

# GEBRAUCHSANLEITUNG

---

## SERVA Purple Protein Quantifizierungs-Assay

Kit für die Proteinkonzentrationsbestimmung

(Kat.-Nr. 39235)



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

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>SERVA PURPLE PROTEIN QUANTIFIZIERUNGS-ASSAY</b>	<b>2</b>
1.1.	Allgemeine Informationen	2
1.2.	Komponenten	2
1.3.	Zusätzlich benötigtes Material	2
1.4.	Lagerung	3
1.5.	Anregungs- und Emissionsspektrum	3
<b>2.</b>	<b>ABLAUF DES SERVA PURPLE PROTEIN QUANTIFIZIERUNGS-ASSAYS</b>	<b>4</b>
2.1.	Herstellen der Puffer, Standards und Reagenzien	4
2.2.	Assay Protokoll	7
<b>3.</b>	<b>WICHTIG ZU WISSEN</b>	<b>8</b>
<b>4.</b>	<b>STÖRENDE SUBSTANZEN</b>	<b>8</b>

# 1. SERVA Purple Protein Quantifizierungs-Assay

## 1.1. Allgemeine Informationen

SERVA Purple Protein Quantifizierungs-Assay ist wesentlich empfindlicher als bestehende standardmäßige, colormetrische Messungen (Ninhydrin, Lowry, BCA). Es ist ein umwelt-freundlicher Fluoreszenzfarbstoff, der kovalent und reversibel an Lysin-, Arginin- und Histidin-Reste in Proteinen und Peptiden bindet. Nach der Bindung erhält man einen intensiv rot fluoreszierenden Protein/Peptid-Farbstoffkomplex.

Dieser einzigartige Mechanismus ermöglicht eine hochempfindliche Quantifizierung von Proteinen und Peptiden über einen breiten linearen Dynamikbereich.

Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Proteinkonzentration.

Darüber hinaus erzeugt SERVA Purple Protein Quantifizierungs-Assay unmittelbar Ergebnisse. Dieser Assay zeigt neben einer verbesserten Toleranz gegenüber Variabilitäten der Messgeräte, auch eine sehr geringe Protein-zu-Protein-Variation, was zu genaueren Proteinkonzentrationswerten führt.

Der Farbstoff färbt effektiv glykosylierte Proteine, Phospho-Proteine, vernetzte (disulfidhaltige) Proteine, Metalloproteine, hydrophobe Proteine und Lipoproteine .

## 1.2. Komponenten

Kit Komponente	2.000 Assays
SERVA Purple Protein Quantifizierungs-Assay	10 ml

## 1.3. Zusätzlich benötigtes Material

- Hochreines Wasser, z. B. destilliert, Milli Q oder gleichwertig
- Bicarbonatpuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9)
- 1,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen
- Pipetten
- Schwarze 384- oder 96-well-Platten; alternativ Fluorometerküvetten
- ELISA-Reader für Fluoreszenzanregung bei 518 nm und -detektion bei 605 nm

## 1.4. Lagerung

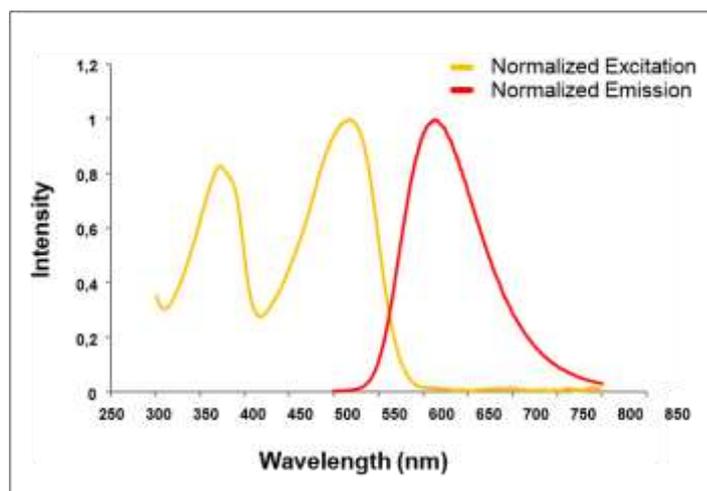
Nach Erhalt, den Farbstoff lichtgeschützt bei + 2°C bis + 8 °C (max. 6 Monate) in der Originalflasche lagern.

Für die Langzeitlagerung, den Farbstoff bei -15°C bis - 30°C aufbewahren.

## 1.5. Anregungs- und Emissionsspektrum

Die Anregungs- und Emissionsmaxima für den proteingebundenen SERVA Purple Farbstoff sind bei 518 nm bzw. 610 nm. Um das Fluoreszenzsignal voll auszuschnöpfen, ist es ideal, Filter zu wählen, die spektral getrennt sind und leicht von den Spitzenanregungs- und Emissionswellenlängen versetzt sind.

Die Anregungs- und Emissionsspektren von SERA Purple sind in Abb. 1 zu sehen.



**Abb. 1:** Anregungs- und Emissionsspektrum von SERVA Purple mit BSA.

## 2. Ablauf des SERVA Purple Protein Quantifizierungs-Assays

Die Testvolumina reichen von 20 µl in 384-well-Platten bis zu 200 µl in 96-well-Platten. Größere Volumina, z. B. 3 ml in Küvette sind ebenfalls möglich.

Wir empfehlen die Verwendung von 96-well-Platten mit einem Endvolumen von 100 µl.

Das Kit ist kompatibel mit den meisten Standard-Fluoreszenzdetektionssystemen, die mit ultraviolettem, blauem oder grünem Licht anregen können und die rote Lichtemission erfassen. Dies können sowohl Multiwell-Platten-basierte Fluorometer und auch laserbasierte Systeme sein.

**Anmerkung:** Die Nachweisgrenzen werden weitestgehend durch die Empfindlichkeitsgrenzen der verwendeten Messsysteme bestimmt.

### 2.1. Herstellen der Puffer, Standards und Reagenzien

Vor der Proteinbestimmung werden die entsprechenden Lösungen wie nachfolgend beschrieben vorbereitet.

Mit Ausnahme des Bicarbonatpuffers sollten alle Lösungen frisch angesetzt werden.

#### 2.1.1. Bicarbonatpuffer

Stellen Sie eine 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung her.  
Der pH-Wert des Puffers sollte etwa 9 betragen.

10 ml 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 115 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 ml auffüllen (pH 9,0 - 9,2).

#### 2.1.2. Standardlösung

Um eine Standardkurve für die Berechnung der Protein- / Peptid-Konzentration in der Probe zu erhalten, ist es notwendig, Standards zu verwenden.

Bereiten Sie serielle Verdünnungen eines Proteins oder Peptids in Wasser oder Probenpuffer vor, z. B. wird eine 4-fache serielle Verdünnung von 0,655 mg/ml bis 40 ng/ml empfohlen (siehe Tabelle 1 zur Herstellung einer 4-fachen seriellen Verdünnung).

Die Standardlösung sollte mit BSA oder der gleichen Spezies und Puffer wie die zu quantifizierende Probe hergestellt werden.

<b>Reaktionsgefäß Nr.</b>	<b>Wasser oder Probenpuffer</b>	<b>Protein/Peptide- oder BSA-Lösung</b>	<b>Proteinendkonzentration der Standardlösung</b>
<b>1</b>	-	1 Volumenteil (655.360 ng/mL)	655.360 ng/mL
<b>2</b>	3 Volumenteile	1 Volumenteil (655.360 ng/mL)	163.840 ng/mL
<b>3</b>	3 Volumenteile	1 Volumenteil (163.840 ng/mL)	40.960 ng/mL
<b>4</b>	3 Volumenteile	1 Volumenteil (40.960 ng/mL)	10.240 ng/mL
<b>5</b>	3 Volumenteile	1 Volumenteil (10.240 ng/mL)	2.560 ng/mL
<b>6</b>	3 Volumenteile	1 Volumenteil (2.560 ng/mL)	640 ng/mL
<b>7</b>	3 Volumenteile	1 Volumenteil (640 ng/mL)	160 ng/mL
<b>8</b>	3 Volumenteile	1 Volumenteil (160 ng/mL)	40 ng/mL

**Tab. 1: Erstellen einer 4-fach-seriellen Verdünnung für die Protein-Standard-Kurve**

### 2.1.3. Arbeitslösung

Den SERVA Purple Farbstoff vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmen und vorsichtig mischen. Für die Arbeitslösung werden Farbstoff und Bicarbonatpuffer im Verhältnis 1:9 gemischt (siehe Tab. 2 für die entsprechenden Verdünnungen).

Anzahl der Assays			Benötigtes Volumen		
1 mL Assay Küvette	100 µl Assays (96-well Platte)	20 µl Assays (384-well Platte)	Farbstoff [µL]	Bicarbonatpuffer [µL]	Gesamtvolumen Arbeitslösung [µL]
1	<b>10</b>	50	50	450	<b>500</b>
5	<b>50</b>	250	250	2.250	<b>2.500</b>
10	<b>100</b>	500	500	4.500	<b>5.000</b>
50	<b>500</b>	2.500	2.500	22.500	<b>25.000</b>
100	<b>1 000</b>	5.000	5.000	45.000	<b>50.000</b>
200	<b>2 000</b>	10.000	10.000	90.000	<b>100.000</b>

Tab. 2: Benötigte Volumen der SERVA Purple Arbeitslösung

## 2.2. Assay Protokoll

Schritt	Anmerkung/Protokoll
<b>Blank</b>	Für die Ermittlung der Nullwertes werden gleiche Volumen der Arbeitslösung mit Wasser/Puffer gemischt.
<b>Protein Standard</b>	Zu jeder Standardlösung werden gleiche Volumen Arbeitslösung gegeben.
<b>Probe</b>	Die zu bestimmende Probe wird mit dem gleichen Volumen Arbeitslösung versetzt.
<b>Assay</b>	<p><b>Anmerkung:</b> Bei Bedarf können größere oder kleinere Volumen verwendet werden.</p> <p><b>Für einen 1 mL-Küvetten Assay:</b> Add 500 <math>\mu</math>L of sample / buffer / standard to 500 <math>\mu</math>L of working solution.</p> <p><b>Für einen Mikrotiter- (96-well) Platten (100 <math>\mu</math>L) Assay:</b> Add 50 <math>\mu</math>L of sample / buffer / standard to 50 <math>\mu</math>L of working solution.</p> <p><b>Für einen 384-well-Platten (20 <math>\mu</math>L) Assay:</b> Add 10 <math>\mu</math>L of sample / buffer / standard to 10 <math>\mu</math>L of working solution.</p>
<b>Inkubation</b>	30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur
<b>Fluoreszenz-messung</b>	<p>Messung bei <math>\lambda_{exc}</math>: 518 nm, <math>\lambda_{em}</math>: 605 nm</p> <p>Die Blank-Werte werden von den anderen Fluoreszenzwerten abgezogen.</p> <p>Das Fluoreszenzsignal ist unter diesen Bedingungen 6 Stunden stabil.</p> <p>Sind längere Lagerungszeiten notwendig, kann die abgeklebte Platte bei + 2 °C bis + 8 °C gelagert werden.</p>
<b>Standardkurve</b>	<p><b>Anmerkung:</b> Normalerweise wird für die Standardkurve eine lineare Anpassung verwendet, mit einer exponentiellen Anpassung hingegen kann ein größerer dynamischer Bereich erhalten werden.</p> <p>Erstellen der Standardkurve durch Auftrag log<sub>10</sub> Fluoreszenz (y-Achse) vs log<sub>10</sub> Proteinkonzentration (x-Achse).</p>
<b>Ergebnisse</b>	Mit Hilfe der erstellten Standardkurve wird die Proteinkonzentration der unbekannt Probe ermittelt.

### 3. Wichtig zu wissen

- Verwenden Sie hochwertige Chemikalien und setzen Sie die instabilen Reagenzien vor jeder Bestimmung frisch an (siehe Protokoll).
- Verwenden Sie Mikrotiterplatten, die für Fluoreszenzmessungen geeignet sind.
- Arbeitslösung frisch für jeden Assay vorbereiten.
- Idealerweise sollte der gleiche Puffer für den Proteinstandard und für die zu bestimmende Probe verwendet werden.
  
- SERVA Purple Farbstoff reagiert mit primären Aminen. Deshalb sollten diese weder in der Probe noch in den Puffern vorhanden sein.
- Der Assay eignet sich zur Quantifizierung der meisten Proteine und Peptide, aber für jedes Protein/Peptide sind einzelne Standardkurven erforderlich.

### 4. Störende Substanzen

Störende Substanzen/Komponenten (siehe Tab. 3) sollten die angegebene Konzentration nicht überschreiten.

**Wichtig:**

Außer den in Tab. 3 aufgeführten Substanzen kann es auch durch andere Pufferkomponenten zu Störungen kommen.

Die zu bestimmende Probe sollte in ultrareinem Wasser anstatt in Puffer eingesetzt werden, so dass mögliche Störungen durch Pufferbestandteile vermieden werden können. Alternativ kann der Pufferaustausch durch Dialyse oder Fällung erfolgen.

Substanz	Max. Konzentration
2-Mercaptoethanol	20 mM
Acetonitril (ACN)	0,5 %
CaCl <sub>2</sub>	500 µM
CHAPS	0,05 %
Dithiothreitol (DTT)	1,5 mM
EDTA	20 mM
Ameisensäure	0,01 %
Glycerin	25 %
HCl	500 µM
Iodacteamid	50 mM
NaCl	100 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	500 µM
NP40	0,005%
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,1 %
Sucrose	250 mM
Tributylphosphat (TBP)	10 mM
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin hydrochlorid (TCEP)	2 mM
Trifluoressigsäure (TFA)	0,005 %
Thioharnstoff	500 mM
Tris	500 µM
Triton® X-100	0,005 %
Tween®	0,01 %
Harnstoff	1 M

**Tab. 3: Störende Substanzen**