Metoda Bradfordové je jednou z metod používaných k stanovení koncentrace bílkovin. Existuje několik dalších metod, jako je Kjeldahlova metoda, biuretova metoda, BCA metoda nebo Lowryho metoda. V rámci tohoto úkolu jsme se zaměřili právě na metodu Bradfordové.

Princip této metody spočívá ve vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu. Tato vazba způsobuje posun absorpčního maxima z 464 nm na 595 nm. Měření absorbance při 595 nm slouží jako indikátor koncentrace bílkovin v analyzovaném vzorku.

Pro získání co nejpřesnějších výsledků je důležité, aby standardní roztok bílkoviny měl podobné složení jako testovaný vzorek. Citlivost metody Bradfordové se udává jako 1 mg/ml a je ovlivněna obsahem bazických a aromatických aminokyselin.

Je třeba poznamenat, že spolehlivost metody Bradfordové je nižší než u BCA metody, kvůli negativnímu působení detergentů, jako je SDS nebo Triton. Tyto látky mohou ovlivnit výsledky a snížit přesnost měření.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Zákal (%)** | **Vs (mg)** | **V (mg)** |
| 90 | 13853,3 | 13841,3 |
| 80 | 14393,2 | 14381,3 |
| 70 | 13103,7 | 13092,0 |
|  |  |  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| *Bacillus subtilis* | | | |
| **Zákal (%)** | **Hmotnost bakteriální sušiny (mg/ml)**  **1. skupina** | **Hmotnost bakteriální sušiny (mg/ml)**  **2. skupina** | **Hmotnost bakteriální sušiny (mg/ml)**  **průměr** |
| 90 | 0,55 | 0,65 | 0,60 |
| 80 | 0,50 | 2,50 | 1,50 |
| 70 | 0,40 | 13,6 | 7,00 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Zkumavka č.** | **Koncentrace albuminu**  **(μg/ml)** | **Absorbance**  **(1. skupina)** | **Absorbance**  **(2. skupina)** | **Absorbance (průměr)** |
| 1 | 0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2 | 200 | 0,188 | 0,151 | 0,1695 |
| 3 | 400 | 0,321 | 0,285 | 0,303 |
| 4 | 600 | 0,433 | 0,450 | 0,4415 |
| 5 | 800 | 0,585 | 0,495 | 0,540 |
| 6 | 1000 | 0,687 | 0,611 | 0,649 |

Průměrná hmotnost bakteriální sušiny Bacillus subtilis při různých stupních zákalu je následující: při 90% zákalu je 0,60 mg/ml, při 80% zákalu je 1,50 mg/ml a při 70% zákalu je 7,00 mg/ml. Rozdíly mezi hodnotami v první a druhé skupině mohou být způsobeny nepřesným pipetováním kultury do váženek nebo chybou při vážení.

Koncentrace bílkovin stanovená pomocí metody Bradfordové při různých stupních zákalu je následující: při 90% zákalu je 130,167 μg/ml, při 80% zákalu je 74,334 μg/ml a při 70% zákalu je 48,500 μg/ml. Rozdíly mezi skupinami mohou být způsobeny chybou při pipetování vzorku.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| *Bacillus subtilis* | | | | | |
| **Zákal**  **(%)** | **Absorbance**  **1. skupina** | **Absorbance**  **2. skupina** | **Koncentrace bílkovin (μg/ml)**  **1. skupina** | **Koncentrace bílkovin (μg/ml)**  **2. skupina** | **Koncentrace bílkovin (μg/ml)**  **průměr** |
| 90 | 0,132 | 0,083 | 171,000 | 89,333 | 130,167 |
| 80 | 0,106 | 0,042 | 127,667 | 21,000 | 74,334 |
| 70 | 0,080 | 0,037 | 84,333 | 12,667 | 48,500 |