



ROTI® Quant

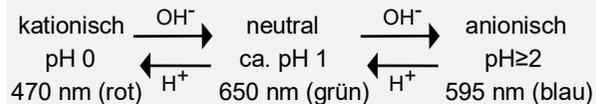
Proteinbestimmung nach Bradford

Lagertemperatur: 4 °C

A. Einleitung

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 kommt in drei Zuständen vor, die jeweils bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren (Abb.1). Durch Bindung an ein Protein wird der Farbstoff vom kationischen in den anionischen Zustand überführt, die Absorption kann bei 595 nm gemessen werden. Diese Absorptionsänderung ist über weite Bereiche zur Proteinkonzentration proportional und wurde als erstes von Bradford zur Konzentrationsbestimmung verwendet (1). Coomassie Brilliant Blue-G250 bindet hauptsächlich an basische Aminosäuren (2). Dies erklärt die unterschiedlich starke Absorption verschiedener Proteine. Es empfiehlt sich daher, die Absorptionsmessungen auf eine Eichgerade mit BSA zu beziehen.

Abb.1: Drei absorbierende Zustände von CBBG 250 (3)



Leichte Farbvariationen der 1x Färbelösung sind Farbstoffchargenabhängig und beeinträchtigen die Messungen nicht. Im Falle einer Blaufärbung der Stocklösung oder der 1x Gebrauchslösung vor dem Mischen mit den Proteinen siehe Trouble Shooting (F).

B. Makroansatz (20-100 µg Protein)

Verdünnen Sie 1 Volumen der 5X-Färbelösung mit 4 Volumen H₂O bidest. Filtern Sie die verdünnte Lösung durch einen Papierfilter. Die 1X-Färbelösung ist bei Raumtemperatur etwa eine Woche haltbar.

Stellen Sie sich Verdünnungen Ihres Eichproteins in Konzentrationen von 0,2-1 mg/ml in Probenpuffer her. Wir empfehlen bei jeder Vermessung von Proben den Vergleich mit den Standards.

1. Pipettieren Sie je 100 µl des Probenpuffers, der Standards und Ihrer Proben in saubere Teströhrchen.
2. Geben Sie 5 ml 1X-Färbelösung dazu.
3. Mischen Sie durch mehrmaliges Invertieren.
4. Messen Sie die OD₅₉₅ der Standards und Ihrer Proben nach 5 bis 30 min gegen den Nullwert (Probenpuffer in 1X-Färbelösung).
5. Tragen Sie die OD₅₉₅ der Standards gegen die eingesetzte Proteinmenge auf. Die Proteinmenge in Ihrer Probe können Sie anhand der Eichgerade ablesen.

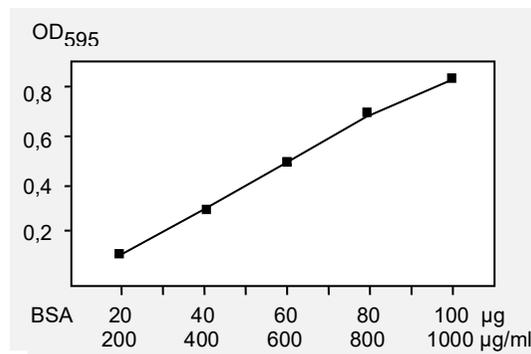


Abb.2 Darstellung einer typischen Standardkurve mit ROTI®Quant (Makroansatz) und BSA als Eichprotein.

C. Mikroansatz (1-20 µg Protein)

Für den Mikroansatz wird die 5X-Lösung direkt eingesetzt. Es ist kein Verdünnen und Filtrieren notwendig.

Stellen Sie sich Verdünnungen Ihres Eichproteins in Konzentrationen von 1- 25 µg/ml in Probenpuffer her. Wir empfehlen bei jeder Vermessung von Proben den Vergleich mit den Standards.

1. Pipettieren Sie je 800 µl des 1X Probenpuffers (für den Nullwert), der Standards und Ihrer Proben in saubere Teströhrchen.
2. Geben Sie 0,2 ml 5X-Färbelösung dazu.
3. Mischen Sie durch mehrmaliges Invertieren.
4. Messen Sie die OD₅₉₅ der Standards und Ihrer Proben nach 5 bis 30 min gegen den Nullwert (800 µl 1X Probenpuffer + 0,2 ml 5X Färbelösung).
5. Tragen Sie die OD₅₉₅ der Standards gegen die eingesetzte Proteinmenge auf. Die Proteinmenge in Ihrer Probe können Sie anhand der Eichgerade ablesen.

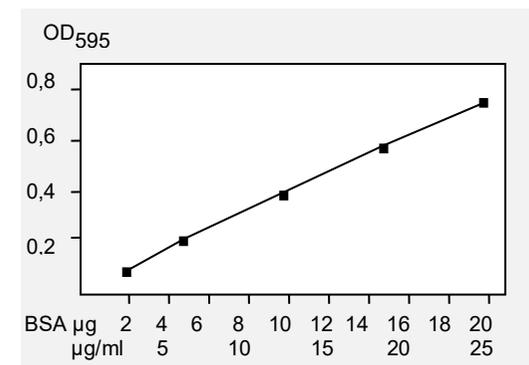


Abb.3 Darstellung einer typischen Standardkurve mit ROTI®Quant (Mikroansatz) und BSA als Eichprotein.

D. Proteinbestimmung in Mikrotiterplatten

1. Benötigte Ausstattung

- Mikrotiterplatte
- ELISA Reader
- BSA-Stammlösung (400 µg/ml); Wir empfehlen unsere lyophilisierten Albumine, z.B. Fraktion V, Europe (Best.-Nr. 8076) oder Albuminlösung 30 % (Best.-Nr. 9401)

2. Stellen Sie sich bitte die entsprechende Standard-Verdünnungsreihe in Konzentrationen von 20-100 µg/ml her. Wir empfehlen, als erstes die BSA-Lösung mit der Konzentration 100 µg/ml aus der Stammlösung (400 µg/ml) herzustellen. Ausgehend davon lassen sich die restlichen Konzentrationen leicht einstellen.

Pipettierschema:

BSA (µg/ml)	µl aus BSA-Verdünnung	µl H ₂ O _{dd}
0	-	110
20	40 µl aus 100 µg/ml	160
30	45 µl aus 100 µg/ml	105
40	80 µl aus 100 µg/ml	120
50	60 µl aus 100 µg/ml	60
60	120 µl aus 100 µg/ml	80
80	160 µl aus 100 µg/ml	40
100	200 µl aus 400 µg/ml	600

3. Durchführung

- Verdünnen Sie bitte die zu vermessenden Proben
Beispiel:

Verdünnung der Proben	Pipettierschema
1:20	10 µl Pr. + 190 µl H ₂ O _{dd}
1:40	5 µl Pr. + 195 µl H ₂ O _{dd}

4. Pipettieren Sie je 50 µl der Standard-Verdünnungsreihe und der Probeverdünnungen in die Wells der Mikrotiterplatte. Wir empfehlen jeweils zumindest Doppelbestimmungen durchzuführen.
5. Verdünnen Sie bitte 2 Teile ROTI®Quant (5x) mit 5,5 Teilen H₂O_{dd} und pipettieren Sie je 200 µl zu den vorgelegten Standards und Proben.
6. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte für 5 min bei RT und vermessen Sie anschließend die OD₅₉₅.
7. Tragen Sie die OD₅₉₅ für jede Probe gegen die eingesetzte Proteinmenge auf.

E. Kompatibilität

Der Makroassay ist aufgrund der hohen Verdünnung der Probe und darin enthaltenen Reagenzien mit vielen Chemikalien weitgehend kompatibel.

Im Mikroassay können dagegen Einschränkungen in der Empfindlichkeit auftreten. Dies gilt besonders für Proben mit Detergenzien, aber auch für Proben mit anderen Substanzen, wie z.B. Glycerin (Tab.1).

Grundsätzlich empfehlen wir für solche Proben die Verwendung des ROTI®Quant universal Testsystems (Best.-Nr. 0120). Dieses Detektionssystem beruht auf einer Biuret-Reaktion und ist weitgehend unabhängig von störenden Substanzen. Wenn Sie Ihre Proben reinigen möchten gilt folgendes Rezept (4):

Sie benötigen folgende Lösungen:

500 mM KPh pH 7,4, 250 mM CaCl₂ Ethanol pA

Der pH der Proben sollte im neutralen Bereich liegen.

1. Geben Sie zu 400 µl Probe 20 µl 500 mM KPh, pH 7,4 und mischen Sie durch dreimaliges Invertieren.
2. Geben Sie 20 µl 250 mM CaCl₂ dazu und mischen Sie durch dreimaliges Invertieren.
3. Geben Sie 1 ml Ethanol dazu und mischen Sie den Ansatz gut durch.
4. Zentrifugieren Sie 1 min mit 7000 g und werfen Sie den Überstand.
5. Geben Sie 100 µl H₂O und 1 ml Ethanol dazu und mischen Sie den Ansatz gut durch.
6. Zentrifugieren Sie 1 min mit 7000 g und werfen Sie den Überstand.
7. Geben Sie 200 µl 5X-Färbelösung dazu und warten Sie 5 min (Lösung der Protein-CaPh-Präzipitate). Nach Zugabe von 800 µl Wasser können Sie die OD₅₉₅ vermessen.

Tab.1: Kompatible Konzentrationen von Reagenzien (400 µl Probe/Mikroansatz)

	ohne Aufbereitung der Proben	mit Aufbereitung der Proben
Triton X 100	0,025 %	3 %
SDS	0,005 %	0,33 %
Chaps	0,03 %	2,5 %
Desoxycholat	0,002 %	0,075 %
Glycerin	5 %	30 %

F. Trouble shooting

x Messwerte sind nicht reproduzierbar → Mischen Sie die Stammlösung sorgfältig vor dem Entnehmen eines Aliquots.

x Stammlösung oder 1x Färbelösung blau / Nullwert sehr hoch / Kurve sehr flach → Lösung mit ortho-Phosphorsäure bis zum Farbumschlag ansäuern.

Hintergrund: Coomassie® G250 kann drei Ionenzustände mit charakteristischen Farben annehmen (siehe auch Abb. 1, Seite 1):

kationisch	rot	pH ~0	470 nm
neutral	grün	pH ~1	650 nm
anionisch	blau	pH ≥2	595 nm

Die *Kationen* besitzen als einzige Ionenform eine starke Proteinbindungseffizienz, neutrale oder anionische Formen des Farbstoffs binden nur schwach. Für eine effiziente Proteinbindung müssen daher die Stammlösung rot-braun und die 1x Färbelösung rot-braun bis grünlich-braun gefärbt sein. Verändert die Stammlsg. oder die 1x Lsg. die Farbe nach **Blau**, sollte sie durch einige Tropfen ortho-Phosphorsäure angesäuert werden, so dass die kationische Ionenform wieder überwiegt.

G. Literatur

- (1) Bradford (1976), *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- (2) Chial und Splittgerber (1993), *Anal. Biochem.* 213:362-369.
- (3) Compton und Jones (1985), *Anal. Biochem.* 151:369-374.
- (4) Pande und Murthy (1994), *Anal. Biochem.* 220:424-426.

H. Gefahren- und Sicherheitshinweise

     **Gefahr** H226-H290-H302-H314

P210-P280-P303+P361+P353-P305+P351+P338

ROTI®Quant	K015.2	50 ml
	K015.3	200 ml
	K015.1	500 ml

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

ip 07/2021

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. Geschäftsführer: André Houdelet