



ProteOrange Protein Quantification Kit Manual

Contents

Deutsch: Handbuch für das ProteOrange Protein-Quantifizierungskit .. 3-8

Русский: Инструкция к набору ProteOrange для определения
количества белка 9-15

English: ProteOrange Protein Quantification Kit Manual 16-21

Handbuch für das ProteOrange Protein-Quantifizierungskit

Das Kit dient der hochsensitiven fluoreszenzbasierten Bestimmung der Proteinkonzentration. Der Farbstoff ProteOrange fluoresziert in freier Form nur schwach. Nach einer selektiven Bindung an Proteine unter Bildung von Farbstoff-Protein-Komplexen zeigt er bei Anregung mit Blaulicht eine ausgeprägte Fluoreszenz. Die Fluoreszenzmethode der Proteinquantifizierung mit ProteOrange ist wesentlich empfindlicher als bestehende spektrophotometrische und andere herkömmliche Methoden zur Quantifizierung von Proteinmengen (Lowry, Bradford, BCA).

Der an Proteine gebundene Farbstoff ProteOrange weist ein Anregungsmaximum bei ~ 485 nm und ein Emissionsmaximum bei ~ 590 nm auf. Das Kit eignet sich für jedes Fluorometer, das über eine entsprechende Anregungslichtquelle und einen Detektionskanal verfügt. Sie können mit einem Küvetten-Fluorometer eine Proteinkonzentration zwischen 10 ng/ml und 10 μ g/ml, mit einem Mikroplatten-Fluorometer eine Proteinkonzentration zwischen 100 ng/ml und 10 μ g/ml bestimmen.

Bestandteile

Komponente	Anzahl
	14102 500 uL dye
41210, ProteOrange Reagenz zur Proteinquantifizierung / ProteOrange protein quantification reagent, 500x, 1 mL	1
A6650, Protein-Standard / Protein standard, BSA 2 mg/ml in TE-Puffer, 500 uL	1
S2750, ProteOrange Puffer zur Proteinquantifizierung / ProteOrange protein quantification buffer, 10x, 50 mL	1

Bei +4 °C lagern. Reagenzien vor Gebrauch auf +20 °C temperieren.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Verfahren

Das nachstehende Protokoll wurde für die Proteinquantifizierung mit einem Mikroplatten-Fluorometer mit einem Probenvolumen von 200 μl (96-Well-Mikrotiterplatte) entwickelt. Sollten Sie ein Fluorometer mit einem anderen Probenvolumen benutzen (z. B. ein Küvetten-Fluorometer mit einem Probenvolumen von 2 ml für eine Standardküvette), sind alle Volumina dementsprechend umzurechnen.

Das Protokoll beinhaltet einen Inkubationsschritt der Proben bei 90–95 °C für 10 Minuten zur Proteindenaturierung und Stabilisierung der Fluoreszenz der Proben. Standards und Proben sollen laut Protokoll in separaten Röhrchen angesetzt, erhitzt und in eine Mikrotiterplatte für die Fluoreszenzmessung überführt werden. Wenn Sie jedoch über eine entsprechende Ausstattung verfügen, können Sie Standards und Proben direkt in einer Mikrotiterplatte ansetzen, diese mit einer hitzebeständigen Verschlussfolie oder einem Deckel verdunstungssicher verschließen und die Proben gemäß dem Protokoll erhitzen. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur zentrifugieren Sie kurz an, um das Kondensat mit der Reaktionslösung zu vereinigen, und fahren Sie wie im Protokoll angegeben fort.

1. Ansetzen der 1× ProteOrange Pufferlösung.

Stellen Sie eine ausreichende Menge der 1× ProteOrange-Pufferlösung unter Berücksichtigung von Volumen und Anzahl von Proben (s. Punkt 4) und Standards (s. Punkt 3) her. Sie erhalten 1× Puffer, indem Sie *10× ProteOrange Pufferkonzentrat* 10-fach mit deionisiertem Wasser verdünnen.

2. Ansetzen der ProteOrange Farbstoffarbeitslösung.

Setzen Sie ProteOrange Farbstoffarbeitslösung an. Verdünnen Sie dafür *500× ProteOrange Farbstoffkonzentrat* 500-fach mit *1× ProteOrange Pufferlösung*.

Sie benötigen beispielsweise für 3 Proben (s. Punkt 4, Beispiel #1) und 10 Standards (s. Punkt 3) ~4 ml der 1× ProteOrange Pufferlösung und 4 ml der Farbstoffarbeitslösung (mischen Sie 8 μl des ProteOrange Farbstoffkonzentrats und 4 ml der 1× ProteOrange Pufferlösung).

! Die angesetzte Farbstoffarbeitslösung ist innerhalb von wenigen Stunden aufzubrauchen. Erfolgt die Messung nicht sofort, lagern Sie die angesetzte Farbstoffarbeitslösung lichtgeschützt.

! Verwenden Sie zur Herstellung der Farbstoffarbeitslösung ausschließlich Kunststoffgefäße. Ein Glasgefäß kann den Farbstoff adsorbieren, was zur Verringerung der Farbstoffkonzentration in den Proben und Beeinflussung der Messergebnisse führen kann.

3. Ansetzen der Protein-Standards.

Mit Hilfe von Protein-Standards wird eine Kalibrationskurve erstellt, mit der die Umrechnung der Fluoreszenzintensität einer Probe in die Proteinkonzentration erfolgt. Die Kalibrationskurve berücksichtigt die Variabilität der Ergebnisse bei Messungen mit verschiedenen Fluorometern, Variabilität der an einem Fluorometer gemessenen Ergebnisse verschiedener Messreihen sowie Pipettierfehler bei Herstellung der Farbstoffarbeitslösung. Es ist daher empfehlenswert, eine neue Kalibrationskurve für jede Messreihe zu erstellen. Sie können jedoch auch eine zuletzt validierte Kalibrationskurve benutzen, wenn Sie unter gleich gebliebenen Bedingungen messen.

Verwenden Sie zum Erstellen einer Kalibrationskurve am besten dasselbe Protein, dessen Konzentration Sie in der Probe bestimmen möchten. Wenn das nicht möglich ist, nehmen Sie den im Kit enthaltenen BSA-Proteinstandard 2 mg/ml.

Der Messbereich dieses Kits beträgt 10 ng/ml—10 µg/ml für ein Küvetten-Fluorometer, 100 ng/ml—10 µg/ml für ein Mikroplatten-Fluorometer. Abhängig von der geschätzten Proteinkonzentration in Proben und dem zur Verfügung stehenden Fluorometer, können Sie eine Kalibrationskurve entweder für den Gesamtmessbereich oder lediglich für einen Teilbereich des Kits erstellen.

Nachfolgend finden Sie ein Schema zum Ansetzen der BSA-Standards für den gesamten Messbereich des Kits für ein Mikroplatten-Fluorometer (100 ng/ml—10 µg/ml) und ein Probenvolumen 200 µl (für eine 96-Well-Plate):

- 3.1. Setzen Sie in separaten 1,5-ml-Röhrchen BSA-Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 µg/ml und 1 µg/ml aus *Protein-Standard BSA 2 mg/ml* und *ProteOrange Farbstoffarbeitslösung* wie folgt an:
 - 10 µg/ml: 5 µl Protein-Standard, BSA 2 mg/ml in TE-Puffer + 995 µl

ProteOrange Farbstoffarbeitslösung

- 1 µg/ml: 100 µl BSA-Stammlösung 10 µg/ml + 900 µl ProteOrange Farbstoffarbeitslösung
- 3.2. Verwenden Sie die angesetzten BSA-Stammlösungen zum Herstellen der BSA-Standards in separaten 1,5-ml-Röhrchen laut Tabelle:

BSA-Stammlösung*	Volumen der BSA-Stammlösung, µl	Volumen der ProteOrange Farbstoffarbeitslösung, µl	BSA-Endkonzentration, µg/ml
	0	250	0
10 µg/ml	250	0	10
	200	50	8
	100	150	4
	50	200	2
1 µg/ml	250	0	1
	200	50	0,8
	100	150	0,4
	50	200	0,2
	25	225	0,1

*die im Punkt 3.1. mit ProteOrange Farbstoffarbeitslösung angesetzten Stammlösungen

Liegt die geschätzte Proteinkonzentration in Proben in einem Ihnen bekannten engeren Teilbereich, so können Sie nur eine BSA-Stammlösung mit den dazugehörigen Standards ansetzen, so dass die Kalibrationskurve den geschätzten Konzentrationsbereich des Proteins abdeckt. Liegt die Proteinkonzentration beispielsweise im Bereich zwischen 2 und 10 µg/ml, müssen Sie lediglich eine BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml (s. Punkt 3.1) ansetzen. Aus dieser Stammlösung stellen Sie dann die BSA-Standards mit folgenden Konzentrationen: 0, 10, 8, 4, 2 µg/ml für die Messung mit dem Fluorometer her (s. Tabelle Punkt 3.2).

4. Herstellung der Proben

Mischen Sie in einem separaten Röhrchen die zu untersuchende Probe mit der ProteOrange Farbstoffarbeitslösung. Wir empfehlen, die Ausgangsprobe mehr als 20-fach zu verdünnen, so dass ihr Anteil am Messvolumen 5 % nicht übersteigt. Diese Empfehlung berücksichtigt die Farbstoffmenge, die an das zu untersuchende Protein bindet sowie die maximale Verdünnung der in der Ausgangsprobe vorhandenen Verunreinigungen, wodurch ihr Einfluss auf Messergebnisse minimiert wird.

Beispiel #1: Mischen Sie 5 µl Ausgangsprobe und 195 µl ProteOrange-Farbstoffarbeitslösung zur Herstellung von 200 µl der zu messenden Probe (eine 40-fache Verdünnung).

Beispiel #2 (bei hoher Konzentration der Verunreinigungen in der Ausgangsprobe): Stellen Sie zwei aufeinander folgende Verdünnungen der Ausgangsprobe in der ProteOrange Farbstoffarbeitslösung her:

- 20× Verdünnung: Mischen Sie 13 µl der Ausgangsprobe mit 247 µl der ProteOrange Farbstoffarbeitslösung
- 100× Verdünnung: Mischen Sie 50 µl der 20× Verdünnung und 200 µl der ProteOrange Farbstoffarbeitslösung

Sie erhalten somit zwei Verdünnungen der zu untersuchenden Probe (20×, 100×). Wenn die Messwerte aufgrund hoher Konzentration an störenden Verunreinigungen in der Ausgangsprobe signifikant verfälscht werden, liegen die Fluoreszenzintensitätswerte der Verdünnungen nicht mehr ihrer Verdünnung entsprechend auf der Kurve. Orientieren Sie sich in einem solchen Fall an der am höchsten verdünnten Probe (in diesem Beispiel 100×), weil sie am wenigsten Verunreinigungen enthält.

! Beachten Sie bitte, dass die Kalibrationskurve die Konzentrationen aller Verdünnungen der zu untersuchenden Proben abfangen sollte und das Kit einen Messbereich von 10 ng/ml—10 µg/ml für ein Küvetten-Fluorometer und 100 ng/ml—10 µg/ml für ein Mikroplatten-Fluorometer abdeckt. Dabei sollten kleine Pipettiervolumina zur Verdünnung der Ausgangsprobe vermieden werden, um die Genauigkeit und Präzision der Messungen zu gewährleisten.

5. Inkubieren Sie alle Röhrchen (mit Standards und Proben) lichtgeschützt für

10 Minuten bei 90–95 °C.

6. Lassen Sie die Röhrcchen ebenfalls lichtgeschützt auf Raumtemperatur abkühlen (ca. 15–20 min).
7. Zentrifugieren Sie kurz an, um das Kondensat mit der Reaktionslösung zu vereinigen.
8. Überführen Sie 200 μl je Probe und Protein-Standard in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte.

9. Fluoreszenzmessung

Wählen Sie den geeigneten Anregungs- und Detektionskanal: Der an Proteine gebundene Farbstoff ProteOrange weist ein Absorptionsmaximum bei ~ 485 nm und ein Emissionsmaximum bei ~ 590 nm auf.

10. Erstellen Sie eine Kalibrationskurve anhand der gemessenen Standard-Fluoreszenzwerte. Finden Sie unter Verwendung der polynomialen Approximation eine Gleichung, die die Abhängigkeit der Proteinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) von der Fluoreszenzintensität (RFU) beschreibt und ermitteln Sie dadurch die Proteinkonzentration in Proben.

Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des BSA-ProteOrange-Komplexes von der BSA-Konzentration. Die BSA-Konzentration liegt im Bereich zwischen 100 ng/ml und 10 $\mu\text{g/ml}$. Fluoreszenzmessung mit einem Mikroplatten-Fluorometer, Anregungs- und Detektionskanäle mit 485/10 bzw. 575/20 nm.



Инструкция к набору ProteOrange для определения количества белка

Набор предназначен для высокочувствительного определения концентрации белка флуоресцентным методом. Краситель ProteOrange в свободном виде характеризуется очень низкой способностью к флуоресценции. Он селективно связывается с молекулами белка, образуя комплексы, в составе которых проявляет выраженную флуоресценцию при облучении голубым светом. Флуоресцентный метод определения концентрации белка с использованием реагента ProteOrange чувствительнее спектрофотометрического и других классических методов, которые используются для количественного анализа образцов, содержащих исследуемые белки (Lowry, Bradford, BCA).

Реагент ProteOrange в комплексе с белком характеризуется флуоресценцией с максимумом возбуждения при ~ 485 нм и максимумом эмиссии при ~ 590 нм. Набор можно использовать на любом типе флуориметра, который имеет соответствующий источник возбуждения и канал детекции. При использовании кюветного флуориметра измеряемый диапазон концентрации белка от 10 нг/мл до 10 мкг/мл, для планшетного флуориметра — от 100 нг/мл до 10 мкг/мл.

Состав набора

Компонент набора	Количество 14102 500 μ L dye
41210, Краситель ProteOrange для определения количества белка / ProteOrange protein quantification reagent, 500x, 1 mL	1
A6650, Стандарт концентрации белка / Protein standard, BCA 2 mg/mL в TE буфере, 500 μ L	1
S2750, Буфер ProteOrange для определения количества белка / ProteOrange protein quantification buffer, 10x, 50 mL	1

Хранить при температуре +4 °С. Прогреть до +20 °С перед использованием.

Срок хранения 12 месяцев.

Протокол

Данный протокол приведен для случая использования набора на планшетном флуориметре и объема образца 200 мкл (96-луночный планшет). При использовании флуориметра с другим объемом образца (например, на кюветном флуориметре с объемом образца 2 мл для стандартной флуориметрической кюветы) следует пересчитать все объемы соответственно.

Протокол использования данного набора включает этап прогрева образцов при 90–95 °С в течение 10 минут для денатурации белков и стабилизации уровня флуоресценции измеряемых образцов. В приведенном ниже протоколе предлагается готовить стандарты концентрации белка и экспериментальные образцы в отдельных пробирках с их последующим прогревом и переносом образцов в планшет для измерения флуоресценции. При наличии соответствующего оборудования, Вы можете приготовить стандарты концентрации белка и экспериментальные образцы в планшете, во избежание испарения герметично накрыть планшет крышкой или пленкой, устойчивой к высоким температурам, и прогреть образцы согласно протоколу. После остывания образцов до комнатной температуры образовавшийся конденсат необходимо сбросить центрифугированием и продолжить работу согласно протоколу.

1. Приготовление 1× буфера ProteOrange.

Приготовьте необходимое количество 1× буфера ProteOrange исходя из объема образца и количества измеряемых образцов (см. п.4) и стандартов концентрации белка (см. п.3). Для получения 1× буфера разведите 10× концентрат буфера ProteOrange в 10 раз деионизованной водой.

2. Приготовление рабочего раствора красителя ProteOrange.

Приготовьте рабочий раствор красителя ProteOrange. Для этого разведите 500× концентрат красителя ProteOrange в 500 раз 1× буфером ProteOrange.

Например, для измерения 3 образцов (см. п.4, пример #1) и 10 стандартов (см. п.3) необходимо приготовить ~4 мл 1× буфера ProteOrange и 4 мл рабочего раствора красителя (смешайте 8 мкл концентрата красителя ProteOrange и 4 мл 1× буфера ProteOrange).

! Рабочий раствор красителя рекомендуется использовать в течение нескольких часов после приготовления. При проведении отсроченных измерений рекомендуется беречь от света готовый рабочий раствор красителя.

! Для приготовления рабочего раствора красителя используйте только пластиковую посуду. Стеклянная посуда может сорбировать на своих стенках краситель, что приведет к снижению концентрации красителя в образцах и искажению результатов измерений.

3. Приготовление стандартов концентрации белка.

Стандарты концентрации белка необходимы для построения калибровочной кривой, с помощью которой интенсивность флуоресценции экспериментального образца пересчитывается в концентрацию исследуемого белка. Калибровочная кривая учитывает вариабельность результатов при использовании разных флуориметров, вариабельность значений между различными сериями экспериментов при использовании одного и того же флуориметра, а также погрешности дозирования при приготовлении рабочего раствора красителя. По этой причине построение калибровочной кривой рекомендуется делать для каждой новой серии экспериментов, однако Вы можете использовать старую калибровочную кривую, если условия эксперимента остались прежними.

Для построения калибровочной кривой наилучшим вариантом является использование того же самого белка, концентрация которого будет определяться в дальнейшем в экспериментальных образцах. При невозможности использовать тот же самый белок, используйте входящий в набор референсный стандарт концентрации белка — раствор БСА с концентрацией 2 мг/мл.

Диапазон измеряемых концентраций данным набором: на кюветном флуориметре 10 нг/мл—10 мкг/мл, на планшетном флуориметре 100 нг/мл—10 мкг/мл. В зависимости от предполагаемой концентрации белка в экспериментальных образцах и используемого флуориметра, Вы можете

построить калибровочную кривую или для всего рабочего диапазона набора, или для его отдельной части.

Ниже приведена схема приготовления стандартов концентрации БСА для всего диапазона работы набора на планшетном флуориметре (100 нг/мл—10 мкг/мл) и объема образца 200 мкл (для 96-луночного планшета):

- 3.1. С использованием входящего в состав набора *стандарта концентрации белка, БСА 2 мг/мл* приготовьте в отдельных пробирках объемом 1,5 мл стоковые растворы БСА в рабочем растворе красителя ProteOrange с концентрациями 10 мкг/мл и 1 мкг/мл:
 - 10 мкг/мл: 5 мкл стандарта концентрации белка, БСА 2 мг/мл в ТЕ буфере + 995 мкл рабочего раствора красителя ProteOrange
 - 1 мкг/мл: 100 мкл образца БСА 10 мкг/мл + 900 мкл рабочего раствора красителя ProteOrange
- 3.2. В отдельных 1,5 мл пробирках с использованием приготовленных стоковых растворов БСА приготовьте стандарты концентрации БСА согласно таблице:

Используемый стоковый раствор БСА*	Объем стокового раствора БСА, мкл	Объем рабочего раствора красителя ProteOrange, мкл	Конечная концентрация БСА, мкг/мл
10 мкг/мл	0	250	0
	250	0	10
	200	50	8
	100	150	4
	50	200	2
1 мкг/мл	250	0	1
	200	50	0,8
	100	150	0,4
	50	200	0,2
	25	225	0,1

*стоковые растворы, приготовленные в п.3.1 в рабочем растворе красителя ProteOrange

Если предполагаемые концентрации экспериментальных образцов находятся в известном Вам более узком диапазоне, Вы можете приготовить один стоковый раствор БСА и соответствующие ему стандарты концентраций БСА, так чтобы калибровочная кривая покрывала предполагаемый диапазон концентрации исследуемого белка. Например, если концентрация исследуемого белка находится в диапазоне 2-10 мкг/мл, Вам следует приготовить только один стоковый раствор БСА с концентрацией 10 мкг/мл (см. п.3.1), а затем из него стандарты концентраций БСА для измерения на флуориметре с концентрациями 0, 10, 8, 4, 2 мкг/мл (согласно таблице, см. п.3.2).

4. Приготовление экспериментальных образцов

В отдельной пробирке разведите экспериментальный образец белка в рабочем растворе красителя ProteOrange. Мы рекомендуем разводить исходный образец белка более чем в 20 раз, так чтобы объем исходного образца в конечном образце для измерения не превышал 5 %. Это обусловлено количеством красителя, который связывается с исследуемым белком, а также максимальным разведением примесей, присутствующих в исходном экспериментальном образце, что нивелирует их влияние на результаты измерений.

Пример #1: для приготовления 1 образца объемом 200 мкл смешайте 5 мкл экспериментального образца белка и 195 мкл рабочего раствора красителя ProteOrange (разведение в 40 раз).

Пример #2 (для случая высокой концентрации примесей в исходном экспериментальном образце белка): приготовьте 2 последовательных разведения экспериментального образца в рабочем растворе красителя ProteOrange:

- Разведение 20×: смешайте 13 мкл экспериментального образца белка и 247 мкл рабочего раствора красителя ProteOrange
- Разведение 100×: смешайте 50 мкл образца с разведением 20× и 200 мкл рабочего раствора красителя ProteOrange

В результате у Вас получится 2 разведения исследуемого белка (20×, 100×). В случае заметного искажения результатов измерения из-за присутствия

примесей в высокой концентрации в исходном образце белка, значения интенсивностей флуоресценции для разведений не будут пропорционально ложиться на калибровочную кривую в соответствии с разведением. В таком случае, следует ориентироваться на точку с наибольшим разведением (в данном случае 100×), поскольку данный образец содержит наименьшее количество примесей.

! Следует иметь в виду, что калибровочная кривая должна покрывать концентрации всех разведений экспериментальных образцов, а также что рабочий диапазон набора составляет 10 нг/мл — 10 мкг/мл для кюветного флуориметра и 100 нг/мл — 10 мкг/мл для планшетного флуориметра. В то же время следует избегать использования маленьких объёмов при разбавлении исходного образца, поскольку неточность пипетирования маленьких объёмов может сказаться на результатах измерений.

5. Инкубируйте все пробирки (со стандартами концентраций и экспериментальными образцами) 10 минут при температуре 90–95 °С в темноте.
6. Дайте остыть содержимому пробирок до комнатной температуры (около 15-20 минут), не подвергая воздействию света.
7. Сбросьте образовавшийся конденсат центрифугированием.
8. Внесите в лунки 96-луночного планшета по 200 мкл экспериментальных образцов и стандартов концентрации белка.
9. **Измерение интенсивности флуоресценции.**
Используйте подходящий источник возбуждающего излучения и канал детекции: краситель ProteOrange в комплексе с белком имеет максимум поглощения при длине волны ~485 нм и максимум испускания при длине волны ~590 нм.
10. Постройте калибровочную кривую, используя данные об уровне флуоресценции стандартов концентрации белка. С использованием полиномиальной аппроксимации найдите уравнение зависимости концентрации белка (мкг/мл) от интенсивности флуоресценции (RFU) и рассчитайте концентрацию белка в исследуемых образцах.

Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса красителя ProteOrange с БСА от концентрации БСА. Концентрации БСА находятся в диапазоне от 100 нг/мл до 10 мкг/мл. Измерение интенсивности флуоресценции с помощью планшетного флуориметра, светофильтры для возбуждения и детекции флуоресценции 485/10 и 575/20 нм соответственно.



ProteOrange Protein Quantification Kit Manual

The kit is intended for highly sensitive protein quantification by fluorescence-based assay. Free ProteOrange reagent has a very low ability to fluoresce. It selectively binds to protein molecules thus forming complexes in which it exhibits significant fluorescence when exposed to blue light. Fluorescence-based protein quantification with ProteOrange reagent is more sensitive than spectrophotometry or other conventional methods that are used for protein quantification (Lowry, Bradford, BCA).

The ProteOrange/protein complex exhibits fluorescence with an excitation maximum at ~485 nm and an emission maximum at ~590 nm. The kit can be used with any fluorometer that has a suitable excitation source and detection channel. The range of concentrations that can be measured is 10 ng/mL to 10 µg/mL for cuvette fluorometers and 100 ng/mL to 10 µg/mL for plate fluorometers.

Kit components

Kit component	Count
	14102
	500 µL dye
41210, ProteOrange protein quantification reagent, 500x, 1 mL	1
A6650, Protein standard, BSA 2 mg/mL in TE buffer, 500 µL	1
S2750, ProteOrange protein quantification buffer, 10x, 50 mL	1

Store at +4 °C. Warm up to +20 °C before use.

Shelf life 12 months.

Protocol

This protocol is for the case when the kit is used with a plate fluorometer, and assay volume of 200 µL (96-well plate). If a fluorometer with another assay volume is used

(for example, a cuvette fluorometer with an assay volume of 2 mL for a standard fluorometric cuvette), recalculate all volumes accordingly.

The protocol for this kit includes sample heating at 90 to 95 °C for 10 minutes for protein denaturation and stabilization of fluorescence signal in the test samples. The protocol below specifies that protein standards and test samples should be prepared in individual tubes, then heated and transferred onto the plate to measure fluorescence. If relevant equipment is available, you can prepare protein standards and test samples on the plate, tightly cover the plate with a lid or film resistant to high temperatures to prevent evaporation, and heat the samples according to the protocol. When the samples are cooled down to room temperature, discard the condensate by centrifugation and proceed according to the protocol.

1. **Preparation of 1× ProteOrange buffer.**

Prepare the sufficient amount of 1× ProteOrange buffer according to the sample volume and amount of test samples (see item 4) and protein standards (see item 3). To prepare 1× buffer, dilute *10× ProteOrange buffer concentrate* 10-fold with deionized water.

2. **Preparation of ProteOrange dye working solution.**

Prepare *ProteOrange dye working solution*. In order to do that, dilute *500× ProteOrange reagent concentrate* 500-fold with 1× ProteOrange buffer.

For example, to quantify 3 samples (see item 4, example #1) and 10 standards (see item 3), you should prepare about ~4 mL of 1× ProteOrange buffer and 4 mL of dye working solution (mix 8 µL of ProteOrange reagent concentrate with 4 mL of 1× ProteOrange buffer).

! The dye working solution should be used within a few hours after its preparation. In case of postponed measurements protect the prepared dye working solution from light.

! Prepare the dye working solution in plastic containers only. The dye can adsorb to glass surfaces, which results in decreasing in the dye concentration in the samples and biases in the measurement results.

3. **Preparation of protein standards.**

Protein concentration standards are required to generate a calibration curve, which is used to convert fluorescence intensity of the test sample to its protein concentration. The calibration curve makes allowance for result variability when different fluorometers are used, between different experimental runs using the same fluorometer, and for pipetting errors during preparation of the dye working solution. Because of this, it is recommended to generate a calibration curve for every new run of experiments; however, you can use the calibration curve generated in previous experiments if experiment conditions remain the same.

To generate a calibration curve, it is preferable to use the same protein that will be quantified in the test samples. If the same protein cannot be used, use protein concentration reference standard from the kit (i. e. BSA solution 2 mg/mL).

The range of concentrations that can be measured with this kit is 10 ng/mL to 10 µg/mL for cuvette fluorometers and 100 ng/mL to 10 µg/mL for plate fluorometers. Depending on the expected protein concentration in the test samples and the fluorometer used, you can generate a calibration curve either for the whole working range of the kit or for its part.

Please see below for the procedure for preparation of BSA concentration standards for the whole working range of the kit for plate fluorometer (100 ng/mL to 10 µg/mL) and assay volume of 200 µL (for 96-well plate):

- 3.1. Using the *protein standard, BSA 2 mg/mL* from the kit, prepare BSA stock solutions 10 µg/mL and 1 µg/mL in ProteOrange dye working solution in individual 1.5 mL tubes.
 - 10 µg/mL: 5 µL of protein standard, BSA 2 mg/mL in TE buffer + 995 µL of ProteOrange dye working solution
 - 1 µg/mL: 100 µL of BSA stock solution 10 µg/mL + 900 µL of ProteOrange dye working solution
- 3.2. Prepare BSA standards using prepared BSA stock solutions in individual 1.5 mL tubes according to the table below:

BSA stock solution*	Volume of BSA stock solution, μL	Volume of ProteOrange dye working solution, μL	Final BSA concentration, $\mu\text{g/mL}$
	0	250	0
10 $\mu\text{g/mL}$	250	0	10
	200	50	8
	100	150	4
	50	200	2
1 $\mu\text{g/mL}$	250	0	1
	200	50	0.8
	100	150	0.4
	50	200	0.2
	25	225	0.1

* Stock solutions prepared in item 3.1 in ProteOrange dye working solution

If expected concentrations of the test samples are in the known narrower range, you can prepare one BSA stock solution and respective BSA standards so that the calibration curve covers the expected range of test protein concentrations. For example, if expected concentration of the test sample is from 2 to 10 $\mu\text{g/mL}$, you should prepare only one BSA stock solution (10 $\mu\text{g/mL}$) (see item 3.1) and then BSA standards from it with concentrations of 0, 10, 8, 4 and 2 $\mu\text{g/mL}$ (according to the table, see item 3.2) for measurements on the fluorometer.

4. Preparation of test samples

Dilute a protein sample with ProteOrange dye working solution in an individual tube. We recommend diluting the initial protein sample more than 20-fold so that the volume of the initial sample in the final sample measured does not exceed 5 %. This is caused by the dye amount that binds to the protein in the sample and the highest dilution of contaminants from the initial sample, which neutralizes their effect on results.

Example #1: To prepare one sample with a volume of 200 μL , mix 5 μL of initial protein sample and 195 μL of ProteOrange dye working solution (1:40 dilution).

Example #2 (for high concentration of contaminants in the initial protein sample): Prepare two sequential dilutions of the initial protein sample with ProteOrange dye working solution:

- 20 \times dilution: Mix 13 μL of initial protein sample with 247 μL of ProteOrange dye working solution.
- 100 \times dilution: Mix 50 μL of 20 \times diluted sample with 200 μL of ProteOrange dye working solution.

You will obtain two dilutions of the test protein (20 \times and 100 \times). If results are significantly biased due to high levels of contaminants in the initial protein sample, fluorescence intensities for the dilutions will not follow proportionally the calibration curve according to the dilution. In this case, focus on the point with the highest dilution (in this case 100 \times) because this sample contains the lowest level of contaminants.

! Please note that the calibration curve should cover concentrations of all dilutions of test samples, and the working range of the kit is 10 ng/mL to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for cuvette fluorometers and 100 ng/mL to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for plate fluorometers. However, avoid using too small volumes when diluting the initial sample because inaccuracy when pipetting small volumes can affect measurement results.

5. Incubate all the tubes (with protein standards and test samples) for 10 min at 90 to 95 $^{\circ}\text{C}$ in the dark.
6. Allow the contents of all tubes to cool down to room temperature (for about 15 to 20 minutes) without exposing them to light.
7. Discard the condensate by centrifugation.
8. Load 200 μL aliquots of the test samples and protein standards to 96-well plate wells.
9. **Fluorescence measurements.**

Use a suitable source of excitation light and detection channel: ProteOrange reagent in the complex with a protein has an absorption maximum at ~ 485 nm and an emission maximum at ~ 590 nm.

10. Generate a calibration curve using fluorescence intensity values of protein standards. Using polynomial approximation, determine the equation of protein concentration ($\mu\text{g/mL}$) vs. fluorescence intensity (RFU) and calculate protein concentration in the test samples.

Fluorescence intensity of ProteOrange to BSA complex vs. BSA concentration. BSA concentrations are from 100 ng/mL to 10 $\mu\text{g/mL}$. Fluorescence measurement using plate fluorometer, optical filters for excitation and detection are 485/10 and 575/20 nm, respectively.



Lumiprobe Corporation

(US and Worldwide)

9:00AM - 9:00PM EST

201 International Circle, Suite 135

Hunt Valley, Maryland 21030

USA

Phone: +1 888 973 63 53

Lumiprobe GmbH

(Germany and Europe)

8:00AM - 5:00PM CE(S)T

Feodor-Lynen-Strasse 23

30625 Hannover

Germany

Phone: +49 511 16596811

Lumiprobe RUS Ltd

(Russia and CIS)

8:00 - 19:00 GMT+3 (Moscow)

Kotsyubinskogo 4, bld. 3

121351 Moscow

Russian Federation

Phone: +7 800 775 3271



ISO 9001:2015

The certificate No.: 44 100 202070

Issued by TÜV NORD CERT GmbH

www.lumiprobe.com

