

- Application Note - - OD600 DiluPhotometer™ und SERVA SingleQuant Assay -

Alternativmethode zur Colorimetrischen Protein Quantifizierung

Dr. Judith Koch¹, Dr. Susanne Manetto², Dr. Jürgen Dreher¹, Dr. Andrea Huber²

¹SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, ²Implen GmbH, München

Einleitung

Proteine sind die „Arbeitsmoleküle“ der Zellen. Sie spielen bei praktisch allen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle und bewerkstelligen vielfältige Aufgaben, die zur Lebenserhaltung und Funktion eines Organismus notwendig sind. Bei der Untersuchung und Charakterisierung dieser Aufgaben stellt die Proteinquantifizierung einen wichtigen Bezugspunkt für weitere Ergebnisse dar. Eine exakte quantitative Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung ist deshalb für zahlreiche komplexe biologische sowie biotechnologische Experimente von grundlegender Bedeutung.

Zur Protein-Quantifizierung können eine Vielzahl von Methoden verwendet werden. Sie unterscheiden sich in Sensitivität und Toleranz gegenüber verschiedener Agenzien. Die Quantifizierung mit dem Bradford-Reagent von SERVA ist ein Vertreter der Flüssigphasen-Assays, bei denen es aufgrund der Bildung löslicher Farbstoff-Protein-Komplexe zur Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs kommt. Diesen Assays steht die Quantifizierungsmethode nach Popov gegenüber, auf deren Protokoll der neue SingleQuant Assay Kit von SERVA basiert.

Mit dem handlichen OD600 DiluPhotometer™ von Implen (Abb. 1) ist eine zuverlässige quantitative Analyse von Proteinlösungen in weniger als 3 Sekunden möglich. Die Messungen können in einem Wellenlängenbereich von 580 bis 620 nm durchgeführt werden.



Abb.1: Das OD600 DiluPhotometer™ ist wartungsfrei und durch den Batteriebetrieb bestens für den mobilen Einsatz im Labor geeignet.

In Kombination mit der DiluCell™ 10 oder DiluCell™ 20 (Abb. 2) können die Analysen in einem Probevolumen von nur 200 µl bzw. 100 µl durchgeführt werden. Zusätzlich werden die Proben automatisch um den Faktor 10 bzw. 20 virtuell verdünnt. Ungenauigkeiten, wie sie bei einer manuellen, physikalischen Verdünnung von Proben entstehen können, sind ausgeschlossen. Die damit verbundene, erhöhte Reproduzierbarkeit der Analysen entspricht GLP/GMP Kriterien.

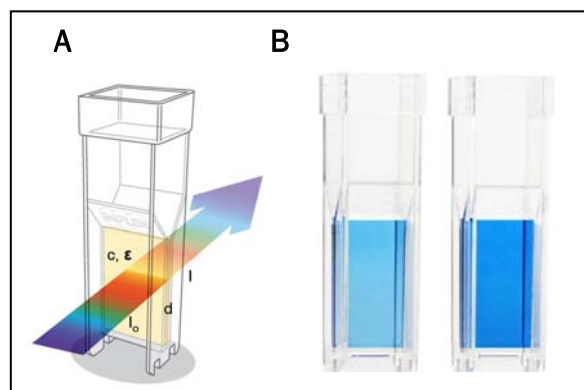


Abb. 2: A) Strahlengang durch die DiluCell™.

Die geringe Spaltbreite (d) bewirkt eine automatische, virtuelle Verdünnung der Proben. B) Eine identische blaue Lösung wurde in beide DiluCell™ Versionen gefüllt (linke Zelle: DiluCell™ 20, rechte Zelle DiluCell™ 10). Die DiluCell™ 20 verdünnt die Probe um den Faktor 20, die DiluCell™ 10 um den Faktor 10. Dies kommt durch die unterschiedlich starke Abschwächung der blauen Farbe zum Ausdruck.

Materialien und Methoden

Eine hohe Reproduzierbarkeit und eine Linearität über einen breiten Konzentrationsbereich sind wesentliche Qualitätskriterien einer exakten Proteinbestimmungsmethode. In dem hier vorliegenden Applikationsbeispiel werden diese beiden Parameter sowohl für den Bradford-Assay als auch für den SingleQuant-Assay (Popov et al.) dargestellt.

Die Bradford-Analyse beruht auf der Quantifizierung der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine. Diese Bindung führt dazu, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm verschiebt, was eine photometrische Vermessung bei 595 nm erlaubt. Für die Bradford-Analyse wurde das 5x Bradford Reagenz der Firma SERVA Electrophoresis GmbH analog dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Der Assay wurde in 2 unterschiedlichen Formaten, dem Micro-Assay (1 – 25 µg/ml) und dem Macro-Assay (100 – 1500 µg/ml), durchgeführt. Der Vermessung der Proben bei 595 nm erfolgte mit dem DiluPhotometer™ in handelsüblichen Küvetten.

Der Popov Assay beruht auf der Ausfällung von Proteinen als unlösliche Farbstoffkomplexe mit saurer, ethanolischer Amidoschwarz-10B-Lösung. 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. Mit dem hier eingesetzten SingleQuant Assay von SERVA können Störungen der Proteinbestimmung durch Detergenzien (SDS, Nonident P40, CHAPS) oder reduzierende Reagenzien wie DTT oder β-Mercaptoethanol ausgeschlossen werden. Mit dem SingleQuant Assay wird eine sog. „Endpunktbestimmung“ durchgeführt. Die Absorption der Probe bleibt während der Zeit unverändert und ist für mindestens 2 Stunden stabil.

Der SingleQuant Assay wurde gemäß den Angaben des Herstellers mit dem OD600 DiluPhotometer™ in Kombination mit der DiluCell™ 10, der DiluCell™ 20 und Standard Küvetten durchgeführt. Da durch die automatische virtuelle Verdünnung mit den DiluCells mit 10 bzw. 20-fach höheren Absorptionswerten zu rechnen ist, konnte die einzusetzende BSA Menge entsprechend erhöht werden. Somit konnten mit der DiluCell™ 10 BSA Mengen bis 100 µg und mit der DiluCell™ 20 bis 120 µg ohne vorherige Probenverdünnung nachgewiesen werden. Bei Vermessungen mit Standard Küvetten können im Vergleich ohne Probenverdünnung nur 1 – 10 µg BSA vermessen werden.

Linearitätsnachweis

Für den Bradford Linearitätsnachweis wurden acht (Micro-Assay) bzw. sieben (Macro-Assay) unterschiedliche BSA-Konzentrationen jeweils in unabhängigen Doppelbestimmungen vermessen. Die Vermessung erfolgte in handelsüblichen Plastikkuvetten mit dem OD600 DiluPhotometer™ der Firma Implen GmbH. Mit Determinationskoeffizienten (R^2) von 0,9931 und 0,9988 konnte eine sehr gute Korrelation über den gesamten Konzentrationsbereich dargestellt werden

(Abb. 3A, 3B). Das Abflachen der Kurve bei höheren BSA Konzentrationen ist für den Bradford-Assay typisch.

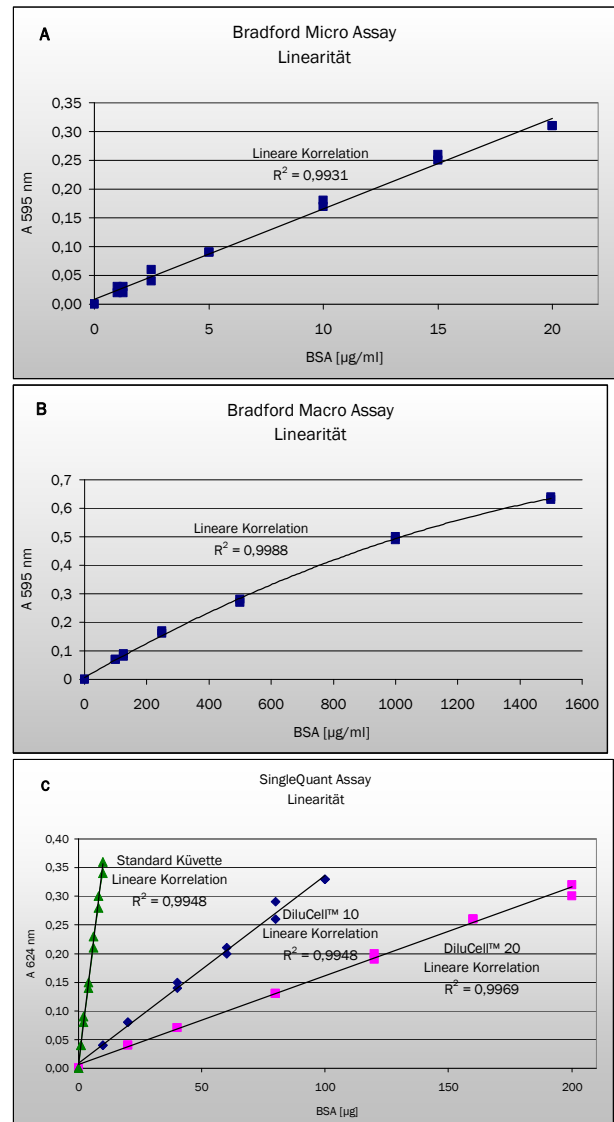


Abb. 3: Zur Bestimmung des linearen Bereichs des Bradford- und des SingleQuant-Assays wurde eine BSA-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen mehrfach vermessen. **A + B**) Bradford Micro- und Macro-Assay: Acht bzw. sieben unterschiedliche BSA Konzentrationen wurden in jeweils zwei unabhängigen Einzelmessungen in Standard Küvetten mit dem OD600 DiluPhotometer™ analysiert. **C**) SingleQuant Assay: Sieben unterschiedliche BSA-Mengen wurden mit dem OD600 DiluPhotometer™ und der DiluCell™ 10, der DiluCell™ 20 bzw. mit Standard Küvetten vermessen. Pro Messpunkt wurden 2 unabhängige Assay-Ansätze analysiert.

Für den SingleQuant-Assay wurden die Linearitätsmessungen mit dem DiluPhotometer, sowohl für die DiluCell™ 10 als auch für die DiluCell™ 20 und für Standard Küvetten mit jeweils 7 verschiedenen BSA-Mengen durchgeführt (Abb. 3C). Für jede BSA-Menge wurden 2 unabhängige Assay-Ansätze pipettiert und in einem Volumen von 200 µl (DC 10), 100 µl (DC 20) bzw. 600 µl (Standard Küvetten) vermessen. Die hohen Determinationskoeffizienten (R^2) von 0,9948 für die DiluCell™ 10, 0,9969 für die DiluCell™ 20 bzw.

0,9948 für die Standard Küvette verdeutlichen die sehr guten Linearitätseigenschaften des OD 600 DiluPhotometers™ über den gesamten Konzentrationsbereich von 0 – 120 µg BSA. Durch die automatische Verdünnung mit den DiluCells™ kann der Messbereich von maximal 10 µg auf 120 µg BSA erhöht werden.

Reproduzierbarkeit

Der Nachweis der hohen Reproduzierbarkeit erfolgte sowohl für den Bradford Micro-, als auch für den Macro-Assay mit je 3 BSA-Lösungen unterschiedlicher Konzentration. Pro BSA-Konzentration wurden 2 unabhängige Analyse-Ansätze mit je 6 unabhängigen Einzelmessungen durchgeführt. Mit mittleren Variationskoeffizienten (c.v.) von 0,8 % bzw. 1,7 % konnten äußerst geringe Abweichungen zwischen den 6 unabhängigen Messungen aufgezeigt werden (Abb. 4A, 4B).

Für den SingleQuant-Assay erfolgte der Reproduzierbarkeitsnachweis mit 5 unterschiedlichen Mengen an BSA. Pro BSA-Menge wurden 3 unabhängige Assay-Ansätze pipettiert und jeder Ansatz 6-fach mit der DiluCell™ 10 oder der DiluCell™ 20 und dem DiluPhotometer™ vermessen. Auch hier konnte mit Variationskoeffizienten (c.v.) zwischen 1,8 % und 4,2 % sowohl für die Einzelmessungen, als auch für die unabhängigen Assay-Ansätze eine hervorragende Reproduzierbarkeit gezeigt werden (Abb. 4C).

Zusammenfassung

Die beiden analysierten colorimetrischen Methoden zur Proteinbestimmung, sowohl Bradford-Reagent als auch SingleQuant Assay Kit von SERVA, liefern mit dem wartungsfreien OD600 DiluPhotometer™ von Implen absolut zuverlässige Resultate mit einer sehr hohen Präzision in einer äußerst kurzen Messzeit.

Der SingleQuant Assay kann durch die Kombination OD600 DiluPhotometer™/DiluCell™ in einem sehr geringen Volumen durchgeführt werden. Der Messbereich wird durch die automatische Probenverdünnung der DiluCell™ wesentlich erweitert. Ungenauigkeiten, welche durch manuelles Verdünnen der Proben entstehen, sind bei dieser GMP/GLP-konformen Methode ausgeschlossen. Das handliche, batteriebetriebene OD600 DiluPhotometer™ ermöglicht somit die täglichen Proteinbestimmungen in der Laborroutine schnell, präzise und mit sehr geringem Aufwand durchzuführen.

Zusätzlich zur quantitativen Proteinanalytik kann mit dem OD600 DiluPhotometer™ aber auch das Wachstum von Bakterien analysiert und aufgezeichnet werden.

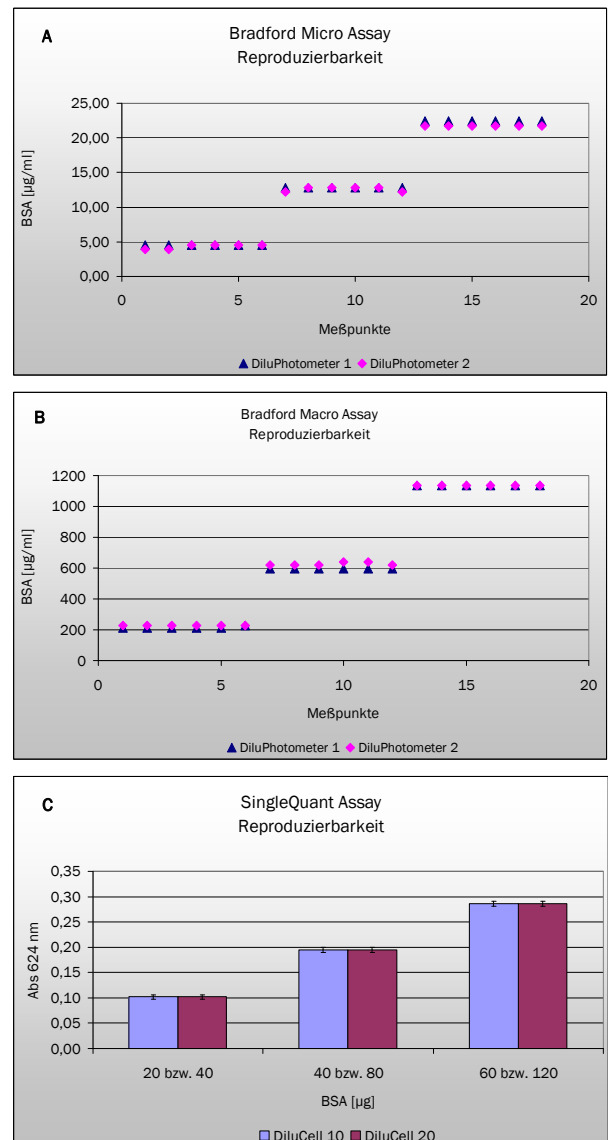


Abb. 4: Die Reproduzierbarkeit des Bradford- und des SingleQuant-Assays wurde durch mehrmaliges Vermessen von BSA-Lösungen dargestellt. **A + B)** Für den Bradford Micro- und Macro-Assay wurden je 3 unterschiedliche BSA-Konzentrationen in 2 unabhängigen Analyse-Ansätzen je 6-fach vermessen. **C)** Der SingleQuant-Assay wurde mit 5 verschiedenen BSA-Mengen durchgeführt. Pro BSA-Menge wurden 3 unabhängige Assay-Ansätze analysiert und jeder Ansatz in 6 unabhängigen Einzelmessungen vermessen.

Literatur

Bradford et al., (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
Popov et al., (1975), *Acta Biol. Med. Ger.* 34 (9), 1441-1446

Contact

Dr. Andrea Huber
info@implen.de

Implen GmbH
Am Schatzbogen 52
81829 Munich
Germany

Phone: +49 (0) 89 7263718-0
Fax: +49 (0) 89 7263718-54
www.implen.de

Dr. Judith Koch
info@serva.de

SERVA Electrophoresis GmbH
Carl-Benz-Str. 7
69115 Heidelberg
Germany

Phone: +49 (0) 6221 13840-0
Fax: +49 (0) 6221 13840-10
www.serva.de

Ordering Information

Product	Catalogue Number
OD600 DiluPhotometer™	B-80-3005-29
DiluCell 10	DC10
DiluCell 20	DC20
SERVA SingleQuant Assay Kit, 200 tests	39226.01
SERVA SingleQuant Assay Kit, 600 tests	39226.02