

Cuantificación de Proteínas

Métodos para Cuantificar Proteínas

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 (µg/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

Ventajas e inconvenientes de los diferentes Métodos

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

Método Biuret

- * 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).

Método de Bradford

- * 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.

Método BCA

- * El ácido bicinconínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con inones 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.