Gebrauchsanweisung

ROTI®Nanoquant

Zur Proteinbestimmung kleiner Proteinmengen

Lagertemperatur: +4 °C

A. Einleitung

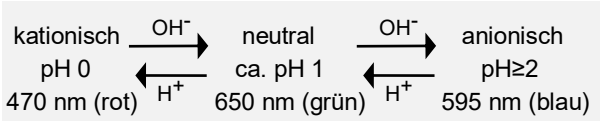
ROTI®Nanoquant wurde von uns entwickelt als Modifikation der Proteinbestimmung nach Bradford (1,2).

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.

Mittels ROTI®Nanoquant können Sie in wässrigen Lösungen reproduzierbar Proteinmengen ab 200 ng bestimmen (200 µl bei c=1 µg/ml im Standardansatz, bzw. 50 µl bei c=4 µg/ml in Mikrotiterplatten).

Jede Probe wird bei 590 nm und 450 nm vermessen. Die Linearität ergibt sich aus dem Quotient $OD_{590/450}$.

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 (H).

B. Rezepte

Arbeitslösung ROTI®Nanoquant:

20 ml ROTI®Nanoquant (5x-Konz.) +80 ml H_2O_{dd}

Die Arbeitslösung ROTI®Nanoquant muss nicht filtriert werden. Bei Raumtemperatur für etwa eine Woche haltbar.

BSA-Konzentrationen für die Eichreihe:

200 ng/200 µl = 1 µg/ml bis

20 µg/200 µl = 100 µg/ml

C. Proteinbestimmung in Küvetten

1. Pipettieren Sie in Küvetten:
   - für den Nullwert der Eichgerade (Probe 1): 200 µl H_2O_{dd} + 800 µl Arbeitslösung ROTI®Nanoquant.
   - für die Eichreihe (Probe 2-Probe S): je 200 µl der Standards + 800 µl Arbeitslösung ROTI®Nanoquant
   - für die eigentliche Bestimmung (Probe T bis Probe Z): je 200 µl Ihrer Proben + 800 µl Arbeitslösung ROTI®Nanoquant
2. Mischen Sie durch mehrmaliges Invertieren.
3. Pipettieren Sie bitte reines H_2O_{dd} in Ihre Referenz-Küvette.
4. Messen Sie die OD_{590} aller Ansätze (Probe 1 bis Probe Z) gegen das reine H_2O_{dd} als Referenz (siehe Abb.2).
5. Messen Sie die OD_{450} aller Ansätze (Probe 1 bis Probe Z) gegen reines H_2O_{dd} als Referenz (siehe Abb.2).
6. Tragen Sie den Quotient OD_{590}/OD_{450} gegen die eingesetzte Proteinmenge auf (siehe Abb.3). Die Proteinmenge in Ihrer Probe können Sie anhand der Eichgerade ablesen.

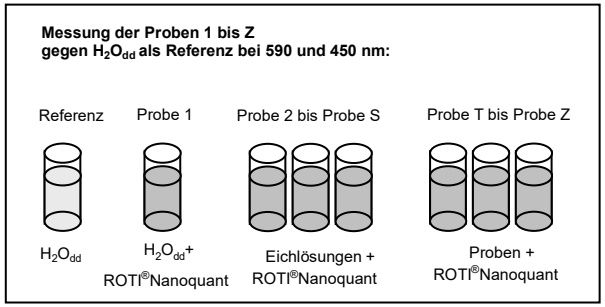


Abb. 2

Untere Nachweisgrenze:
0,2 µg Protein (200 µl mit c=1 µg/ml)

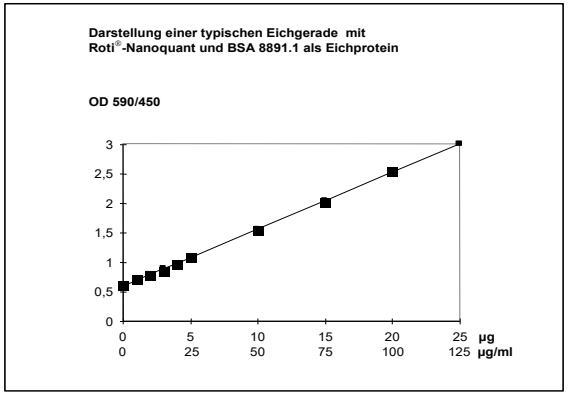


Abb. 3 (Küvettentest)

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. Verdünnen Sie die zu vermessenden Proben, z.B.:

Verdünn. der Probe	Pipettierschema
1:20	10 µl P + 190 µl H_2O_{dd}
1:40	5 µl P + 195 µl H_2O_{dd}

3. Pipettieren Sie je 50 µl der Standard-Verdünnungsreihe und der Proben-Verdünnungen in die Wells der Mikrotiterplatte. Wir empfehlen jeweils zumindest Doppelbestimmungen durchzuführen.
4. Verdünnen Sie bitte 1 Teil ROTI®Nanoquant (5x) mit 4 Teilen H_2O_{dd} und pipettieren Sie von dieser Arbeitslösung je 200 µl zu den vorgelegten Standards und Proben.
5. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte für 5 min bei RT und vermessen Sie anschließend die OD_{590} und nachfolgend die OD_{450}.
6. Tragen Sie den **Quotient OD_{590}/OD_{450}** für jede Probe gegen die eingesetzte Proteinmenge auf.

Untere Nachweisgrenze:
0,2 µg Protein (50 µl mit c=4 µg/ml)

E. Standard-Verdünnungsreihe

Stellen Sie nach dem Pipettierschema (s. u.) die Standard-Verdünnungsreihe her. Wir empfehlen, zunächst die BSA-Lösungen mit den Konzentrationen 10 und 100 µg/ml aus der Stammlösung (400 µg/ml) herzustellen (fett gedruckt). Ausgehend davon lassen sich die restlichen Konzentrationen leicht einstellen.

Pipettierschema:

BSA (µg/ml)	µl aus BSA-Verd.	µl H_2O_{dd}
0	-	200
1	20 µl aus 10 µg/ml	180
2,5	50 µl aus 10 µg/ml	150
5	100 µl aus 10 µg/ml	100
10	**40 µl aus 100 µg/ml**	**360**
25	50 µl aus 100 µg/ml	150
50	100 µl aus 100 µg/ml	100
75	150 µl aus 100 µg/ml	50
100	**200 µl aus 400 µg/ml**	**600**

F. Tips für größere Pipettiergenauigkeit

1. Tauchen Sie die Spitze bitte nur wenige mm in die Flüssigkeit ein.
2. Halten Sie die Pipette bitte senkrecht.
3. Benetzen Sie die Spitze bitte vor der eigentlichen Probenentnahme mit der Proteinlösung.
4. Legen Sie die Spitze bei der Flüssigkeitsabgabe bitte an die Gefäßwand an.
5. Verwenden Sie bitte Spitzen höchster Qualität. Wir empfehlen unsere MµlTi®-Universalspitze 1-200 µl (Best.-Nr. 7058.1) und 100-1000 µl (Best.-Nr. 8163.1).

G. Kompatibilität

Gundlegend ist die Proteinquantifizierung nach Bradford eine sehr störungsanfällige Methode, und die beim ROTI®Nanoquant vorliegende Modifizierung für sensitive Nachweise verstärkt diese Problematik eher zusätzlich. Störungsfrei arbeitet der Nachweis ausschließlich bei Proteinen in einer leichten Salzlösung wie maximal 1 x PBS oder ähnlichen Phosphatpuffern. Niedrig konzentrierte Trispuffer wie 1x TBS können ebenfalls eingesetzt werden. Bitte achten Sie jedoch darauf, dass das Protein für die Standardisierung im selben Puffer angesetzt wird, in dem auch die Proben vorliegen.

Störungsanfällig ist der Nachweis v.a. für Detergenzien, aber auch für andere Substanzen wie z.B. Glycerin (siehe Tabelle).

	störungsfreie Maximalkonzentration
Triton X 100	0,025 %
SDS	0,005 %
Chaps	0.03 %
Desoxycholat	0,002 %
Glycerin	5 %

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

H. Trouble shooting

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

x Stammlösung oder 1x Färbelösung blau / Messwert der Kontrolle 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-Phosphor-säure angesäuert werden, so dass die kationische Ionenform wieder überwiegt.

I. Literatur

(1) Bradford, M., (1976) *Anal. Biochem.* 72:248-254.
(2) Niess, U., (2004) *J Bacteriol* 186:3640-3648.
(3) Seipp, S., (2006) *Int. J. Dev. Biol.* 50:63-70.
(4) Zor, T. und Selinger, Z., (1996) *Anal. Biochem.* 236:302-308.

K. Sicherheitshinweise:

Gefahr H226-H290-H302-H314
P210-P280-P303+P361+P353-P305+P351+P338

ROTI®Nanoquant **K880.2** **50 ml**
K880.3 **200 ml**
K880.1 **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