbers and symbols

Description automatically generated

**Kod 🡪**

#....Micro Bradford Assay için R Studio’da Doğrusal Regresyon Grafiği Oluşturma (Tablo 1)

#

#....Kaynak - https://rforbiochemists.blogspot.com/2015/04/lets-draw-graph-of-protein-assay.html

#

#....Elimizde 1, 5, 10, 15, 20 ve 25 Konsantrasyonlarında ölçülmüş değerler var

#....3 tekrar yaptığımız için her bir konsantrasyonda elde ettiğimiz 3 farklı A595nm değerinin

#.......ortalamasını alacağız.

#....Bunun için önce vektör oluşturup sonra mean fonksiyonundan yararlanacağız.

#....Kendi bulduğunuz değerleri aşağıdaki c parantezi içine yazmalısınız.

#....Protokolde yer alan değerleri girdim deneme amaçlı ancak ordaki grafikte 8 farklı değer

#.......bulunduğu için R square değeri farklılık gösterdi.

#

#

#....Vektör Oluşturma:

A1 <- c(0.066,0.068,0.067)

A5 <- c(0.224,0.225,0.222)

A10 <- c(0.402,0.410,0.406)

A15 <- c(0.573,0.569,0.570)

A20 <- c(0.720,0.705,0.710)

A25 <- c(0.851,0.892,0.860)

#

#....Ortalama Bulma:

MA1 <- mean(A1)

MA5 <- mean(A5)

MA10 <- mean(A10)

MA15 <- mean(A15)

MA20 <- mean(A20)

MA25 <- mean(A25)

#

#....Ortalama Değerlerimizi Bulduk

#....Şimdi yukarıdaki kaynaktan faydalanacağız

#....y eksenimiz absorbsiyon, x eksenimiz konsantrasyon

#....Protein Konsantrasyonları için tekrar vektör oluşturuyoruz

#

#....Protein Concentrations

PC <- c(1,5,10,15,20,25)

#....Protein Absorbtion

PA <- c(MA1,MA5,MA10,MA15,MA20,MA25)

#....Basit bir grafik çizelim (abs-PC, prot-PA)

plot(PA~PC)

#....Plotumuz sağ alt frame de görülüyor ancak bazı eklemeler yapmamız lazım

#....Bu yüzden kaynakta yer alan verileri kendi istediğimiz verilere göre düzenliyoruz

#Calculate the line using the linear model function

line <- lm(PA~PC)

#Draw the line

abline(line)

#Improve the graph:

plot(PA~PC,

xlab = "c(BSA) [microg/ml]",

ylab = "Absorbance (595nm)",

main = "Calibration Curve Bradford Micro Assay 3rd August 2023")

abline(line)

#....Bundan sonrasını bilgi birikimimi aşıyor

r2 <- round(summary(line)$r.squared, 3)

mylabel = bquote(italic(R)^2 == .(format(r2, digits = 3)))

text(x = 20, y = 0.3, labels = mylabel)

#Equation of a line y = mx + c

#In our case abs = slope \* prot + intercept

# ukn.prot = (abs - intercept)/slope

int <- summary(line)$coefficients[1]

slope <- summary(line)$coefficients[2]

mylabel = bquote(y == .(format(slope, digits = 3))\*x + .(format(int, digits = 3)))

text(x = 20, y = 0.4, labels = mylabel)

#....BİLİNMEYEN PROTEİN ABSORBSİYONLARI İÇİN KODLAR

#....AŞAĞIDAKİ abs.unknown kısmına kendi proteinlerimizin değerlerini yazacağız

#....burada 0.554,0.568 ve 0.705 örnek bilinmeyen protein değerleri

#now calculate some unknown protein concs from absorbances

#put the unknowns into a vector

abs.unknowns <- c(0.554, 0.568, 0.705)

#rearrange the equation of the line to ukn.prot = (abs - intercept)/slope

prot.unknowns <- (abs.unknowns - int)/slope

#put the answers on the graph

text(x = 5, y = (0.7), "Abs")

text(x = 10, y = (0.7), "Prot")

for (i in 1:length(abs.unknowns)){

text(x = 5, y = (0.7 - i/20), abs.unknowns[i])

text(x = 10, y = (0.7 - i/20), round(prot.unknowns[i], 3))

}

#....İstenildiği taktirde grafikte estetik değişiklikler yapılabilir.

#....END OF SCRIPT

****