



Handbuch für das ProteOrange® Protein-Quantifizierungsakit

Contents

Deutsch: Handbuch für das ProteOrange®

Protein-Quantifizierungskit 3-8

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 1 mL dye |
| 41210, ProteOrange® Reagenz zur Proteinquantifizierung / ProteOrange protein quantification reagent, 500 \times , 1 mL | 1 |
| A6650, Protein-Standard / Protein standard, BSA 2 mg/ml in TE-Puffer, 500 μ L | 1 |
| S2750, ProteOrange Puffer zur Proteinquantifizierung / ProteOrange protein quantification buffer, 10 \times , 50 mL | 1 |

Bei 4 °C lagern. Reagenzien vor Gebrauch auf 20 °C temperieren. Transport: bei Raumtemperatur bis zu drei Wochen.

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

Sie erhalten somit zwei Verdünnungen der zu untersuchenden Probe (20 \times , 100 \times). 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 \times), 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 $\mu\text{g/ml}$ für ein Küvetten-Fluorometer und 100 ng/ml—10 $\mu\text{g/ml}$ 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 Röhren (mit Standards und Proben) lichtgeschützt für 10 Minuten bei 90–95 °C.
6. Lassen Sie die Röhren 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 (µg/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 µg/ml. Fluoreszenzmessung mit einem Mikroplatten-Fluorometer, Anregungs- und Detektionskanäle mit 485/10 bzw. 575/20 nm.







22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

