

56. Dosagem de proteína – Coomassie blue

Protocolo Microplacas:

1. Diluir amostra para ser testada em PBS, realizar pelo menos duas diluições (1:10 e 1:100),
2. Diluir a amostra padrão, ver quadro abaixo,
3. A solução usada para realizar as diluições da amostra teste e dos padrões deve ser a mesma,
4. Filtrar a solução estoque de Coomassie Blue. O precipitado pode interferir com o resultado do teste,
5. As amostras devem ser testadas em triplicata. Utilizar uma microplaca de 96 cavidades de ELISA,
6. Pipetar 50 µL/poço de cada diluição PADRÃO ou das amostras TESTE na microplaca. Cuidado para não contaminar as ponteiros,
7. Adicionar 250 µL/poço do reagente Coomassie Blue em cada orifício e agitar por 30 segundos,
8. Incubar a placa por 10 minutos a temperatura ambiente,
9. Medir a absorbância a 590nm,
10. Estabelecer a curva padrão. Calcular a média entre as repetições, após subtrair a média do “branco” de todas as médias das amostras padrão. Plotar o seguinte gráfico usando o Microsof Excell: *µg/mL do padrão vs média da absorbância*. Estabelecer a equação de regressão e o r^2 para o gráfico,
11. Considerar válida a placa se os valores das repetições variarem muito e somente quando o r^2 for superior 0.92.
12. Calcular os valores das amostras testes. Para isso calcule a média entre as repetições das amostras testes, após subtraia o valor da média da amostra padrão “branco” do valor obtido das amostras testes.
13. Baseado na equação obtida realizar o cálculo da concentração de proteínas nas amostras testes.

- Padrão utilizado: Albumina Sérica Bovina (BSA) 2mg/mL
(diluição da albumina: 10mg albumina em 5mL de H₂O destilada)

- Preparo dos Padrões: volume total = 50 μ L

Padrão	Vol Diluente	Vol BSA	[] Final
A	0	300 μ L estoque	2000 μ L/mL
B	125 μ L	375 μ L estoque	1500 μ L/mL
C	325 μ L	325 μ L estoque	1000 μ L/mL
D	175 μ L	175 μ L B	750 μ L/mL
E	325 μ L	325 μ L C	500 μ L/mL
F	325 μ L	325 μ L E	250 μ L/mL
G	325 μ L	325 μ L F	125 μ L/mL
H	400 μ L	100 μ L G	25 μ L/mL
I (BRANCO)	400 μ L	0	0 μ L/mL

- Preparar a curva padrão representando a medida média corrigida a 590nm do Branco versus sua concentração em μ g/mL. Usar a curva padrão para determinar a concentração de proteína de cada amostra não-conhecida.