**Cuantificación de proteínas, método de Bradford**

Protocolo para medir proteínas con el reactivo de Bradford para leer en nanodrop. Si se va a leer en espectrofotómetro normal, el volumen final debe ser 1 mL y el estándar de albúmina no estar diluido 1:5.

Se necesita:

* Estándar de albúmina 1:5
* Bradford 1X Bio-Rad
* Agua (para el blanco)
* Tubos Eppendorf o placa de 96 para hacer las diluciones

**Protocolo**

1. Preparación del estándar de albúmina
   1. Se puede partir de una dilución de albúmina más concentrada. Diluir de manera que quede entre 1.5 y 2 µg/µL. Para determinar la concentración real de la dilución de albúmina, colocar 2 µL de la solución preparada y medir absorbancia a 280 nm.
   2. Aplicar la siguiente fórmula para calcular la concentración de albúmina



**El estándar ya preparado está a 1.71 µg/µL**

1. Preparación de la curva estándar
   1. Para preparar la curva estándar, es necesario tener el estándar de albúmina diluido 1:5 con agua (ya hay preparados a -20°C). Preparar la curva como sigue:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| [Albúmina] µg | µL del estándar 1:5 | µL Bradford 1X |
| 0 (blanco) | 0 | 200 |
| 1 | .58 | 200 |
| 2.5 | 1.46 | 200 |
| 5 | 2.92 | 200 |
| 7.5 | 4.38 | 200 |
| 10 | 5.847 | 200 |

1. Preparar las muestras a medir, colocando 1 o 2 µL de la muestra y añadiendo 200 µL de Bradford 1X. La medición de la muestra debe quedar dentro de la curva, si no, diluir o agregar más muestra. Al final, dividir la concentración resultante entre los µL de la muestra utilizados para la medición.
2. Incubar las muestras con el Bradford 5 min a RT. Leer antes de transcurrida 1 h.
3. Leer la absorbancia de las muestras a 595 nm (el nanodrop tiene un programa para Bradford). Usar de blanco agua o el diluyente en el cual se encuentre la muestra.