

GEBRAUCHSANLEITUNG

SingleQuant Assay Kit

Kit für die Proteinkonzentrationsbestimmung
(Kat.-Nr. 39226)



SERVA Electrophoresis GmbH • Carl-Benz-Str. 7 • D-69115 Heidelberg
Phone +49-6221-138400, Fax +49-6221-1384010
e-mail: info@serva.de • <http://www.serva.de>

Inhaltsverzeichnis

1. SingleQuant-Assay-Kit	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Kit-Komponenten	2
1.3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	3
1.3.1. Allgemein	3
1.3.2. Durchführung der Messung unter Verwendung von Halbmikro- oder Mikroküvetten	3
1.3.3. Durchführung der Messung unter Verwendung von Mikrotiter-Platten	3
1.4. Lagerbedingungen	3
2. SingleQuant-Assay Protokoll	4
2.1. Überblick über das Verfahren	4
2.2. Durchführung der SingleQuant-Proteinbestimmung	5
2.2.1. Ansetzen der Lösungen	5
2.2.2. Durchführung: Ansatz für Verwendung von Mikroküvetten oder Mikrotiter-Platten	6
2.2.3. Durchführung: Ansatz für die Verwendung von Halbmikro- küvetten	7
2.2.4. Berechnung der Proteinkonzentrationen	8
3. Literatur	9

1. SingleQuant-Assay-Kit

1.1. Allgemeine Hinweise

Der SingleQuant-Assay beruht auf der Ausfällung von Proteinen als unlösliche Farbstoffkomplexe mit saurer, ethanolischer Amidoschwarz-10B-Lösung (Popov et al. 1975). Nach der Fällung werden die Protein-Farbstoffkomplexe sedimentiert. Das Pellet wird gewaschen und in NaOH wieder in Lösung gebracht. Die dabei freigesetzte Farbstoffmenge wird spektralphotometrisch bei 624 nm bestimmt und ist der Proteinausgangsmenge direkt proportional.

Vorteile der Methode:

- **Genauere und reproduzierbare Messergebnisse**
- **Schnelle Durchführung (max. 45 Minuten)**
- **Keine Störung der Proteinbestimmung durch Detergenzien (SDS, Nonident P40, CHAPS) oder reduzierende Reagenzien wie DTT oder β -Mercaptoethanol** im Gegensatz zu Verfahren nach Lowry, Bradford oder mit Bicinchoninic acid (BCA™). Der SingleQuant-Assay ist ein sog. „endpoint assay“ (die Absorption der Probe bleibt während der Zeit unverändert), und ist mindestens 2 Stunden stabil.
- Der SingleQuant-Assay ist für einzelne Proteinbestimmungen optimal geeignet. Für hohen Probendurchsatz wird der ProtaQuant Assay Kit (Art. Nr. 39225) empfohlen.

Hinweis: Da Trägerampholyte ebenfalls den Farbstoff binden und somit höhere Proteinkonzentrationen vortäuschen, muss die **Proteinbestimmung bei Proben für die 2D-Gelelektrophorese vor dem Ampholytzusatz erfolgen.**

1.2. Kit-Komponenten

Reference standard (BSA) 39226.01 39226.02	1 x 6 mg 3 x 6 mg
SingleQuant Dye 39226.01 39226.02	1 x Vial 3 x Vials
Wash solution 39226.01 39226.02	1 x 400 ml 3 x 400 ml
Elution solution 39226.01 39226.02	1 x 120 ml 1 x 360 ml

1.3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

1.3.1. Allgemein

- Tischzentrifuge (geeignet zum Zentrifugieren von 1,5 ml Reaktionsgefäße bei 12 000xg)
- Magnetrührer
- Vortex-Mixer

1.3.2. Durchführung der Messung unter Verwendung von Halbmikro- oder Mikroküvetten

- Spektralphotometer geeignet für die Messung bei 624 nm und den Einsatz von Halbmikro- bzw. Mikroküvetten
- Halbmikroküvetten (600 µl Assay-Volumen)
- Mikroküvetten (300 µl Assay-Volumen)

1.3.3. Durchführung der Messung unter Verwendung von Mikrotiter-Platten

- ELISA-Reader mit geeignetem Filter (z.B. 620 nm)
- Mikrotiter-Platten, geeignet für die Anwendung im ELISA-Reader

1.4. Lagerbedingungen

Im ungeöffneten Zustand ist die empfohlene Lagertemperatur 4 °C.

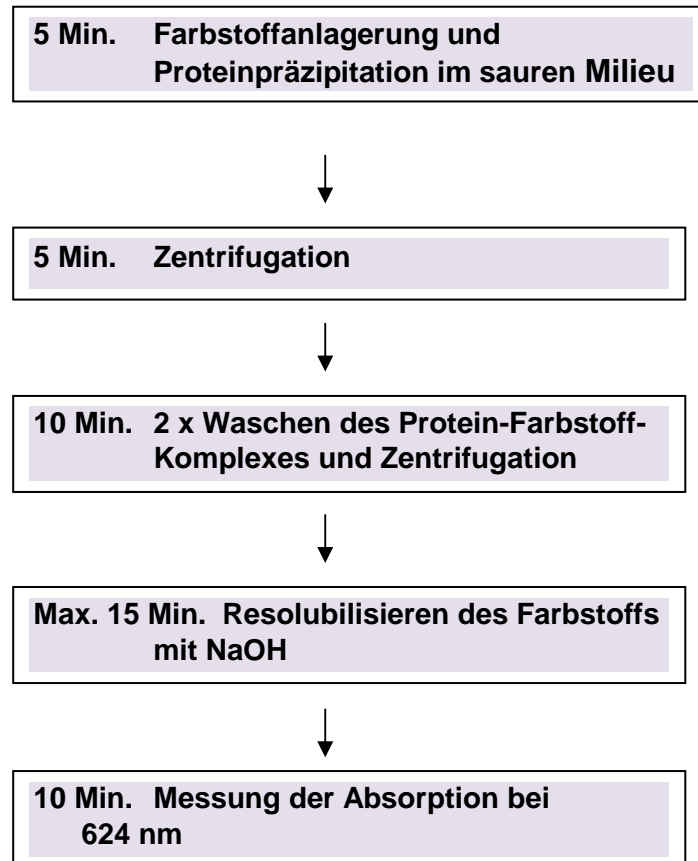
Bei geöffneten bzw. rekonstituierten Einzelkomponenten sind die empfohlenen Lagerbedingungen wie folgt:

Kit-Komponente	Lagerbedingung
Reference standard (BSA)	Aliquotiert; -20 °C
Wash solution	RT
Elution solution	RT
SingleQuant-Stammlösung	4 °C

Die Kit-Komponenten sind bei den empfohlenen Lagertemperaturen mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

2. SingleQuant-Assay Protokoll

2.1. Überblick über das Verfahren



2.2. Durchführung der SingleQuant-Proteinbestimmung

2.2.1. Ansetzen der Lösungen

SingleQuant-Stammlösung Inhalt des Gefäßes mit SingleQuant Dye in 2,5 ml Waschlösung durch Rühren über Nacht vollständig lösen.

SingleQuant-Assay-Lösung SingleQuant-Stammlösung 1:50 mit Waschlösung verdünnen, mischen und filtrieren. **Frisch ansetzen.**

Wash solution gebrauchsfertig

Elution solution gebrauchsfertig

Reference standard-Stammlösung Inhalt des Gefäßes mit 6 ml dest. H₂O lösen. (Konzentration: 1 mg/ml BSA, Aliquots bei -20°C la gern).

Reference standard-Arbeitslösung Reference standard-Stammlösung 1:10 verdünnen (z.B. 70 µl ad 700 µl mit dest. H₂O).

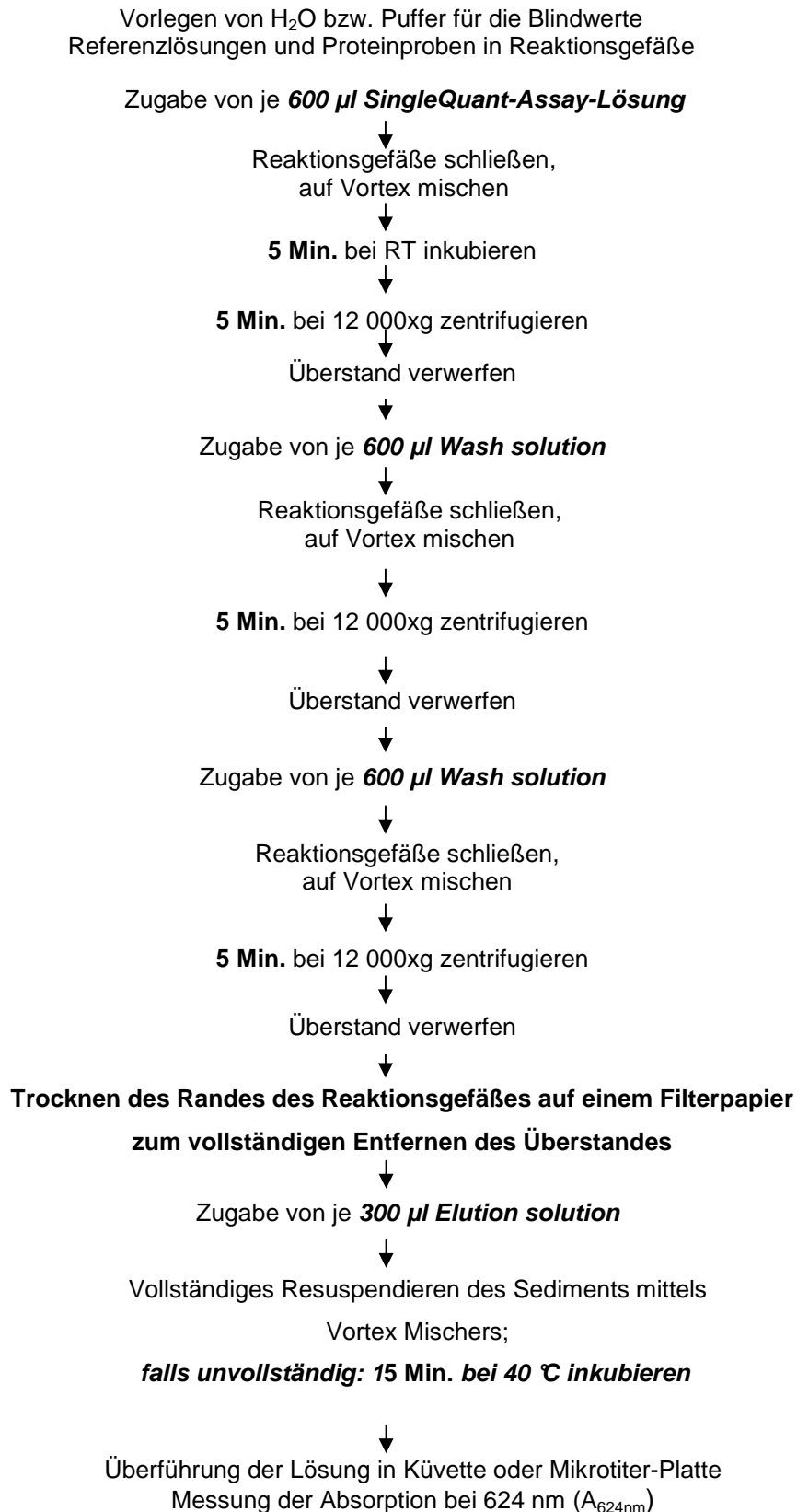
Blindwert (Blank) Beim Blindwert wird entweder dest. H₂O oder der Puffer in dem sich die Proteinproben befinden anstelle des BSA bzw. der Proteinprobe eingesetzt. Ansonsten werden die Blindwertansätze entsprechend den anderen Ansätzen behandelt.

Referenzlösungen Die Referenzlösungen sind nach folgendem Schema anzusetzen:

Nr.	BSA-Menge	Ansatz	
R1	2 µg	20 µl	Reference standard-Arbeitslsg. (Konz. 0,1 mg/ml)
		600 µl	SingleQuant-Assay-Lösung
R2	4 µg	40 µl	Reference standard-Arbeitslsg. (Konz. 0,1 mg/ml)
		600 µl	SingleQuant-Assay-Lösung
R3	6 µg	60 µl	Reference standard-Arbeitslsg. (Konz. 0,1 mg/ml)
		600 µl	SingleQuant-Assay-Lösung
R4	8 µg	80 µl	Reference standard-Arbeitslsg. (Konz. 0,1 mg/ml)
		600 µl	SingleQuant-Assay-Lösung

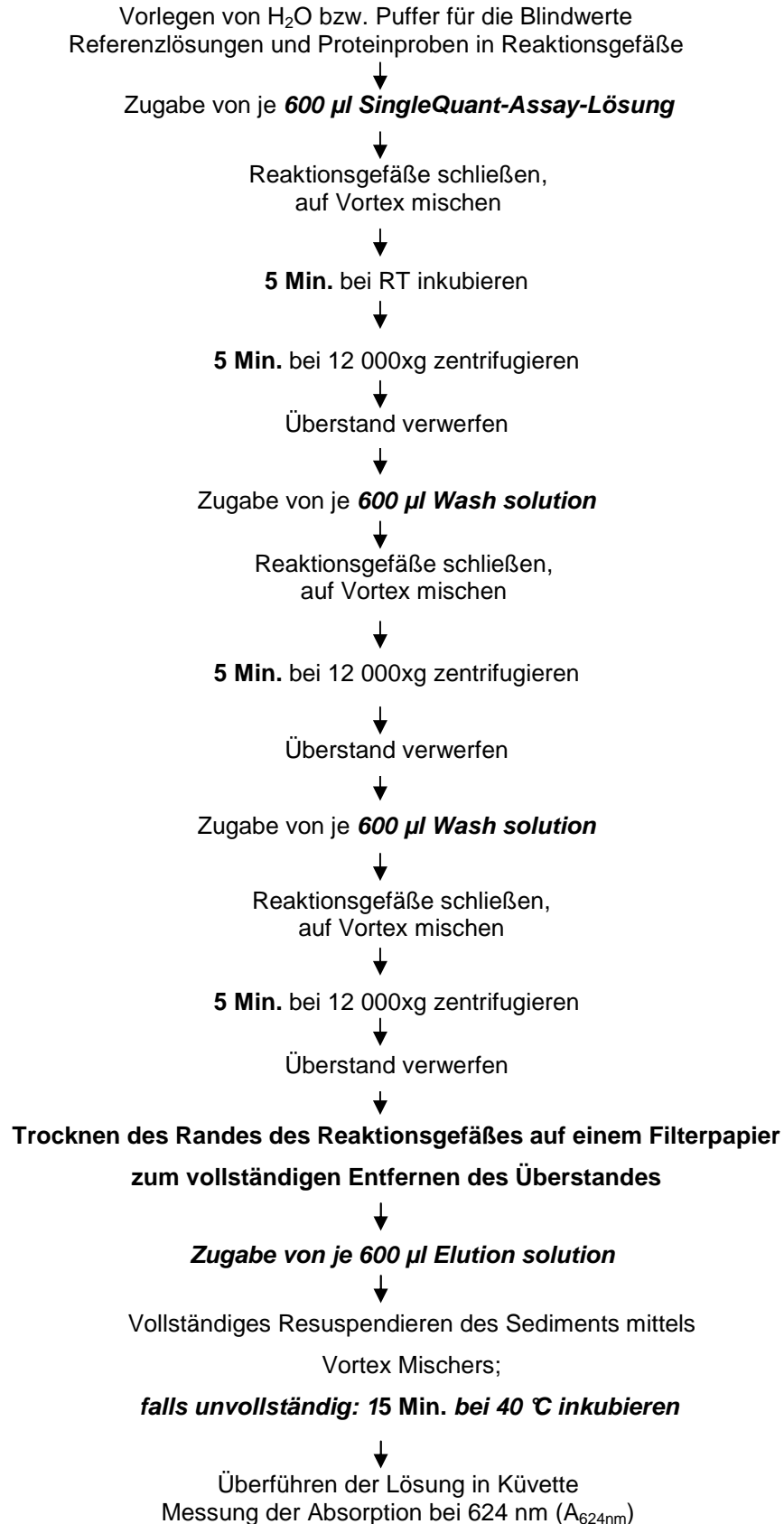
2.2.2. Durchführung : Ansatz für Verwendung von Mikroküvetten oder Mikrotiter-Platten zur Messung

Der Assay wird in einer 3-fach Bestimmung durchgeführt. Nach allen Zentrifugationsschritten sollte das Sediment sofort weiterverarbeitet werden, da das Sediment sonst instabil wird und Verluste auftreten können.



2.2.3. Durchführung : Ansatz für Verwendung von Halbmikroküvetten zur Messung

Der Assay wird in einer 3-fach Bestimmung durchgeführt. Nach allen Zentrifugationsschritten sollte das Sediment sofort weiterverarbeitet werden, da das Sediment sonst instabil wird und Verluste auftreten können.



2.2.4. Berechnung der Proteinkonzentration

Erstellen Sie eine Tabelle mit den im Test erhaltenen Absorptionswerten. Aus den erhaltenen Werten für die BSA-Referenzwerte erstellen Sie eine Kalibriergerade, mit der Sie die Proteinkonzentrationen der unbekanntenen Proben bestimmen können.

Tabelle 1 zeigt beispielhaft Messwerte für die Erstellung der BSA-Kalibriergeraden.

Graf 1 zeigt die daraus resultierende BSA-Kalibriergerade.

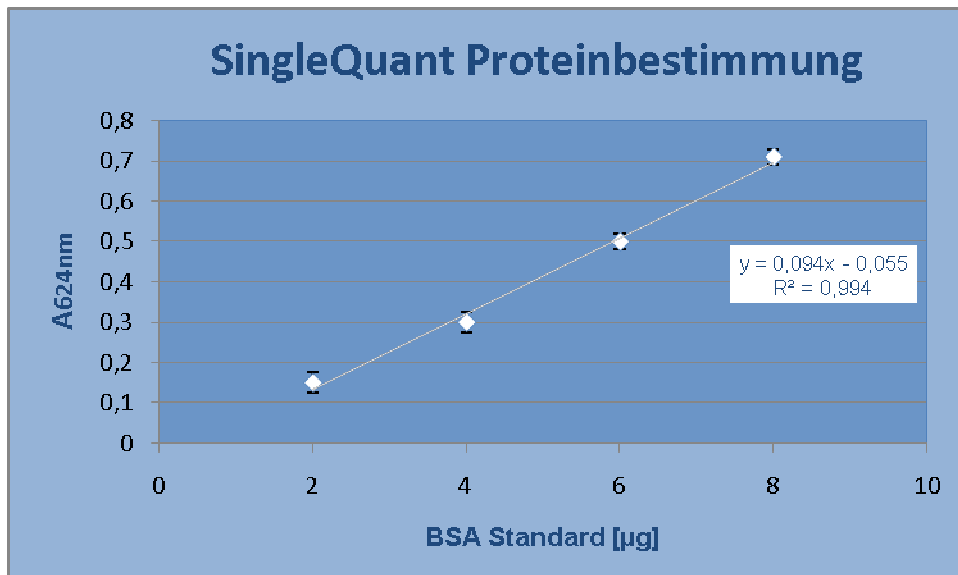
Messwerte A_{624nm}	BSA Menge [μg]
0,17	2
0,12	2
0,15	2
0,31	4
0,32	4
0,27	4
0,52	6
0,48	6
0,50	6
0,69	8
0,71	8
0,73	8

Hinweis:

Beachten Sie bitte, dass diese **Werte nicht als Ersatz für die Erstellung einer Kalibriergeraden dienen können**, da die **Absorptionswerte der BSA Referenzlösungen** in jeder Testreihe von den hier aufgeführten Werten **abweichen werden**.

Tabelle 1: Beispieltabelle für Messwerte der BSA-

Referenzlösungen



Graf 1: BSA-Kalibriergerade aus Messwerten von Tabelle 1

Die einzelnen Punkte stellen Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen inklusive Standardabweichung dar. Die Standardgerade wurde mittels linearer Regressionsanalyse mit der Gleichung $y=0,094x-0,055$ berechnet. Der Regressionskoeffizient beträgt $R^2=0,994$.

Die Berechnung erfolgt über die lineare Regression der Referenzlösungen und anschließende Umrechnung der Absorptionswerte der Untersuchungslösungen in die Proteinkonzentration über die Regressionsgleichung.

3. Literatur

- **Schaffner W., Weissmann C.**, A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution, *Anal. Biochem.* 1973; **65**: 502-514.
- **Popov N., Schmitt M., Schulzeck S., Matthies H.**, Reliable micro method for determination of the protein content in tissue homogenates, *Acta Biol. Med. Ger.* 1975; **34 (9)**: 1441-1446.