



Инструкция к набору QuDye® Protein
для определения концентрации белка

Contents

Русский: Инструкция к набору QuDye® Protein для определения концентрации белка	3-6
---	-----

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® для определения количества белка / QuDye® Protein Quantification Reagent, 200×, 100 µL	3	—
55210, Краситель QuDye® для определения количества белка / QuDye® Protein Quantification Reagent, 200×, 1.5 mL	—	1
S1750, Буфер QuDye Protein / QuDye Protein buffer, 1x, 50 mL	1	3
B3650, Стандарт #1 / Protein standard, 0 ng/µL, TE 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 °С). 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 пипетки 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 x 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. Стеклянная 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 объем 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 максимально 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 объемов при разбавлении исходного образца, поскольку неточность пипетирования маленьких объемов 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.









22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

