

# GEBRAUCHSANLEITUNG

---

## SingleQuant Assay Kit

Kit für die Proteinkonzentrationsbestimmung  
(Kat.-Nr. 39226)



**SERVA Electrophoresis GmbH • Carl-Benz-Str. 7 • D-69115 Heidelberg**  
Phone +49-6221-138400, Fax +49-6221-1384010  
e-mail: [info@serva.de](mailto:info@serva.de) • <http://www.serva.de>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. SingleQuant-Assay-Kit</b>	<b>2</b>
1.1. Allgemeine Hinweise	2
1.2. Kit-Komponenten	2
1.3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	3
1.3.1. Allgemein	3
1.3.2. Durchführung der Messung unter Verwendung von Halbmikro- oder Mikroküvetten	3
1.3.3. Durchführung der Messung unter Verwendung von Mikrotiter-Platten	3
1.4. Lagerbedingungen	3
<b>2. SingleQuant-Assay Protokoll</b>	<b>4</b>
2.1. Überblick über das Verfahren	4
2.2. Durchführung der SingleQuant-Proteinbestimmung	5
2.2.1. Ansetzen der Lösungen	5
2.2.2. Durchführung: Ansatz für Verwendung von Mikroküvetten oder Mikrotiter-Platten	6
2.2.3. Durchführung: Ansatz für die Verwendung von Halbmikro-küvetten	7
2.2.4. Berechnung der Proteinkonzentrationen	8
<b>3. Literatur</b>	<b>9</b>

## 1. SingleQuant-Assay-Kit

### 1.1. Allgemeine Hinweise

Der SingleQuant-Assay beruht auf der Ausfällung von Proteinen als unlösliche Farbstoffkomplexe mit saurer, ethanolischer Amidoschwarz-10B-Lösung (Popov et al. 1975). Nach der Fällung werden die Protein-Farbstoffkomplexe sedimentiert. Das Pellet wird gewaschen und in NaOH wieder in Lösung gebracht. Die dabei freigesetzte Farbstoffmenge wird spektralphotometrisch bei 624 nm bestimmt und ist der Proteinausgangsmenge direkt proportional.

#### Vorteile der Methode:

- **Genauere und reproduzierbare Messergebnisse**
- **Schnelle Durchführung (max. 45 Minuten)**
- **Keine Störung der Proteinbestimmung durch Detergenzien (SDS, Nonident P40, CHAPS) oder reduzierende Reagenzien wie DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol** im Gegensatz zu Verfahren nach Lowry, Bradford oder mit Bicinchoninic acid (BCA™). Der SingleQuant-Assay ist ein sog. „endpoint assay“ (die Absorption der Probe bleibt während der Zeit unverändert), und ist mindestens 2 Stunden stabil.
- Der SingleQuant-Assay ist für einzelne Proteinbestimmungen optimal geeignet. Für hohen Probendurchsatz wird der ProtaQuant Assay Kit (Art. Nr. 39225) empfohlen.

**Hinweis:** Da Trägerampholyte ebenfalls den Farbstoff binden und somit höhere Proteinkonzentrationen vortäuschen, muss die **Proteinbestimmung bei Proben für die 2D-Gelelektrophorese vor dem Ampholytzusatz erfolgen.**

### 1.2. Kit-Komponenten

<b>Reference standard (BSA)</b> 39226.01 39226.02	1 x 6 mg 3 x 6 mg
<b>SingleQuant Dye</b> 39226.01 39226.02	1 x Vial 3 x Vials
<b>Wash solution</b> 39226.01 39226.02	1 x 400 ml 3 x 400 ml
<b>Elution solution</b> 39226.01 39226.02	1 x 120 ml 1 x 360 ml

## 1.3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

### 1.3.1. Allgemein

- Tischzentrifuge (geeignet zum Zentrifugieren von 1,5 ml Reaktionsgefäße bei 12 000xg)
- Magnetrührer
- Vortex-Mixer

### 1.3.2. Durchführung der Messung unter Verwendung von Halbmikro- oder Mikroküvetten

- Spektralphotometer geeignet für die Messung bei 624 nm und den Einsatz von Halbmikro- bzw. Mikroküvetten
- Halbmikroküvetten (600 µl Assay-Volumen)
- Mikroküvetten (300 µl Assay-Volumen)

### 1.3.3. Durchführung der Messung unter Verwendung von Mikrotiter-Platten

- ELISA-Reader mit geeignetem Filter (z.B. 620 nm)
- Mikrotiter-Platten, geeignet für die Anwendung im ELISA-Reader

## 1.4. Lagerbedingungen

Im ungeöffneten Zustand ist die empfohlene Lagertemperatur 4 °C.

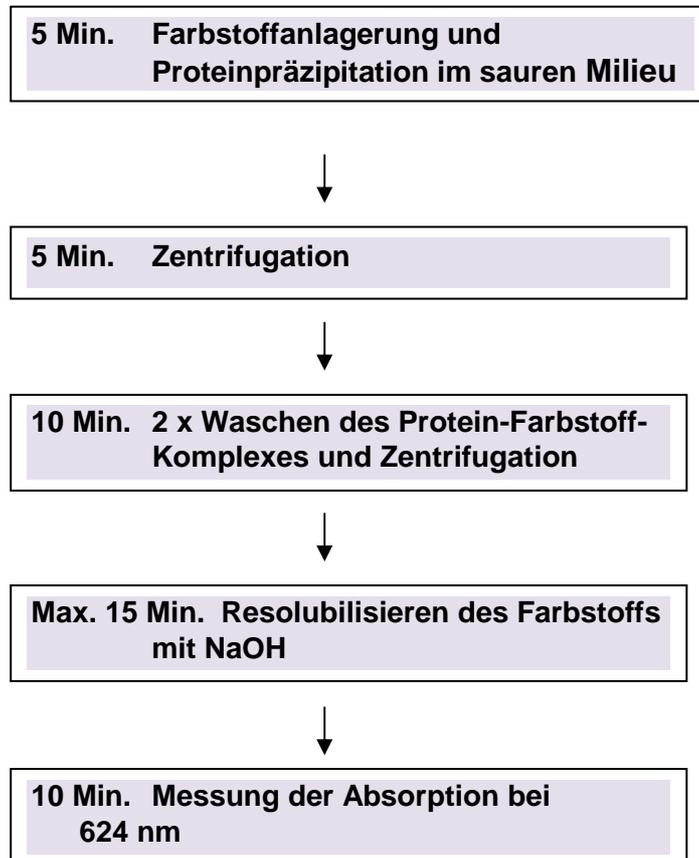
Bei geöffneten bzw. rekonstituierten Einzelkomponenten sind die empfohlenen Lagerbedingungen wie folgt:

<b>Kit-Komponente</b>	<b>Lagerbedingung</b>
Reference standard (BSA)	Aliquotiert; -20 °C
Wash solution	RT
Elution solution	RT
SingleQuant-Stammlösung	4 °C

Die Kit-Komponenten sind bei den empfohlenen Lagertemperaturen mindestens verwendbar bis: siehe Etikett.

## 2. SingleQuant-Assay Protokoll

### 2.1. Überblick über das Verfahren



## 2.2. Durchführung der SingleQuant-Proteinbestimmung

### 2.2.1. Ansetzen der Lösungen

**SingleQuant-Stammlösung** Inhalt des Gefäßes mit SingleQuant Dye in 2,5 ml Waschlösung durch Rühren über Nacht vollständig lösen.

**SingleQuant-Assay-Lösung** SingleQuant-Stammlösung 1:50 mit Waschlösung verdünnen, mischen und filtrieren. **Frisch ansetzen.**

**Wash solution** gebrauchsfertig

**Elution solution** gebrauchsfertig

**Reference standard-Stammlösung** Inhalt des Gefäßes mit 6 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen. (Konzentration: 1 mg/ml BSA, Aliquots bei -20°C la gern).

**Reference standard-Arbeitslösung** Reference standard-Stammlösung 1:10 verdünnen (z.B. 70 µl ad 700 µl mit dest. H<sub>2</sub>O).

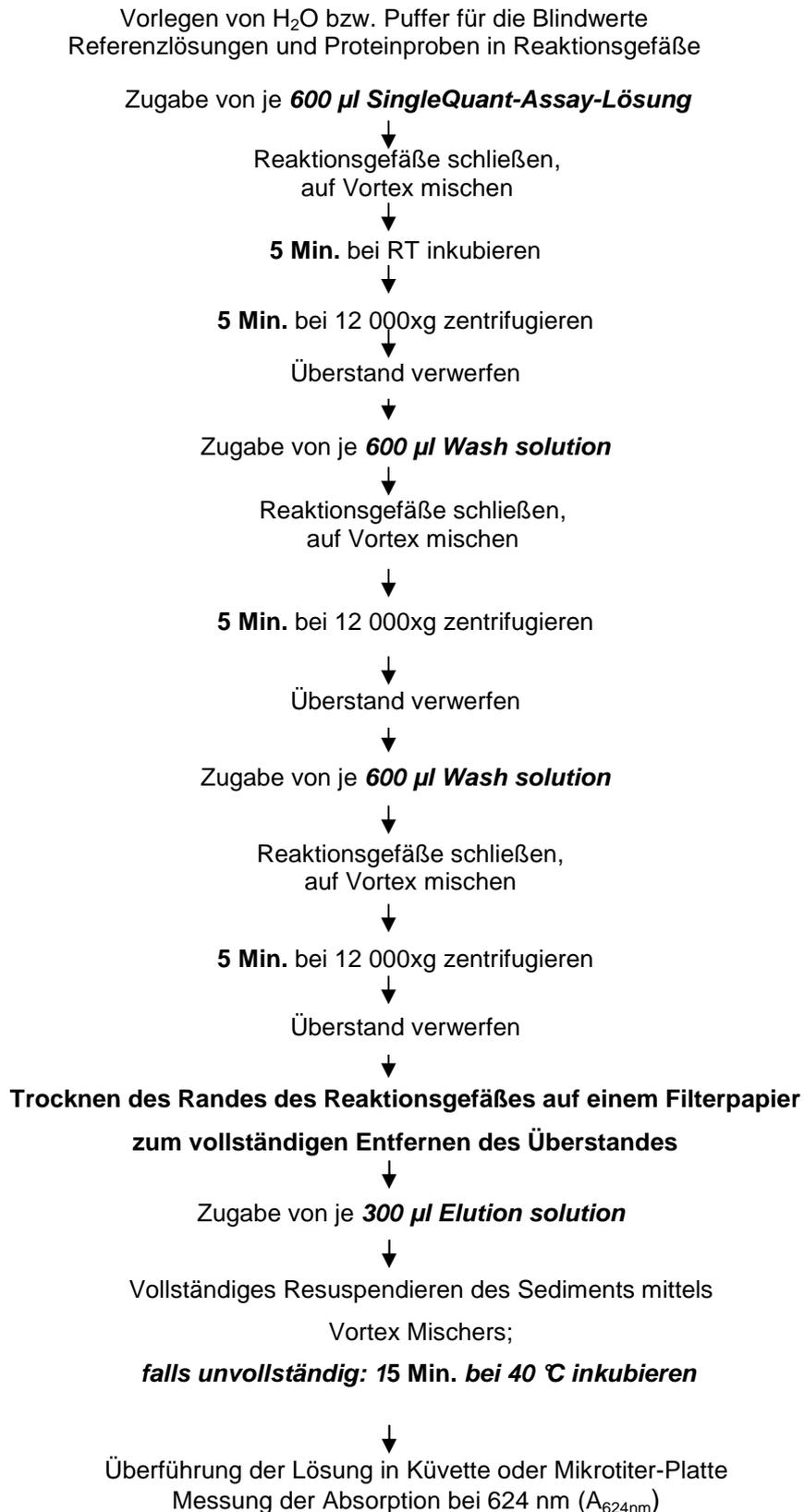
**Blindwert (Blank)** Beim Blindwert wird entweder dest. H<sub>2</sub>O oder der Puffer in dem sich die Proteinproben befinden anstelle des BSA bzw. der Proteinprobe eingesetzt. Ansonsten werden die Blindwertansätze entsprechend den anderen Ansätzen behandelt.

**Referenzlösungen** Die Referenzlösungen sind nach folgendem Schema anzusetzen:

Nr.	BSA-Menge	Ansatz	
R1	2 µg	20 µl	Reference standard-Arbeitslsg. (Konz. 0,1 mg/ml)
		600 µl	SingleQuant-Assay-Lösung
R2	4 µg	40 µl	Reference standard-Arbeitslsg. (Konz. 0,1 mg/ml)
		600 µl	SingleQuant-Assay-Lösung
R3	6 µg	60 µl	Reference standard-Arbeitslsg. (Konz. 0,1 mg/ml)
		600 µl	SingleQuant-Assay-Lösung
R4	8 µg	80 µl	Reference standard-Arbeitslsg. (Konz. 0,1 mg/ml)
		600 µl	SingleQuant-Assay-Lösung

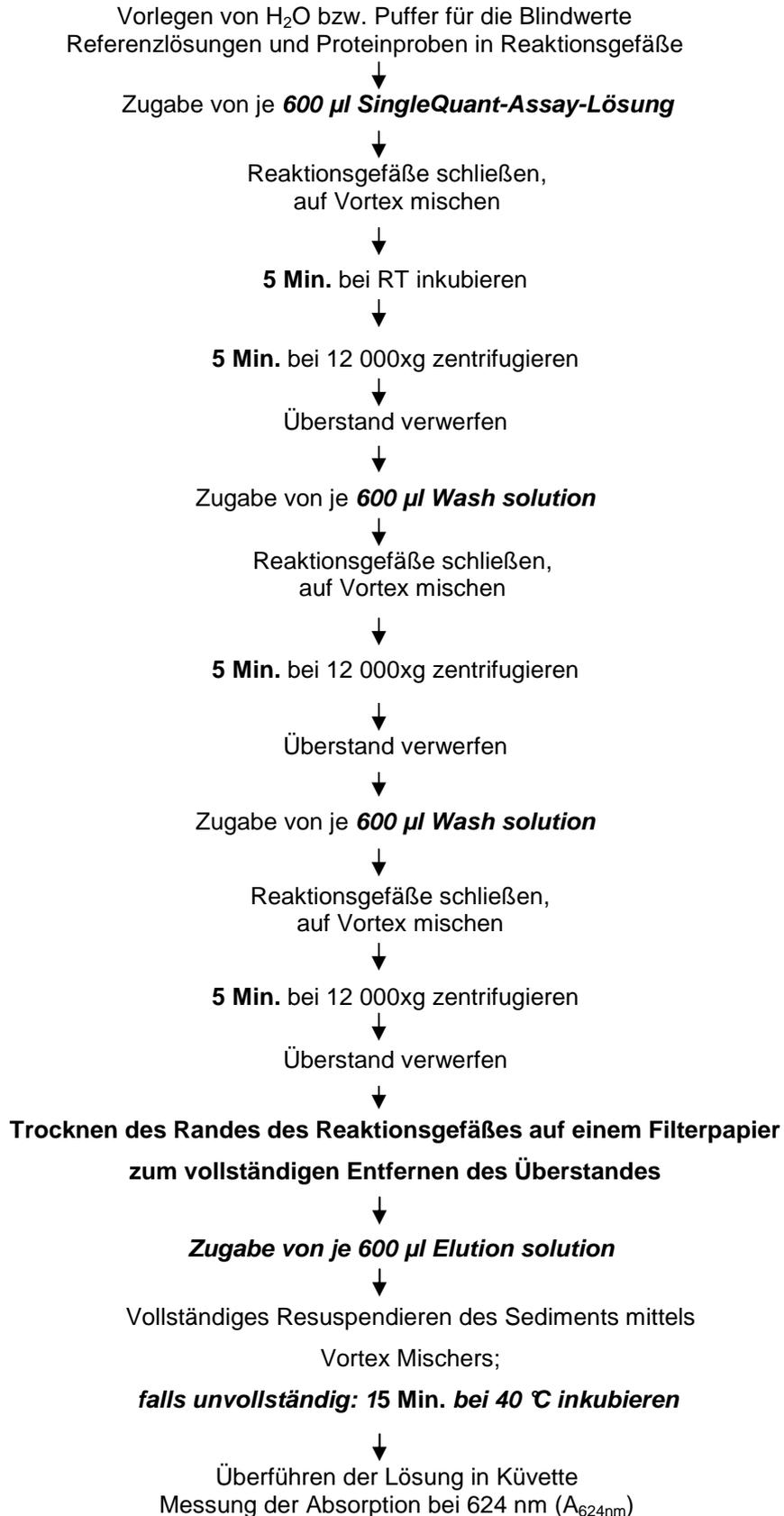
## 2.2.2. Durchführung : Ansatz für Verwendung von Mikroküvetten oder Mikrotiter-Platten zur Messung

Der Assay wird in einer 3-fach Bestimmung durchgeführt. Nach allen Zentrifugationsschritten sollte das Sediment sofort weiterverarbeitet werden, da das Sediment sonst instabil wird und Verluste auftreten können.



### 2.2.3. Durchführung : Ansatz für Verwendung von Halbmikroküvetten zur Messung

Der Assay wird in einer 3-fach Bestimmung durchgeführt. Nach allen Zentrifugationsschritten sollte das Sediment sofort weiterverarbeitet werden, da das Sediment sonst instabil wird und Verluste auftreten können.



## 2.2.4. Berechnung der Proteinkonzentration

Erstellen Sie eine Tabelle mit den im Test erhaltenen Absorptionswerten. Aus den erhaltenen Werten für die BSA-Referenzwerte erstellen Sie eine Kalibriergerade, mit der Sie die Proteinkonzentrationen der unbekanntenen Proben bestimmen können.

**Tabelle 1** zeigt beispielhaft Messwerte für die Erstellung der BSA-Kalibriergeraden.

**Graf 1** zeigt die daraus resultierende BSA-Kalibriergerade.

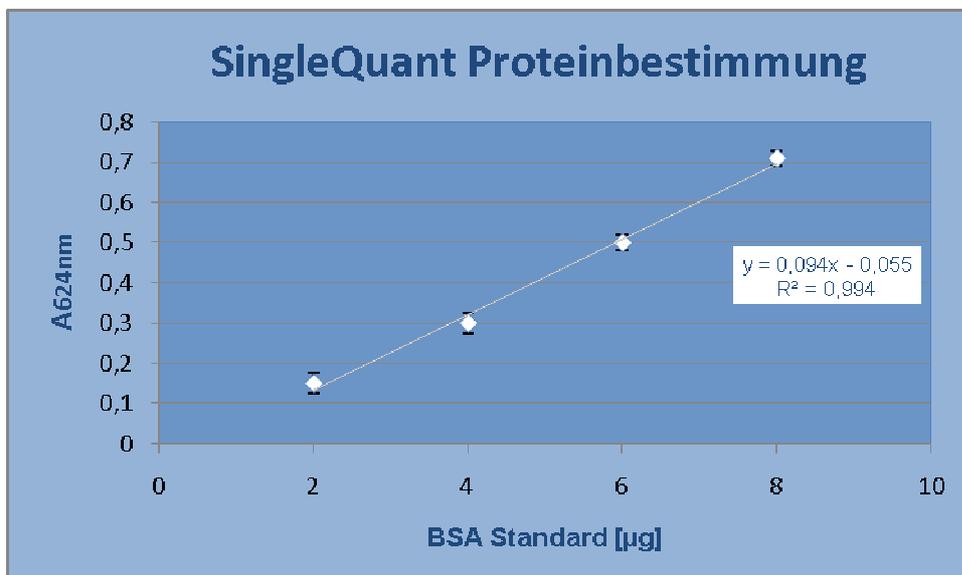
Messwerte $A_{624nm}$	BSA Menge [ $\mu g$ ]
0,17	2
0,12	2
0,15	2
0,31	4
0,32	4
0,27	4
0,52	6
0,48	6
0,50	6
0,69	8
0,71	8
0,73	8

### Hinweis:

Beachten Sie bitte, dass diese **Werte nicht als Ersatz für die Erstellung einer Kalibriergeraden dienen können**, da die **Absorptionswerte der BSA Referenzlösungen** in jeder Testreihe von den hier aufgeführten Werten **abweichen werden**.

**Tabelle 1:** Beispieltabelle für Messwerte der BSA-

Referenzlösungen



**Graf 1:** BSA-Kalibriergerade aus Messwerten von Tabelle 1

Die einzelnen Punkte stellen Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen inklusive Standardabweichung dar. Die Standardgerade wurde mittels linearer Regressionsanalyse mit der Gleichung  $y=0,094x-0,055$  berechnet. Der Regressionskoeffizient beträgt  $R^2=0,994$ .

Die Berechnung erfolgt über die lineare Regression der Referenzlösungen und anschließende Umrechnung der Absorptionswerte der Untersuchungslösungen in die Proteinkonzentration über die Regressionsgleichung.

### 3. Literatur

- **Schaffner W., Weissmann C.**, A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution, *Anal. Biochem.* 1973; **65**: 502-514.
- **Popov N., Schmitt M., Schulzeck S., Matthies H.**, Reliable micro method for determination of the protein content in tissue homogenates, *Acta Biol. Med. Ger.* 1975; **34 (9)**: 1441-1446.