

ROTI®Quant universal Colorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung

0120

A. Der Kit enthält

ROTI®Quant universal Reagenz 1 (0118): 500 ml (0120.1) / 200 ml (0120.2)

⚠ Gefahr H318-H315 P280- P305+P351+P338-P310

ROTI®Quant universal Reagenz 2 (0119): 40 ml (0120.1) / 16 ml (0120.2)

⚠ - H411 P273

Ein Kit ist ausreichend für 500 (200) Ansätze in Küvetten oder 5000 (2000) Ansätze im Mikrotiterplattenformat.

Die Einzelbestandteile dieses Kits können nicht separat nachgekauft werden.

- B. Aufbewahrung** bei Raumtemperatur. Kühlen oder gefrieren Sie das Produkt nicht. In Reagenz 1 oder Reagenz 2 kann in Ausnahmefällen, z.B. durch den Versand bei tiefen Temperaturen, ein Präzipitat ausgefallen sein. In diesem Fall können die Kristalle durch vorsichtiges Erwärmen und Kippen leicht wieder in Lösung gebracht werden.
Verwenden Sie keine Reagenzien, die eine Farbveränderung oder Anzeichen mikrobieller Kontamination aufweisen.

C. Mechanismus

ROTI®Quant universal ist ein colorimetrischer Nachweis zur Detektion und Quantifizierung von löslichen Proteinen. Das Testsystem ist **hoch-ähnlich dem als BCA-Protein-Assay** bekannten Quantifizierungssystem und basiert gleichfalls auf einer Biuret-Reaktion in Kombination mit einer hochspezifischen colorimetrischen Enhancer-Reaktion.

Durch die sogenannte **Biuret-Reaktion** (Komplexbildung von Tripeptiden und größeren Polypeptiden mit Kupferionen) werden im alkalischen Reaktionsmedium des Testes die zweiwertigen Cu^{++} Ionen des Reagenzes 2 zu einwertigen Cu^+ Ionen reduziert. Die Bezeichnung stammt von der chemischen Ähnlichkeit der Reaktion mit derjenigen des Biuret-Moleküls mit Kupferionen. Der Komplex weist eine blaue Farbe auf, deren Intensität proportional zu der beteiligten Anzahl an Peptidbindungen (und damit Aminosäuren) ist.

Die **Verstärkung** der schwachen Farbe der Biuretkomplexe (um ca. 100fach) erfolgt dann durch die Chelatierung der Cu^+ Ionen mit **PCA**, einem Molekül, das eng verwandt ist mit der bekannten Bicinchoninsäure (BCA). Der resultierende Chelatkomplex ist grünlich-blau gefärbt, während BCA in einer violetten Farbe resultiert.

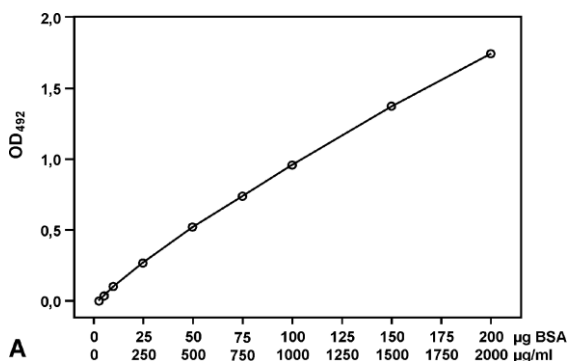
Die Farbentwicklung der kupferspezifischen Enhancer-Reaktion ist gleichfalls direkt proportional zu der Konzentration des anwesenden Proteins. Die entstehenden purpurfarbenen Kupferkomplexe entwickeln eine starke Lichtabsorption mit einem Maximum bei 503 nm, wobei das breite Maximum der Absorptionskurve auch hochsensitive und verlustfreie Messungen bei 492 nm zulässt. Dabei bildet die Reaktion keine echte Endpunkt-Messung: die Farbe entwickelt sich bei Raumtemperatur langsam und kann in der Wärme beschleunigt werden, sodass selbst bei kürzeren Zeiten eine höhere Sensitivität erreicht wird.

Standardisierung

Die Proteinmenge in der gemessenen Probe (und damit die Proteinkonzentration in der quantifizierten Lösung) wird jeweils bestimmt durch den Vergleich der Test-Messung mit einer Verdünnungsreihe eines Protein-Standards bekannter Konzentration (Abbildung A). Standard und Probe müssen immer gleich behandelt werden. Der lineare Messbereich des Assays reicht von 5 bis zu 2000 $\mu\text{g/ml}$ (0,5 bis 200 μg Protein gesamt).

Abbildung A

ROTI®Quant universal Standardkurve mit BSA (bovines Serumalbumin). Leerwert-korrigiert. Messung von je 100 µl Proteinlösung.



Toleranz gegenüber störenden Substanzen

Der ROTI®Quant universal zeigt eine sehr hohe Toleranz gegenüber Detergenzien (Abbildung D), Alkoholen oder Puffern (Abbildung B), die andere Messmethoden wie z.B. den Tests nach Bradford empfindlich stören. Die untenstehende Tabelle gibt Aufschluss über die Toleranz des Kits gegenüber einer Auswahl der gängigen Reagenzien.

Abbildung B

Toleranz des ROTI®Quant universal Tests gegenüber Detergenzien und anderen Zusatzstoffen, Beispiele. Leerwert-korrigiert. Messung von je 100 µl Proteinlösung im Makroansatz. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Angelika Böttger, Zoologisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München)

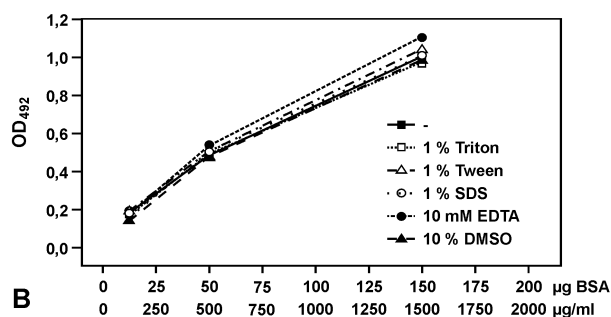


Tabelle 1: Toleranz gegenüber störenden Faktoren

Substanz	Konzentration
Ammoniumsulfat	1,5 M
DMF	10 %
DMSO	10 %
DTE	1 mM
DTT	1 mM
EDTA	10 mM
EGTA	nicht kompat.
Ethanol	10 %
Glucose	10 mM
Glycerin	10 %
Glycin	0,1 M
Guanidin-HCl	4 M
Harnstoff	3 M
HCl	0,1 M
HEPES	0,1 M
Imidazol	50 mM
MES pH 6,1	0,1 M
Methanol	10 %

Substanz	Konzentration
MOPS	0,1 M
NaOH	0,1 M
Natriumacetat pH 4,8	0,2 M
Natriumazid	0,2 %
Natriumcarbonat	0,1 M
Natriumchlorid	1 M
Natriumdesoxycholat	5 %
Natriumphosphat	0,1 M
NP-40	5 %
PIPES	0,1 M
RIPA-Puffer	unverdünnt
SDS	5 %
Sucrose	40 %
Thimerosal	0,01 %
Tris	250 mM
Triton X-100	5 %
Triton X-114	1 %
Tween 20	5 %

Manche wenige Substanzen interferieren allerdings trotz allem mit den ROTI®Quant universal Reagenzien. Es sind dies Reagenzien mit stark reduzierendem Potential, auch reduzierende Zucker, starke Säuren oder Basen, oder Chelatbildner. Die folgende Tabelle (Tabelle 2) gibt Auskunft über einige interferierende Agenzien.

Tabelle 2: Störende Faktoren

Substanz	max. tolerierte Konzentration
Ammoniumsulfat	1,5 M
Bicin	20 mM
Bis-Tris	33 mM
DTT / DTE	1 mM
EDTA	10 mM
EGTA	keine
Glucose	10 mM
Guanidin-HCl	4 M
Imidazol	50 mM
β-Mercaptoethanol	0,01 %
Natriumazid	0,2 %
Tricin	25 mM

Als Strategien, um trotz störender Faktoren die Proteinkonzentration messen zu können, empfehlen wir:

- Verdünnen der Probe bis unter kritische Werte der störenden Substanz.
- Dialyse oder Gelfiltration der Probe, um die störende Substanz zu entfernen.
- Präzipitation der Proteine mittels TCA.
- Handelt es sich um einen Chelatbildner, kann die Menge des eingesetzten Reagenzes 2 erhöht werden: auf 7,5:1 oder 5:1 (Ratio Reagenz 1:Reagenz 2, Normalwert: 15:1)

Man beachte, dass auch in diesem Fall die Standard-Proteine genauso behandelt werden müssen wie die Proben.

Abhängigkeit von der Proteinstruktur

Obwohl die Quantifizierung mit dem ROTI®Quant universal weniger stark von der genauen Proteinstruktur abhängt, als man das vom Bradford-Assay kennt, kann die genaue Aminosäurezusammensetzung und Primärstruktur der Proteine das Resultat doch beeinflussen (Abbildung C). Wir empfehlen deshalb, bei der Messung von Proteinen, die in der Konformation stark von globulären Proteinen abweichen, als Standard ähnliche Proteine einzusetzen (z.B. Bovines Gammaglobulin bei Immunglobulinen).

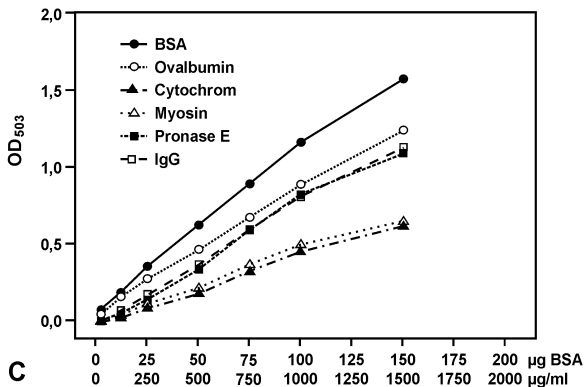


Abbildung C

Messunterschiede verschiedener Standard-Proteine mit dem ROTI®Quant universal. Leerwert-korrigiert.

D. Messung

Ansatzvolumina

Die Messungen können in Reaktionsgefäßen/Küvetten (Makroansatz) oder in Mikrotiterplatten (Mikroansatz) durchgeführt werden (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3	Makroansatz	Mikroansatz
Probenvolumen	50-100 µl	≤50 µl
Verhältnis Probe : Arbeitslösung	1:10 oder 1:20	1:2 oder 1:4
Vorgeschlagene Messung bei	503 nm (Photometer)	492 nm (Mikroplatten-Reader)

Proteinstandard

Pipettieren Sie in saubere Reaktionsgefäße die Verdünnungsreihe des Proteinstandards (Tabelle 4). Wir empfehlen, einen frisch verdünnten Protein-Standard (z.B. Albumin Fraktion V, Art. Nr. T844.1) zu verwenden. Verwenden Sie dieselben Verdünnungspuffer für Standard-Proteine und Proben. Die Albumin-Stocklösung (2 mg/ml) kann in Aliquots eingefroren und bei -20 °C aufbewahrt werden.

Lösung	Endkonz. BSA (µg/ml)	Vol. Verdünn.puffer	Vol. und Herkunft BSA
A	2000	0	400 µl Stocklösung (2.0 mg/ml)
B	1500	125	375 µl Stocklösung (2.0 mg/ml)
C	1000	325	325 µl Stocklösung (2.0 mg/ml)
D	750	325	325 µl Lösung B
E	500	325	325 µl Lösung C
F	250	325	325 µl Lösung E
G	125	325	325 µl Lösung F
H	50	450	300 µl Lösung G
I	25	400	100 µl Lösung G
K	5	400	100 µl Lösung I
Leerwert	0	400	0

Proben

Stellen Sie von Ihren Proben jeweils eine 1:10 Verdünnung, eventuell auch eine 1:20, 1:50 oder 1:100 Verdünnung her, um auf jeden Fall eine Messung im linear quantifizierbaren Bereich zu erhalten.

Arbeitslösung

Mischen Sie 15 Teile Reagenz 1 und 1 Teil Reagenz 2 in einem sauberen Gefäß. Diese Färbelösung ist bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz 24 Stunden stabil.

Die insgesamt benötigte Arbeitslösung können Sie durch folgende Formel abschätzen:
(Anzahl der Proteinstandard-Verdünnungen + Leerwert + Anzahl zu messender Proben)
multipliziert mit der Zahl der Wiederholungen

ergibt: in ml die Arbeitslösung im Makroansatz
geteilt durch 10 in ml die Arbeitslösung im Mikroplattenansatz

Beispiel: 10 Standard-Verdünnungen + 1 Leerwert + 6 Proben = 17
Alle Messungen dreifach, also 17 x 3 = 51
Makroansatz: 51 ml Arbeitslösung
Mikroplattenansatz: 5,1 ml Arbeitslösung

Pipettierprotokoll

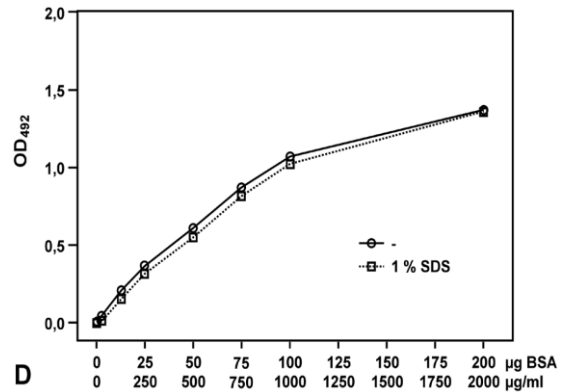
Makroansatz: Das *Volumenverhältnis* Probe : Arbeitslösung soll sein 1:10 bis 1:20 (Mikroplattenansatz jeweils in Klammern: 1:2 bis 1:4). Das bedeutet, im Makroansatz muss 10x bis 20x soviel Arbeitslösung eingesetzt werden wie Probe (im Mikroansatz 2x bis 4x soviel).

1. Pipettieren Sie je 100 µl oder 50 µl (50 µl) der Standards, des Leerwertes und Ihrer Proben in saubere Teströhrchen.
2. Geben Sie 1 ml (100 µl) Arbeitslösung dazu.
3. Mischen Sie durch mehrmaliges Invertieren oder Pipettieren.
4. Inkubieren Sie die geschlossenen Röhrchen
2 Stunden bei Raumtemperatur *oder*
30 Minuten bei 37 °C *oder*
15 Minuten bei 60 °C
5. Stoppen Sie die Reaktion, indem Sie die Röhrchen auf Raumtemperatur kühlen.
Beachten Sie: Die Reaktion hat keinen echten Endpunkt, d.h. die Farbe entwickelt sich auch bei Raumtemperatur weiter. Sie schreitet allerdings bei Raumtemperatur so langsam voran, dass während der Messung in den verschiedenen Röhrchen keine signifikanten Unterschiede entstehen. Wir empfehlen aber, alle Röhrchen innerhalb von 15 Minuten zu messen.
6. Stellen Sie das Photometer bei 503 nm oder 492 nm Wellenlänge durch die Messung von reinem Wasser in einer sauberen Küvette (Mikrotiterplatte) auf 0 ein.
7. Überführen Sie die Leerwert-Kontrolle, die Proteinstandards und Ihre Proben in Küvetten (Mikrotiterplatten) und messen Sie alle Lösungen bei der gleichen Wellenlänge.
8. Korrigieren Sie Ihre Messwerte, indem Sie den Messwert des Leerwertes abziehen.

9. Tragen Sie in einem Graphen die Proteinkonzentrationen der Standards – in µg/ml auf der X-Achse – gegen die korrigierten Messwerte – auf der Y-Achse – auf. Die Proteinkonzentration in Ihrer Probe können Sie anhand dieser Eichkurve ablesen.

Abbildung D

Standardkurve eines Mikroansatzes. Vergleich der BSA Probe ohne SDS und in Anwesenheit von 1 % SDS. Ansatz: 50 µl Proteinlösung + 100 µl Arbeitslösung, Messung nach 60 min. bei 37 °C.



E. Trouble shooting

Problem	Mögliche Begründung	Lösung
Keine Farbe in allen Röhren	Der Probenpuffer enthält einen chelatbildenden Bestandteil	- Dialyse, Entsalzung oder Fällung der Probe - Erhöhen der Menge von Reagenz 2 in der Arbeitslösung (z.B. auf 2:15 oder 4:15)
Farbe der Proben heller / niedrigere Messwerte als erwartet	Proteinkonzentration zu niedrig	- Konzentrierung der Proteine durch Fällung oder Spectra/Gel Absorbent - Erhöhung der Inkubationstemperatur
	pH-Wert der Probe stark alkalisch oder sauer	- Dialyse, Entsalzung oder Fällung der Probe
	Messung bei falscher Wellenlänge	- Wellenlänge zwischen 480 und 515 nm verwenden
	Inkubationstemperatur zu niedrig	- Erhöhung der Inkubationstemperatur
Farbe der Proben dunkler / höhere Messwerte als erwartet	Proteinkonzentration zu hoch	- Verdünnen der Probe - Inkubationstemperatur erniedrigen
	Probe enthält Lipide oder Lipoproteine	- Reextrahieren der Proteine
	Probe enthält ein reduzierendes Agenz oder ein Thiol	- Dialyse, Entsalzung oder Fällung der Probe
Photometer hat keinen 503 oder 492 nm Filter		- Messung zwischen 480 und 515 nm ist möglich, unterhalb von 492 oder oberhalb von 503 nm kann die Sensitivität allerdings etwas nachlassen.

F. Zusätzlich benötigte Geräte und Reagenzien

- BSA (Art. Nr. T844.1)
- SpectraGel Absorbent (Art. Nr. 0115.1)
- Küvetten (Art. Nr. XK20.1)
- Mikrotiterplatten (Art. Nr. CNP7.1 + XT79.1 (Deckel))

ROTI®Quant universal	1 Mini-Kit (ca. 200 Messungen in Küvetten)	0120.2
	1 Kit (ca. 500 Messungen in Küvetten)	0120.1

Carl Roth GmbH + Co. KG
 Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
 Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe
 Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0
 Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
 info@carlroth.de • www.carlroth.de

gh 03/2021

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428. Vorsitzender des Aufsichtsrats: Eberhard Gaul, Geschäftsführer: André Houdelet