

GEBRAUCHSANLEITUNG

ProtaQuant Assay Kit

Kit for protein quantification
(Kat.-Nr. 39225.01)



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. ProtaQuant-Assay-Kit	2
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Kit-Komponenten	2
1.3. Zusätzlich benötigte Chemikalien und Geräte	3
1.4. Lagerbedingungen	3
2. ProtaQuant-Assay Protokoll	4
2.1. Überblick über das Verfahren	4
2.2. Durchführung des ProtaQuant-Assay	5
2.2.1. Ansetzen der Lösungen	5
2.2.2. Durchführung	5
2.2.3. Berechnung der Proteinkonzentrationen	7
3. Literatur	8

1. ProtQuant-Assay-Kit

1.1. Allgemeine Hinweise

Der ProtQuant™-Assay beruht auf der Ausfällung von Proteinen als unlösliche Farbstoffkomplexe mit saurer, methanolischer Amidoschwarz-10B-Lösung (Popov et al. 1975). Nach der Fällung werden die Protein-Farbstoffkomplexe abzentrifugiert. Das Pellet wird gewaschen und in NaOH wieder in Lösung gebracht. Die dabei freigesetzte Farbstoffmenge wird bei 620 nm gemessen und ist der Ausgangsmenge direkt proportional.

Vorteile der Methode:

- **Genauere und reproduzierbare Messergebnisse**
- **Schnelle Durchführung (ca. 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 Bicinchonic acid (BCA™).
- Das **Format des ProtQuant™-Assays** ist für den **Hochdurchsatz** optimal geeignet

Hinweis: Trägerampholyte binden den Farbstoff ebenfalls und täuschen dadurch zu hohe Proteinkonzentrationen vor, so dass in Analysenlösungen für die **2D-Gelelektrophorese** die **Proteinbestimmung vor dem Ampholytzusatz erfolgen** muss.

1.2. Kit-Komponenten

10 x Farbstoff-Konzentrat	2,5 ml
Elutionslösung (0,1 M NaOH)	30 ml
Rinderserumalbumin	15 mg
Multiscreen HTS™-DV 96-well Filtration System, clear styrene	1
PP-Masterblock 2 ml, 96 well	1
Microplate 96Deep-well PP 350 μ l square well	1
96 F Microwell plate	1

1.3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte:

Geräte:

- Sorvall Zentrifuge Multifuge 3 S-R und Rotor 75006444 (oder äquivalentes Gerät)
- Mikrotiterplatten-Reader
- Mikrotiterplattenschüttler
- Magnetrührer
- Vortex Mixer

Materialien:

- Eisessig
- Methanol, Kat.-Nr. 45630

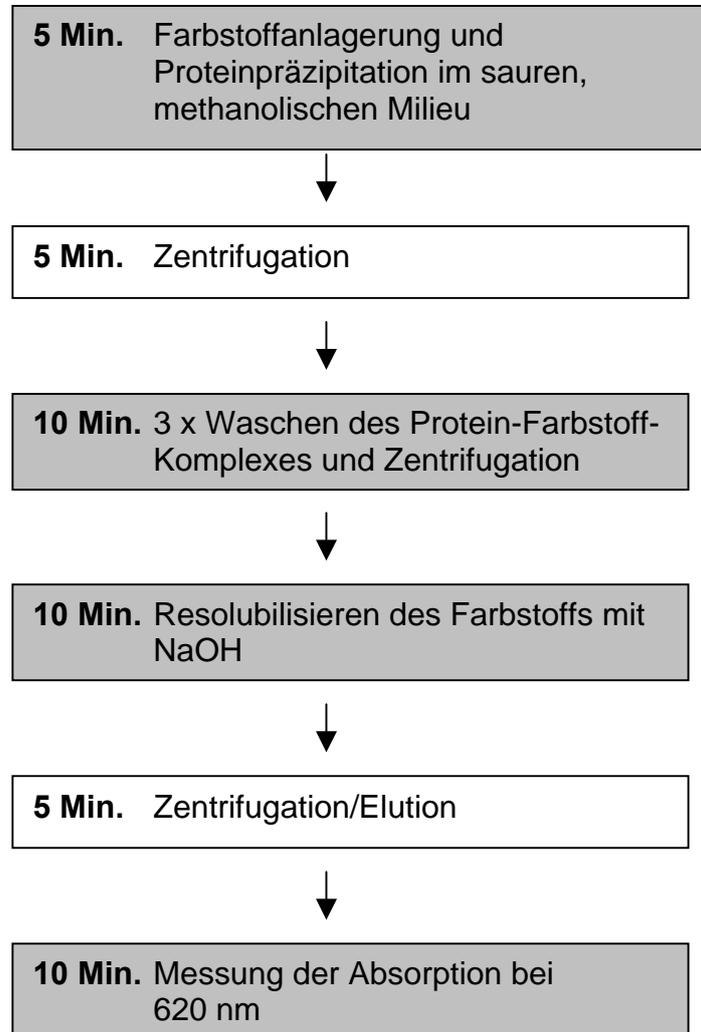
1.4. Lagerbedingungen

Die Lösungen des ProtaQuant™-Assay-Kits sowie der BSA-Referenzstandard werden bei 2 °C – 8 °C gelagert. Die restlichen Kit-Komponenten werden bei Raumtemperatur gelagert.

Bei Lagerung bei der empfohlenen Temperatur mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

2. ProtaQuant™-Assay Protokoll

2.1. Überblick über das Verfahren



2.2. Durchführung des ProtaQuant™-Assays

2.2.1. Ansetzen der Lösungen

Waschlösung	135 ml Methanol werden in einem 250 ml-Messzylinder mit 15 ml Eisessig versetzt.
10 x Farbstoff-Konzentrat	fertig zum Gebrauch
Farbstofflösung	Die gesamte Menge des 10 x Farbstoff-Konzentrats (2,5 ml) wird in einem 25 ml-Messzylinder auf 25 ml Endvolumen mit Waschlösung aufgefüllt.
Elutionslösung	fertig zum Gebrauch
BSA-Stammlösung	Inhalt des Gefäßes mit 3 ml Probenpuffer (Puffer, in dem die zu quantifizierende Probe gelöst ist) lösen (Konzentration: 5 mg/ml).
Blindlösung	Probenpuffer (R8)
Referenzlösungen	BSA-Referenzlösungen sind nach folgendem Schema anzusetzen:

Nr.	Konzentration der Referenzlösung	Ansatz	
R1	1,75 mg/ml	350 µl	BSA-Stammlsg. (Konz. 5 mg/ml)
		650 µl	Probenpuffer
R2	1,5 mg/ml	300 µl	BSA-Stammlsg. (Konz. 5 mg/ml)
		700 µl	Probenpuffer
R3	1,25 mg/ml	250 µl	BSA-Stammlsg. (Konz. 5 mg/ml)
		750 µl	Probenpuffer
R4	1 mg/ml	200 µl	BSA-Stammlsg. (Konz. 5 mg/ml)
		800 µl	Probenpuffer
R5	0,75 mg/ml	150 µl	BSA-Stammlsg. (Konz. 5 mg/ml)
		850 µl	Probenpuffer
R6	0,5 mg/ml	100 µl	BSA-Stammlsg. (Konz. 5 mg/ml)
		900 µl	Probenpuffer
R7	0,25 mg/ml	50 µl	BSA-Stammlsg. (Konz. 5 mg/ml)
		950 µl	Probenpuffer
R8	0 mg/ml	-	BSA-Stammlsg. (Konz. 5 mg/ml)
		1000 µl	Probenpuffer

2.2.2 Durchführung

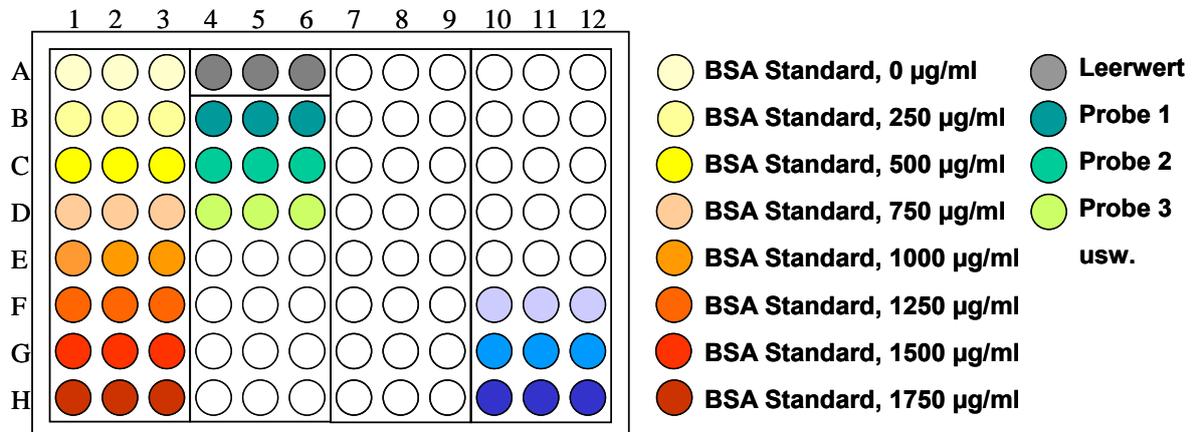


Abb. 1: Vorgeschlagenes Layout für 1 - 23 Proben in Dreifach-Bestimmung

1. **Multiscreen HTS™-DV 96-well Filtration System** Platte auf den **PP-Masterblock-2ml** setzen.
2. **30 µl Probenpuffer** in die Vertiefungen der **Multiscreen HTS™-DV 96-well Filtration System** Platte vorlegen.
3. **20 µl Proteinlösung** (Referenz- oder Probenlösung) in **Probenpuffer** zugeben.
4. **180 µl Farbstofflösung** pro Vertiefung zugeben. Ab jetzt die Zeit stoppen. Für 30 Sek. bei 300 rpm auf einem Schüttler und danach **bis zum Ablauf von 5 Minuten** ohne Schütteln bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Danach beide Platten zusammen für **5 Minuten bei 4000 rpm (3000 x g)** **zentrifugieren** (das Filtrat muss nicht aus der unteren PP-Masterblock Platte entfernt werden, da die Vertiefungen der Platte insgesamt 2 ml fassen und damit auch die Lösungen der Waschschrte).
6. **250 µl Waschlösung** pro Vertiefung zugeben, um überschüssigen Farbstoff herauszuwaschen. Zentrifugieren für **3 Minuten bei 4000 rpm (3000 x g)**.
7. **Schritt 6 zweimal** wiederholen.
8. **Multiscreen HTS™-DV 96-well Filtration System** Platte für die Elution des Farbstoffs auf die **Microplate 96Deep-well PP 350 µl square well** stellen. Den Farbstoff durch Zugabe von **250 µl Elutionslösung** pro Vertiefung resolubilisieren. Resolubilisierung durch **Schütteln** der Platte für **10 Minuten bei 200 rpm** unterstützen.
9. Platten für **4 Minuten bei 4000 rpm (3000 x g)** zentrifugieren.
10. **200 µl des Eluats** und zusätzlich **200 µl Elutionslösung** als Leerwert mit einer Mehrkanalpipette in eine 96-well Platte überführen.
11. Messung der **Absorption bei 620 nm** in einem Mikrotiterplatten-Reader.

2.2.3. 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.

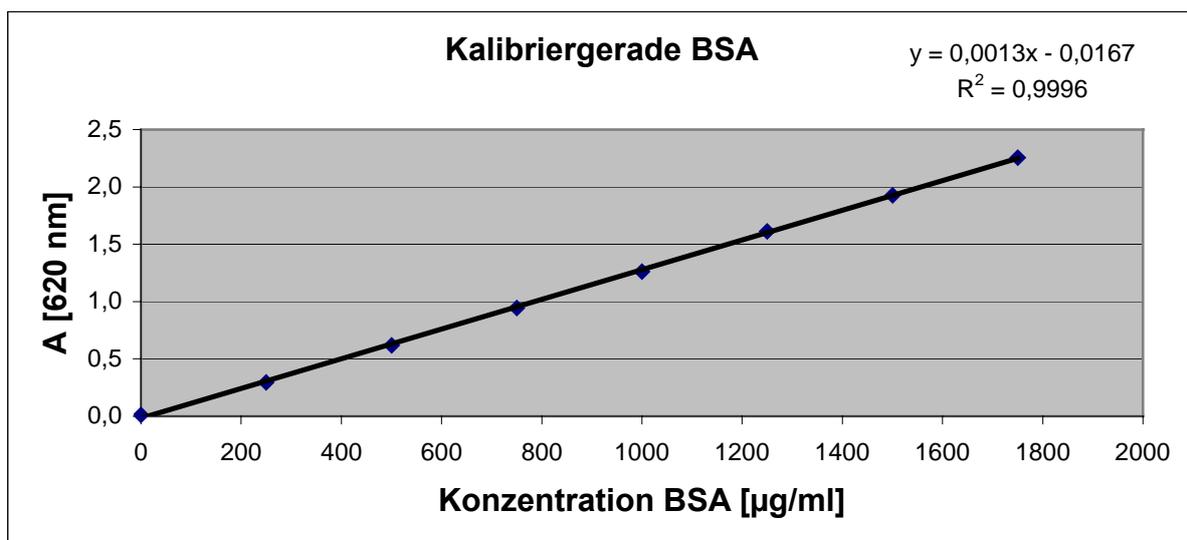
Hinweis:

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

Konzentration Eichreihe	Messwerte A_{620}	Messwerte minus Leerwert	Errechnete Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$]	SD Messwerte	CV in % Messwerte
Leerwert	0,0304			0,000	0,987
0	0,0415	0,0111	21,49	0,009	21,386
250	0,3259	0,2955	241,19	0,013	4,114
500	0,6478	0,6174	489,97	0,013	1,991
750	0,9741	0,9437	742,07	0,016	1,675
1000	1,2926	1,2622	988,17	0,039	3,034
1250	1,6428	1,6124	1258,77	0,028	1,675
1500	1,9579	1,9275	1502,24	0,037	1,912
1750	2,2864	2,2560	1756,10	0,052	2,280

Graf 1: BSA-Kalibriergerade aus Messwerten von Tabelle 1



Die Berechnung erfolgt über 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.