Lumiprobe
Life science solutions



Инструкция к набору ProteOrange® для определения количества белка

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору ProteOrange® для определения количества белка 3-9

RU

Инструкция к набору ProteOrange® для определения количества белка

Набор предназначен для высокочувствительного определения концентрации белка флуоресцентным методом. Краситель ProteOrange® в свободном виде характеризуется очень низкой способностью к флуоресценции. Он селективно связывается с молекулами белка, образуя комплексы, в составе которых проявляет выраженную флуоресценцию при облучении голубым светом. Флуоресцентный метод определения концентрации белка с использованием реагента ProteOrange чувствительнее спектрофотометрического и других классических методов, которые используются для количественного анализа образцов, содержащих исследуемые белки (Lowry, Bradford, BCA).

Реагент ProteOrange в комплексе с белком характеризуется флуоресценцией с максимумом возбуждения при ~485 нм и максимумом эмиссии при ~590 нм. Набор можно использовать на любом типе флуориметра, который имеет соответствующий источник возбуждения и канал детекции. При использовании кюветного флуориметра измеряемый диапазон концентрации белка от 10 нг/мл до 10 мкг/мл, для планшетного флуориметра — от 100 нг/мл до 10 мкг/мл.

Состав набора

Компонент набора	Количество 14102 1 mL dye
41210, Краситель ProteOrange® для определения количества белка / ProteOrange® protein quantification reagent, 500×, 1 mL	1
A6650, Стандарт концентрации белка / Protein standard, БСА 2 mg/mL в ТЕ буфере, 500 uL	1
S2750, Буфер ProteOrange для определения количества белка / ProteOrange protein quantification buffer, 10x, 50 mL	1

Хранить при температуре +4°C. Прогреть до +20°C перед использованием.Транспортировка: до трех недель при комнатной температуре.

Срок хранения 12 месяцев.

Протокол

Данный протокол приведен для случая использования набора на планшетном флуориметре и объема образца 200 мкл (96-луночный планшет). При использовании флуориметра с другим объемом образца (например, на кюветном флуориметре с объемом образца 2 мл для стандартной флуориметрической кюветы) следует пересчитать все объемы соответственно.

Протокол использования данного набора включает этап прогрева образцов при 90–95 °C в течение 10 минут для денатурации белков и стабилизации уровня флуоресценции измеряемых образцов. В приведенном ниже протоколе предлагается готовить стандарты концентрации белка и экспериментальные образцы в отдельных пробирках с их последующим прогревом и переносом образцов в планшет для измерения флуоресценции. При наличии соответствующего оборудования, Вы можете приготовить стандарты концентрации белка и экспериментальные образцы в планшете, во избежание испарения герметично накрыть планшет крышкой или пленкой, устойчивой к высоким температурам, и прогреть образцы согласно протоколу. После остывания образцов до комнатной температуры образовавшийся конденсат необходимо сбросить центрифугированием и продолжить работу согласно протоколу.

1. **Приготовление 1× буфера ProteOrange.**

   Приготовьте необходимое количество 1× буфера ProteOrange исходя из объёма образца и количества измеряемых образцов (см. п.4) и стандартов концентрации белка (см. п.3). Для получения 1× буфера разведите *10× концентрат буфера ProteOrange* в 10 раз деионизованной водой.

2. **Приготовление рабочего раствора красителя ProteOrange.**

Приготовьте рабочий раствор *красителя ProteOrange*. Для этого разведите *500× концентрат красителя ProteOrange* в 500 раз 1× *буфером ProteOrange*.

Например, для измерения 3 образцов (см. п.4, пример #1) и 10 стандартов (см. п.3) необходимо приготовить ~4 мл 1× буфера ProteOrange и 4 мл рабочего раствора красителя (смешайте 8 мкл концентрата красителя ProteOrange и 4 мл 1× буфера ProteOrange).

! Рабочий раствор красителя рекомендуется использовать в течение нескольких часов после приготовления. При проведении отсроченных измерений рекомендуется беречь от света готовый рабочий раствор красителя.

! Для приготовления рабочего раствора красителя используйте только пластиковую посуду. Стеклянная посуда может сорбировать на своих стенках краситель, что приведет к снижению концентрации красителя в образцах и искажению результатов измерений.

3. **Приготовление стандартов концентрации белка.**

Стандарты концентрации белка необходимы для построения калибровочной кривой, с помощью которой интенсивность флуоресценции экспериментального образца пересчитывается в концентрацию исследуемого белка. Калибровочная кривая учитывает вариабельность результатов при использовании разных флуориметров, вариабельность значений между различными сериями экспериментов при использовании одного и того же флуориметра, а также погрешности дозирования при приготовлении рабочего раствора красителя. По этой причине построение калибровочной кривой рекомендуется делать для каждой новой серии экспериментов, однако Вы можете использовать старую калибровочную кривую, если условия эксперимента остались прежними.

Для построения калибровочной кривой наилучшим вариантом является использование того же самого белка, концентрация которого будет определяться в дальнейшем в экспериментальных образцах. При невозможности использовать тот же самый белок, используйте входящий в набор референсный стандарт концентрации белка — раствор БСА с концентрацией 2 мг/мл.

Диапазон измеряемых концентраций данным набором: на кюветном

флуориметре 10 нг/мл—10 мкг/мл, на планшетном флуориметре 100 нг/мл—10 мкг/мл. В зависимости от предполагаемой концентрации белка в экспериментальных образцах и используемого флуориметра, Вы можете построить калибровочную кривую или для всего рабочего диапазона набора, или для его отдельной части.

Ниже приведена схема приготовления стандартов концентрации БСА для всего диапазона работы набора на планшетном флуориметре (100 нг/мл—10 мкг/мл) и объема образца 200 мкл (для 96-луночного планшета):

- 3.1. С использованием входящего в состав набора *стандарта концентрации белка, БСА 2 мг/мл* приготовьте в отдельных пробирках объемом 1,5 мл стоковые растворы БСА в рабочем растворе красителя ProteOrange с концентрациями 10 мкг/мл и 1 мкг/мл:
  - 10 мкг/мл: 5 мкл стандарта концентрации белка, БСА 2 мг/мл в ТЕ буфере + 995 мкл рабочего раствора красителя ProteOrange
  - 1 мкг/мл: 100 мкл образца БСА 10 мкг/мл + 900 мкл рабочего раствора красителя ProteOrange
- 3.2. В отдельных 1,5 мл пробирках с использованием приготовленных стоковых растворов БСА приготовьте стандарты концентрации БСА согласно таблице:

Используемый стоковый раствор БСА*	**Объем стокового раствора БСА, мкл**	**Объем рабочего раствора красителя ProteOrange, мкл**	**Конечная концентрация БСА, мкг/мл**
	0	250	0
10 мкг/мл	250	0	10
	200	50	8
	100	150	4
	50	200	2

	250	0	1
	200	50	0,8
1 мкг/мл	100	150	0,4
	50	200	0,2
	25	225	0,1

*стоковые растворы, приготовленные в п.3.1 в рабочем растворе красителя ProteOrange

Если предполагаемые концентрации экспериментальных образцов находятся в известном Вам более узком диапазоне, Вы можете приготовить один стоковый раствор БСА и соответствующие ему стандарты концентраций БСА, так чтобы калибровочная кривая покрывала предполагаемый диапазон концентрации исследуемого белка. Например, если концентрация исследуемого белка находится в диапазоне 2-10 мкг/мл, Вам следует приготовить только один стоковый раствор БСА с концентрацией 10 мкг/мл (см. п.3.1), а затем из него стандарты концентраций БСА для измерения на флуориметре с концентрациями 0, 10, 8, 4, 2 мкг/мл (согласно таблице, см. п.3.2).

4. **Приготовление экспериментальных образцов**

В отдельной пробирке разведите экспериментальный образец белка в рабочем растворе красителя ProteOrange. Мы рекомендуем разводить исходный образец белка более чем в 20 раз, так чтобы объем исходного образца в конечном образце для измерения не превышал 5 %. Это обусловлено количеством красителя, который связывается с исследуемым белком, а также максимальным разведением примесей, присутствующих в исходном экспериментальном образце, что нивелирует их влияние на результаты измерений.

Пример #1: для приготовления 1 образца объемом 200 мкл смешайте 5 мкл экспериментального образца белка и 195 мкл рабочего раствора красителя ProteOrange (разведение в 40 раз).

Пример #2 (для случая высокой концентрации примесей в исходном экспериментальном образце белка): приготовьте 2 последовательных разведения экспериментального образца в рабочем растворе красителя ProteOrange:

- Разведение 20×: смешайте 13 мкл экспериментального образца белка и 247 мкл рабочего раствора красителя ProteOrange
- Разведение 100×: смешайте 50 мкл образца с разведением 20× и 200 мкл рабочего раствора красителя ProteOrange

В результате у Вас получится 2 разведения исследуемого белка (20×, 100×). В случае заметного искажения результатов измерения из-за присутствия примесей в высокой концентрации в исходном образце белка, значения интенсивностей флуоресценции для разведений не будут пропорционально ложиться на калибровочную кривую в соответствии с разведением. В таком случае, следует ориентироваться на точку с наибольшим разведением (в данном случае 100×), поскольку данный образец содержит наименьшее количество примесей.

! Следует иметь в виду, что калибровочная кривая должна покрывать концентрации всех разведений экспериментальных образцов, а также что рабочий диапазон набора составляет 10 нг/мл — 10 мкг/мл для кюветного флуориметра и 100 нг/мл — 10 мкг/мл для планшетного флуориметра. В то же время следует избегать использования маленьких объёмов при разбавлении исходного образца, поскольку неточность пипетирования маленьких объёмов может сказаться на результатах измерений.

5. Инкубируйте все пробирки (со стандартами концентраций и экспериментальными образцами) 10 минут при температуре 90–95 °C в темноте.
6. Дайте остыть содержимому пробирок до комнатной температуры (около 15-20 минут), не подвергая воздействию света.
7. Сбросьте образовавшийся конденсат центрифугированием.
8. Внесите в лунки 96-луночного планшета по 200 мкл экспериментальных образцов и стандартов концентрации белка.
9. **Измерение интенсивности флуоресценции.**

Используйте подходящий источник возбуждающего излучения и канал детекции: краситель ProteOrange в комплексе с белком имеет максимум поглощения при длине волны ~485 нм и максимум испускания при длине волны ~590 нм.

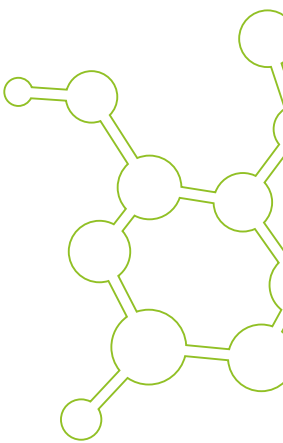
10. Постройте калибровочную кривую, используя данные об уровне флуоресценции стандартов концентрации белка. С использованием полиномиальной аппроксимации найдите уравнение зависимости концентрации белка (мкг/мл) от интенсивности флуоресценции (RFU) и рассчитайте концентрацию белка в исследуемых образцах.

Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса красителя ProteOrange с БСА от концентрации БСА. Концентрации БСА находятся в диапазоне от 100 нг/мл до 10 мкг/мл. Измерение интенсивности флуоресценции с помощью планшетного флуориметра, светофильтры для возбуждения и детекции флуоресценции 485/10 и 575/20 нм соответственно.



Ver. P3PQ3
#5555A

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com