



QuDye Protein Quantification Kit manual

Contents

English: QuDye Protein Quantification Kit manual	3-6
Deutsch: Handbuch für das QuDye Protein-Quantifizierungskit	7-10
Русский: Инструкция к набору QuDye Protein для определения концентрации белка	11-14

QuDye Protein Quantification Kit manual

The kit is used for the quantification of proteins with Fluorometer. QuDye Protein Reagent selectively binds to SDS-protein micelles, so nucleotides, DNA, RNA and other impurities (but not detergents) do not impede the measurements. All reagents are optimized to perform the measurements range of initial protein concentrations is 12.5–5000 µg/mL (the final amount of protein after dilution of the initial sample is 0.25-5 µg in 200 µL of the test sample). The assay is highly sensitive and widely applicable due to low fluctuations of fluorescence intensity during quantification of various proteins. The kit includes all the necessary components. Measurements with the kit do not require any special sample preparation (including pre-heating at 95 °C). All measurements are performed at room temperature and take on average 30 minutes for 5–10 samples.

Kit components

Kit component	Count	
	15102 100 assays	25102 500 assays
15210, QuDye Protein Reagent, 200x, 100 µL	3	—
55210, QuDye Protein Reagent, 200x, 1.5 mL	—	1
S1750, QuDye Protein buffer, 1x, 50 mL	1	3
B3650, Protein standard, 0 ng/µL, TE buffer, 1 mL	1	1
B4650, Protein standard, BSA 200 ng/µL in TE buffer, 1 mL	1	1
B5650, Protein standard, BSA 400 ng/µL in TE buffer, 1 mL	1	1

Store at +4 °C. Warm to RT before use.

Shelf life 12 months.

! All measurements with QuDye Protein Quantification Kit should be performed at room temperature (22–28 °C). Before starting, equilibrate all kit's solutions to room temperature. Avoid warming the samples, as the sample temperature influences the measurement results; particularly do not hold the assay tubes in your hands just before fluorescence measurement with a fluorometer.

Protocol

1. Prepare *QuDye Protein dye working solution* taking into account that 200 µL of dye working solution will be required for each sample and for each of the three standards. In order to do that, dilute *QuDye Protein Reagent concentrate* 200-fold with *QuDye Protein buffer*.

For example, to measure 2 samples and 3 standards, prepare $200\ \mu\text{L} \times 5 = 1000\ \mu\text{L}$ of dye working solution (mix $5\ \mu\text{L}$ of QuDye Protein Reagent concentrate and $995\ \mu\text{L}$ of QuDye Protein buffer).

! It is recommended to use dye working solution within several hours after preparation. In case of postponed measurements protect prepared dye working solution from light.

! Use only plastic containers to prepare dye working solution, as QuDye Protein Reagent can adsorb to glass surfaces, which results in decreasing of the dye concentration in samples and biases in the measurement results.

2. Set up three 0.5 ml tubes (thin-walled and optical-transparent) for the standards and one tube for each sample. Label the tube lids. Do not label the side of the tube as this can interfere with the sample read.
3. Add 190 µL of *QuDye Protein dye working solution* to each of three tubes used for standards and 10 µL of each *Protein standard* to the appropriate tube. Vortex for 2–3 seconds and centrifuge briefly.
4. Add 180–199 µL of *QuDye Protein dye working solution* to each of the tubes used for samples and 20–1 µL of protein sample, respectively (the total volume should be 200 µL). Vortex for 2–3 seconds and centrifuge briefly.

Dilution of the experimental sample is optional and depends on its initial concentration. The initial sample concentration can vary from 12.5 to 5000

$\mu\text{g/mL}$; however, after diluting with QuDye Protein dye working solution the amount of protein should correspond to the measurement range of fluorometer ($0.25\text{-}5\ \mu\text{g}$ of protein in $200\ \mu\text{L}$ of the test sample). Therefore, a sample with the minimal acceptable initial protein concentration ($12.5\ \mu\text{g/mL}$) should be diluted 10-fold to $1.25\ \mu\text{g/mL}$ [put $180\ \mu\text{L}$ of dye working solution and $20\ \mu\text{L}$ of the sample ($12.5\ \mu\text{g/mL}$) in the assay tube, which corresponds to $0.25\ \mu\text{g}$ of protein]. A sample with the maximal acceptable initial protein concentration ($5000\ \mu\text{g/mL}$) should be diluted 200-fold [put $199\ \mu\text{L}$ of dye working solution and $1\ \mu\text{L}$ of the sample ($5000\ \mu\text{g/mL}$) in the assay tube, which corresponds to $5\ \mu\text{g}$ of protein]. However, avoid using too small volumes when diluting the initial sample in order to maintain accuracy and precision of your measurements.

5. Incubate all tubes (containing standards and protein samples) for 15 minutes at room temperature.
6. Perform the fluorescence measurements.

Fluorescence measurement with a fluorometer

The next steps should be carried out according to the instruction of the fluorometer. Depending on the version of the fluorometer the menu items may differ from the specified below.

1. On the Home screen of the fluorometer, choose «Quant – It Protein» as the assay type. Press «Go»
2. With each preparation of the dye working solution, calibrate the fluorometer. Select «Run new calibration» and press «Go».
3. Insert the tube containing *Standard #1 (0 ng/uL, TE buffer)* into the sample chamber, close the lid, then press «Go». When the reading is complete (~3 seconds), remove *Standard #1*.

Insert the tube containing *Standard #2 (BSA 200 ng/uL in TE buffer)* into the sample chamber, close the lid, then press «Go». When the reading is complete, remove *Standard #2*.

Insert the tube containing *Standard #3 (BSA 400 ng/uL in TE buffer)* into the sample chamber, close the lid, then press «Go». When the reading is complete, remove *Standard #3*.

4. Insert the tube containing user sample into the sample chamber, close the lid, then press «Go». On the screen you will see the QF value.

Calculate the concentration of the protein sample by the formula: Concentration of the sample = QF value x 200/sample volume.

Handbuch für das QuDye Protein-Quantifizierungskit

Dieses Kit dient der Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem Fluorometer. QuDye Protein Reagenz bindet selektiv an SDS-Protein-Mizellen, sodass Nukleotide, DNA, RNA und andere Verunreinigungen (ausgenommen Detergenzien) keinen Einfluss auf die Messergebnisse haben. Alle Reagenzien sind für die Messungen mit Fluorometer optimiert, der Messbereich für die Ausgangskonzentrationen der Proteinproben reicht von 12,5 µg/ml bis 5000 µg/ml (die Protein-Endmenge sollte nach Verdünnung der Ausgangsprobe 0,25–5 µg in 200 µl der zu messenden Probe betragen). Die Methode ist hochempfindlich und breit anwendbar aufgrund einer geringen Fluktuation der Fluoreszenzintensität bei der Quantifizierung von verschiedenen Proteinen. Das Kit enthält alle benötigten Komponenten. Messungen mit dem QuDye Protein-Quantifizierungskit erfordern keine besondere Probenvorbereitung einschließlich der Vorwärmung bei 95 °C. Alle Messungen werden bei Raumtemperatur ausgeführt und dauern durchschnittlich 30 Minuten bei 5–10 Proben.

Bestandteile

Komponente	Anzahl	
	15102 100 assays	25102 500 assays
15210, QuDye Protein-Reagenz / QuDye Protein reagent, 200x, 100 µL	3	—
55210, QuDye Protein-Reagenz / QuDye Protein reagent, 200x, 1,5 mL	—	1
S1750, QuDye Protein Puffer, 1x, 50 mL	1	3
B3650, Protein-Standard #1/ Protein standard, 0 ng/µl, TE-Puffer, 1 mL	1	1
B4650, Protein-Standard #2 / Protein standard, BSA 200 ng/µl in TE-Puffer, 1 mL	1	1
B5650, Protein-Standard #3 / Protein standard, BSA 400 ng/µl in TE-Puffer, 1 mL	1	1

Bei +4 °C lagern. Reagenzien vor Gebrauch auf +20 °C temperieren.

Haltbarkeit: 12 Monate.

! Alle Messungen mit QuDye Protein-Quantifizierungskit werden bei Raumtemperatur (22–28 °C) ausgeführt. Bringen Sie vor Arbeitsbeginn alle Komponente des Kits auf Raumtemperatur. Vermeiden Sie die Erwärmung der Proben, denn die Temperatur der Proben beeinflusst Messergebnisse, insbesondere halten Sie die Röhrchen nicht in den Händen unmittelbar vor den Fluoreszenzmessungen mit Fluorometer.

Verfahren

1. Setzen Sie *QuDye Protein Farbstoffarbeitslösung* an, wobei für jede Probe und jeden Standard 200 µl Farbstoffarbeitslösung benötigt werden. Die Farbstoffarbeitslösung erhalten Sie, indem Sie 200x *QuDye Protein Farbstoffkonzentrat* mit *QuDye Protein Puffer* 200-fach verdünnen.

Zur Messung von 2 Proben und 3 Standards stellen Sie beispielsweise 200 µl x 5 = 1000 µl Farbstoffarbeitslösung her (legen Sie 5 µl QuDye Protein Farbstoffkonzentrat und 995 µl QuDye Protein Puffer vor).

! Die angesetzte Farbstoffarbeitslösung ist innerhalb von wenigen Stunden aufzubrauchen. Erfolgt die Messung nicht sofort, lagern Sie die angesetzte Farbstoffarbeitslösung lichtgeschützt.

! Verwenden Sie zur Herstellung der Farbstoffarbeitslösung ausschließlich Kunststoffgefäße. Ein Glasgefäß kann den Farbstoff adsorbieren, was zur Verringerung der Farbstoffkonzentration in den Proben und Beeinflussung der Messergebnisse führen kann.

2. Bereiten Sie 3 dünnwandige, optisch durchlässige 0,5-ml-Röhrchen für die Standards und ein Röhrchen je Probe vor. Beschriften Sie die Röhrchendeckel (nicht jedoch die Röhrchenwand, da dies das korrekte Ablesen der Probe stören kann).
3. Pipettieren Sie in jedes Standardröhrchen 190 µl *QuDye Protein Farbstoffarbeitslösung* und 10 µl des jeweiligen *Protein-Standards*. Vortexen Sie für 2–3 Sekunden und zentrifugieren Sie kurz an.
4. Pipettieren Sie in jedes Probenröhrchen 180–199 µl *QuDye Protein*

Farbstoffarbeitslösung und 20–1 μL Proteinprobe (Das Endvolumen muss 200 μL betragen). Vortexen Sie für 2–3 Sekunden und zentrifugieren Sie kurz an.

Die Verdünnung der Proteinprobe ist optional und hängt von der Ausgangskonzentration ab. Die Ausgangskonzentration der Proteinproben kann im Bereich von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ bis 5000 $\mu\text{g/ml}$ liegen. Die Protein-Endmenge sollte jedoch nach Verdünnung der Ausgangsprobe mit QuDye Protein Farbstoffarbeitslösung innerhalb des Messbereichs vom Fluorometer liegen, d. h. 0,25–5 μg in 200 μL der zu messenden Proteinprobe. Somit muss die Ausgangsprobe mit einer minimal zulässigen Protein-Ausgangskonzentration von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ 10-fach auf 1,25 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt werden (mischen Sie dafür in einem Probenröhrchen 180 μL der Farbstoffarbeitslösung und 20 μL der Ausgangsprobe mit 12,5 $\mu\text{g/ml}$, was 0,25 μg Protein entspricht); die Ausgangsprobe mit einer maximal zulässigen Protein-Ausgangskonzentration von 5000 $\mu\text{g/ml}$ muss 200-fach verdünnt werden (mischen Sie dafür in einem Probenröhrchen 199 μL der Farbstoffarbeitslösung mit 1 μL der Ausgangsprobe mit 5000 $\mu\text{g/ml}$, das entspricht 5 μg Protein). Dabei sollten kleine Pipettivolumina zur Verdünnung der Ausgangsprobe vermieden werden, um die Genauigkeit und Präzision der Messungen zu gewährleisten.

5. Inkubieren Sie alle Röhrchen (mit Standards und Proteinproben) für 15 Minuten bei Raumtemperatur.
6. Führen Sie Fluoreszenzmessungen durch.

Fluoreszenzmessung mit Fluorometer

Folgende Schritte sollen gemäß der Anleitung für das Fluorometer durchgeführt werden. Je nach Ausführung des Fluorometers können sich Menüpunkte von den unten genannten unterscheiden.

1. Nach dem Einschalten des Geräts wählen Sie auf dem Display des Fluorometers den Menüpunkt «Quant – It Protein». Drücken Sie «Go».
2. Jedes Mal nach Herstellung einer frischen Farbstoffarbeitslösung muss das Fluorometer neu kalibriert werden. Wählen Sie «Run new calibration» und drücken Sie «Go».
3. Setzen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #1* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie «Go». Nach Ablesen der Messwerte (etwa 3 Sekunden) entfernen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #1*.

Setzen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #2* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie «Go». Nach Ablesen der Messwerte entfernen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #2*.

Setzen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #3* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie «Go». Nach Ablesen der Messwerte entfernen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #3*.

4. Nach Abschluss der Kalibrierung setzen Sie das Röhrchen mit der Proteinprobe in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie «Go». Auf dem Display wird der QF Wert angezeigt.

Sie können die Protein-Konzentration anhand der folgenden Formel berechnen:

Protein-Probenkonzentration = QF Wert x 200/Probenvolumen oder geben Sie das Probenvolumen ins Fluorometer ein.

Инструкция к набору QuDye Protein для определения концентрации белка

Набор предназначен для определения концентрации белка на флуориметре. Краситель QuDye Protein селективно связывается с мицеллами SDS-белок, в результате чего нуклеотиды, ДНК, РНК и другие примеси (но не детергенты), присутствующие в пробе, не оказывают влияния на результаты измерений. Набор QuDye Protein оптимизирован для проведения измерений на флуориметре в диапазоне исходной концентрации белка 12,5–5000 мкг/мл (количество белка после разбавления исходного образца составляет 0,25–5 мкг в 200 мкл образца для измерения). Метод является высокочувствительным и универсальным, что обусловлено малыми колебаниями интенсивности флуоресценции при измерении концентрации различных белков. В состав набора включены все необходимые реагенты. Измерения с помощью набора QuDye Protein не требуют специальной пробоподготовки, в том числе предварительного прогрева при 95 °С. Все измерения проводятся при комнатной температуре и займут, в среднем, 30 минут для 5–10 исследуемых образцов.

Состав набора

Компонент набора	Количество	
	15102 100 assays	25102 500 assays
15210, Краситель QuDye Protein / QuDye Protein reagent, 200x, 100 µL	3	—
55210, Краситель QuDye Protein / QuDye Protein reagent, 200x, 1.5 mL	—	1
S1750, Буфер QuDye Protein / QuDye Protein buffer, 1x, 50 mL	1	3
B3650, Стандарт #1 / Protein standard, 0 ng/µL, ТЕ буфер, 1 mL	1	1
B4650, Стандарт #2 / Protein standard, БСА 200 ng/µL в ТЕ буфере, 1 mL	1	1
B5650, Стандарт #3 / Protein standard, БСА 400 ng/µL в ТЕ буфере, 1 mL	1	1

Хранить при температуре +4 °С. Прогреть до +20 °С перед использованием.

Срок хранения 12 месяцев.

! Все измерения с использованием набора QuDye Protein должны проводиться при комнатной температуре (22–28 °C). Перед началом работы прогрейте все используемые растворы до комнатной температуры. Избегайте нагрева образцов, так как результаты измерений зависят от температуры пробы; в частности, не держите в руках пробирки с образцами непосредственно перед измерениями на флуориметре.

Протокол

1. Приготовьте рабочий раствор красителя QuDye Protein из расчета, что на каждый образец и на каждый из трёх стандартов потребуется около 200 мкл. Для этого разведите 200x концентрат красителя QuDye Protein в 200 раз буфером QuDye Protein.

Например, для измерения 2 образцов и 3 стандартов необходимо приготовить 200 мкл \times 5 = 1000 мкл рабочего раствора красителя (смешайте 5 мкл концентрата красителя QuDye Protein и 995 мкл буфера QuDye Protein).

! 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. Стеклоянная посуда может сорбировать на своих стенках краситель, что приведет к снижению концентрации красителя в образцах и искажению результатов измерений.

2. Подготовьте три тонкостенные, оптически прозрачные 0,5 мл пластиковые пробирки для стандартов и по одной пробирке для каждого измеряемого образца. Подпишите крышки пробирок (не делайте пометок на стенках пробирок, так как это может привести к некорректному определению интенсивности флуоресценции).
3. Внесите в отдельные пробирки по 190 мкл рабочего раствора красителя QuDye Protein и по 10 мкл каждого из трех стандартов, поставляемых в наборе.

Перемешайте на вортексе 2–3 секунды, сбросьте капли.

4. Внесите в отдельные пробирки по 180–199 мкл *рабочего раствора красителя QuDye Protein* и по 20–1 мкл образца (конечный объём в каждой пробирке должен составить 200 мкл). Перемешайте на вортексе 2–3 секунды, сбросьте капли.

Разведение исследуемого образца опционально и зависит от его исходной концентрации. Исходная концентрация образца может находиться в диапазоне 12,5–5000 мкг/мл; однако после разведения образца в рабочем растворе красителя QuDye Protein количество белка должно соответствовать диапазону измерения флуориметра: 0,25–5 мкг белка в 200 мкл образца для измерения. Таким образом, образец с минимально допустимой исходной концентрацией белка 12,5 мкг/мл следует разбавить в 10 раз до 1,25 мкг/мл (в пробирку для измерения внесите 180 мкл рабочего раствора красителя и 20 мкл образца 12,5 мкг/мл, что соответствует 0,25 мкг белка), а образец с максимальной допустимой исходной концентрацией белка 5000 мкг/мл следует разбавить в 200 раз (в пробирку для измерения внесите 199 мкл рабочего раствора красителя и 1 мкл образца 5000 мкг/мл, что соответствует 5 мкг). 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 (содержащие стандарты и исследуемые образцы) 15 минут при комнатной температуре.
6. Проведите измерение интенсивности флуоресценции.

Измерение интенсивности флуоресценции на флуориметре

Следующие пункты следует выполнять согласно инструкции к флуориметру. В зависимости от версии флуориметра пункты меню могут отличаться от приведенных ниже.

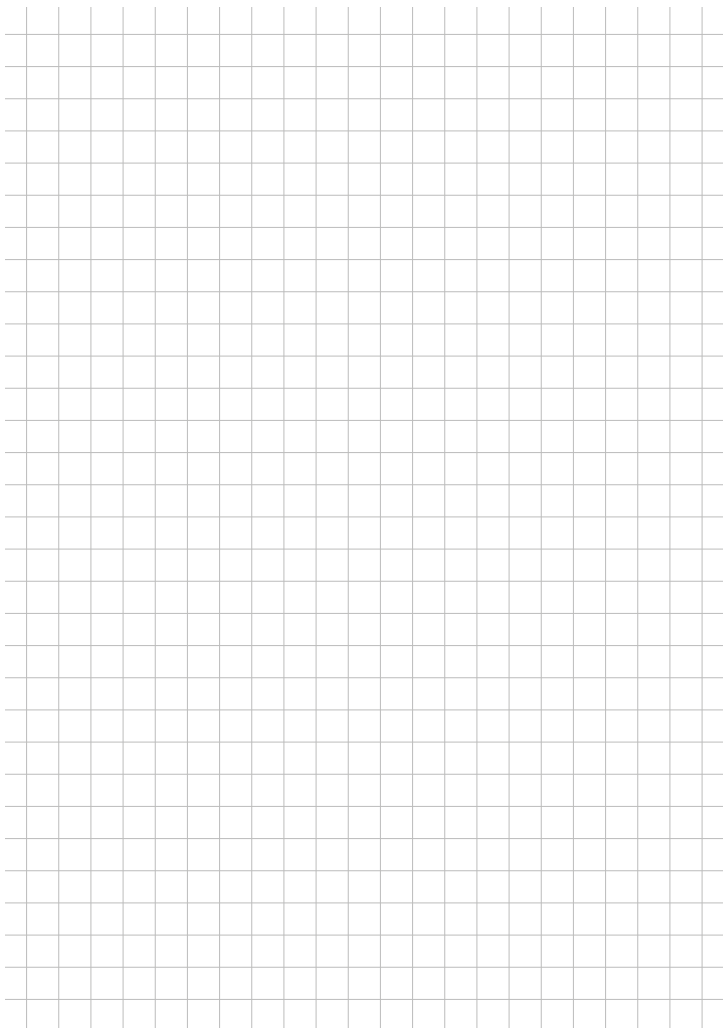
1. После включения прибора выберите пункт «Quant – It Protein». Нажмите «Go».
2. При каждом новом приготовлении рабочего раствора красителя следует проводить калибровку флуориметра. Выберите пункт «Run new calibration» и нажмите «Go».
3. Поместите в гнездо пробирку, содержащую *стандарт #1*, закройте крышку, нажмите «Go». Когда прибор проведет измерение (около 3 сек), удалите пробирку со *стандартом #1*.

Поместите в гнездо пробирку, содержащую *стандарт #2*, закройте крышку, нажмите «Go». Когда прибор проведет измерение, удалите пробирку со *стандартом #2*.

Поместите в гнездо пробирку, содержащую *стандарт #3*, закройте крышку, нажмите «Go». Когда прибор проведет измерение, удалите пробирку со *стандартом #3*.

4. После успешного завершения калибровки поместите в гнездо пробирку с экспериментальным образцом, закройте крышку, нажмите «Go». На экране прибор покажет значение QF Value.

Рассчитайте концентрацию белка по формуле: Концентрация белка в образце = QF Value x 200/объем образца; или введите объем образца в прибор.







Lumiprobe Corporation

(US and Worldwide)

9:00AM - 9:00PM EST

201 International Circle, Suite 135

Hunt Valley, Maryland 21030

USA

Phone: +1 888 973 63 53

Lumiprobe GmbH

(Germany and Europe)

8:00AM - 5:00PM CE(S)T

Feodor-Lynen-Strasse 23

30625 Hannover

Germany

Phone: +49 511 16596811

Lumiprobe RUS Ltd

(Russia and CIS)

8:00 - 19:00 GMT+3 (Moscow)

Kotsyubinskogo 4, bld. 3

121351 Moscow

Russian Federation

Phone: +7 800 775 3271



ISO 9001:2015

Issued by TÜV NORD CERT GmbH

www.lumiprobe.com