



Handbuch für das QuDye®
Protein-Quantifizierungs-kit

Contents

Deutsch: Handbuch für das QuDye® Protein-Quantifizierungskit 3-6

Handbuch für das QuDye® Protein-Quantifizierungskit

Dieses Kit dient der Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem Fluorometer. QuDye® Protein Reagenz bindet selektiv an SDS-Protein-Mizellen, sodass Nukleotide, DNA, RNA und andere Verunreinigungen (ausgenommen Detergenzien) keinen Einfluss auf die Messergebnisse haben. Alle Reagenzien sind für die Messungen mit Fluorometer optimiert, der Messbereich für die Ausgangskonzentrationen der Proteinproben reicht von 12,5 µg/ml bis 5000 µg/ml (die Protein-Endmenge sollte nach Verdünnung der Ausgangsprobe 0,25–5 µg in 200 µl der zu messenden Probe betragen). Die Methode ist hochempfindlich und breit anwendbar aufgrund einer geringen Fluktuation der Fluoreszenzintensität bei der Quantifizierung von verschiedenen Proteinen. Das Kit enthält alle benötigten Komponenten. Messungen mit dem QuDye® Protein-Quantifizierungskit erfordern keine besondere Probenvorbereitung einschließlich der Vorwärmung bei 95 °C. Alle Messungen werden bei Raumtemperatur ausgeführt und dauern durchschnittlich 30 Minuten bei 5–10 Proben.

Bestandteile

| Komponente | Anzahl | | | |
|--|--------|--------|----------------------------|--------|
| | A5102 | 15102 | 16102 | 25102 |
| | 30 | 100 | 100 | 500 |
| | assays | assays | assays (incl. tubes) | assays |
| 33115, Polypropylen-Gefäß (dünnwandiges transparentes 0,5 mL), 100 pcs | — | — | 1 | — |
| 55210, QuDye® Protein-Reagenz / QuDye® Protein reagent, 200×, 1.5 mL | 1 | 1 | 1 | 1 |
| S1750, QuDye Protein Puffer, 1x, 50 mL | 1 | 1 | 1 | 3 |
| B3650, Protein-Standard #1/ Protein standard, 0 ng/ul, TE-Puffer, 1 mL | 1 | 1 | 1 | 1 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| B4650, Protein-Standard #2 / Protein standard, BSA 200 ng/ul in TE-Puffer, 1 mL | 1 | 1 | 1 | 1 |
| B5650, Protein-Standard #3 / Protein standard, BSA 400 ng/ul in TE-Puffer, 1 mL | 1 | 1 | 1 | 1 |

Bei 4 °C lagern. Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur temperieren.

Transport: bei Raumtemperatur bis zu drei Wochen.

Haltbarkeit: 12 Monate.

! Alle Messungen mit QuDye® Protein-Quantifizierungskit werden bei Raumtemperatur (22–28 °C) ausgeführt. Bringen Sie vor Arbeitsbeginn alle Komponente des Kits auf Raumtemperatur. Vermeiden Sie die Erwärmung der Proben, denn die Temperatur der Proben beeinflusst Messergebnisse, insbesondere halten Sie die Röhrchen nicht in den Händen unmittelbar vor den Fluoreszenzmessungen mit Fluorometer.

Verfahren

1. Setzen Sie *QuDye® Protein Farbstoffarbeitslösung* an, wobei für jede Probe und jeden Standard 200 µl Farbstoffarbeitslösung benötigt werden. Die Farbstoffarbeitslösung erhalten Sie, indem Sie 200x *QuDye® Protein Farbstoffkonzentrat* mit *QuDye® Protein Puffer* 200-fach verdünnen.

Zur Messung von 2 Proben und 3 Standards stellen Sie beispielsweise 200 µl x 5 = 1000 µl Farbstoffarbeitslösung her (legen Sie 5 µl QuDye® Protein Farbstoffkonzentrat und 995 µl QuDye® Protein Puffer vor).

! Die angesetzte Farbstoffarbeitslösung ist innerhalb von wenigen Stunden aufzubauchen. 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.

2. Bereiten Sie 3 dünnwandige, optisch durchlässige 0,5-ml-Röhrchen für die

Standards und ein Röhrchen je Probe vor. Beschriften Sie die Röhrchendeckel (nicht jedoch die Röhrchenwand, da dies das korrekte Ablesen der Probe stören kann).

3. Pipettieren Sie in jedes Standardröhrchen 190 μl *QuDye® Protein Farbstoffarbeitslösung* und 10 μl des jeweiligen *Protein-Standards*. Vortexen Sie für 2–3 Sekunden und zentrifugieren Sie kurz an.
4. Pipettieren Sie in jedes Probenröhrchen 180–199 μl *QuDye® Protein Farbstoffarbeitslösung* und 20–1 μl Proteinprobe (Das Endvolumen muss 200 μl betragen). Vortexen Sie für 2–3 Sekunden und zentrifugieren Sie kurz an.

Die Verdünnung der Proteinprobe ist optional und hängt von der Ausgangskonzentration ab. Die Ausgangskonzentration der Proteinproben kann im Bereich von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ bis 5000 $\mu\text{g/ml}$ liegen. Die Protein-Endmenge sollte jedoch nach Verdünnung der Ausgangsprobe mit QuDye® Protein Farbstoffarbeitslösung innerhalb des Messbereichs vom Fluorometer liegen, d. h. 0,25–5 μg in 200 μl der zu messenden Proteinprobe. Somit muss die Ausgangsprobe mit einer minimal zulässigen Protein-Ausgangskonzentration von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ 10-fach auf 1,25 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt werden (mischen Sie dafür in einem Probenröhrchen 180 μl der Farbstoffarbeitslösung und 20 μl der Ausgangsprobe mit 12,5 $\mu\text{g/ml}$, was 0,25 μg Protein entspricht); die Ausgangsprobe mit einer maximal zulässigen Protein-Ausgangskonzentration von 5000 $\mu\text{g/ml}$ muss 200-fach verdünnt werden (mischen Sie dafür in einem Probenröhrchen 199 μl der Farbstoffarbeitslösung mit 1 μl der Ausgangsprobe mit 5000 $\mu\text{g/ml}$, das entspricht 5 μg Protein). Dabei sollten kleine Pipettierolumina zur Verdünnung der Ausgangsprobe vermieden werden, um die Genauigkeit und Präzision der Messungen zu gewährleisten.

5. Inkubieren Sie alle Röhrchen (mit Standards und Proteinproben) für 15 Minuten bei Raumtemperatur.
6. Führen Sie Fluoreszenzmessungen durch.

Fluoreszenzmessung mit Fluorometer

Folgende Schritte sollen gemäß der Anleitung für das Fluorometer durchgeführt werden. Je nach Ausführung des Fluorometers können sich Menüpunkte von den unten genannten unterscheiden.

1. Nach dem Einschalten des Geräts wählen Sie auf dem Display des Fluorometers den Menüpunkt «Quant – It Protein». Drücken Sie «Go».
2. Jedes Mal nach Herstellung einer frischen Farbstoffarbeitslösung muss das Fluorometer neu kalibriert werden. Wählen Sie «Run new calibration» und drücken Sie «Go».
3. Setzen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #1* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie «Go». Nach Ablesen der Messwerte (etwa 3 Sekunden) entfernen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #1*.

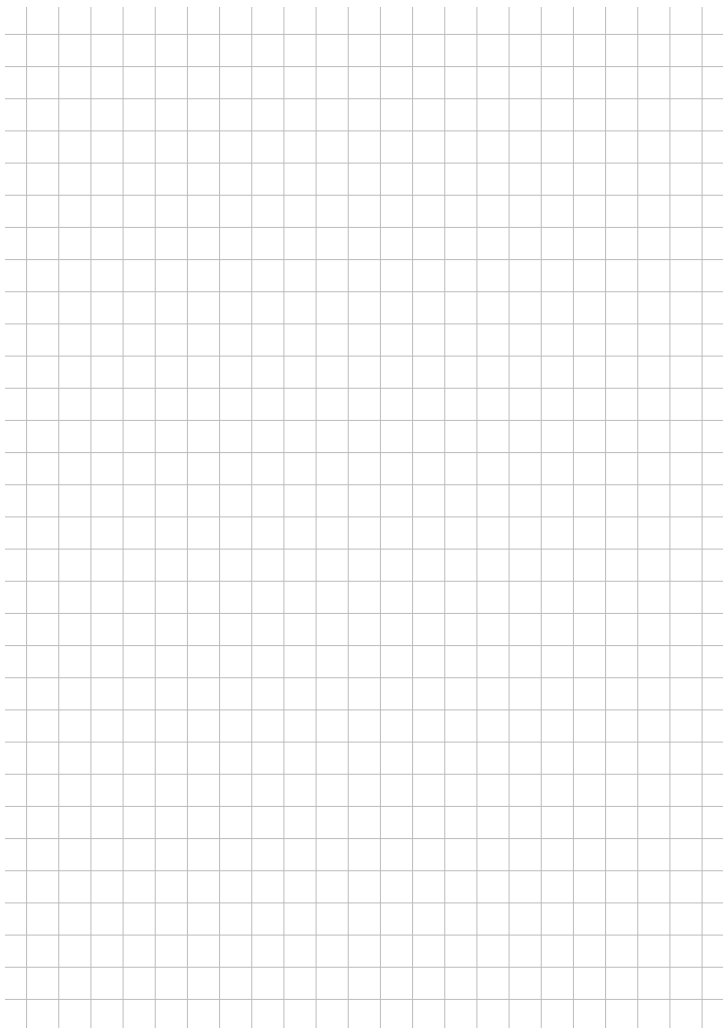
Setzen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #2* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie «Go». Nach Ablesen der Messwerte entfernen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #2*.

Setzen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #3* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie «Go». Nach Ablesen der Messwerte entfernen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #3*.

4. Nach Abschluss der Kalibrierung setzen Sie das Röhrchen mit der Proteinprobe in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie «Go». Auf dem Display wird der QF Wert angezeigt.

Sie können die Protein-Konzentration anhand der folgenden Formel berechnen:

Protein-Probenkonzentration = QF Wert x 200/Probenvolumen oder geben Sie das Probenvolumen ins Fluorometer ein.









22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

