



Application Notes

NanoOrange® Quantificação de Proteína com os Multidetectors Anthos Zenyth 1100/3100

1. Introdução

A quantificação de proteína tem sido realizada tradicionalmente através de técnicas espectrofotométricas tais como o método BCA, ensaio Bradford, ensaio Lowry ou absorção em 280nm. A moderna tecnologia descoberta para detecção de proteína é Molecular Probe NanoOrange® Protein Quantification Kit. O reagente NanoOrange® possibilita a quantificação fluorométrica de proteínas combinada com leitoras de fluorescência. Para realizar um ensaio de proteína, a amostra de proteína é simplesmente adicionada no reagente diluente NanoOrange® e a mistura é aquecida a 95°C por 10 minutos. A fluorescência pode ser medida antes que a solução atinja a temperatura ambiente. O reagente NanoOrange® é virtualmente não fluorescente em solução aquosa, mas em interação com a proteína se torna drasticamente fluorescente. Quando a proteína reage com o reagente fornecido, NanoOrange, se observa um pico de excitação bem definido em 470nm e o de emissão em 579nm.

Este trabalho demonstra que o NanoOrange® para quantificação de proteína usado juntamente com os leitores multidetectores anthos Zenyth 1100/3100 proporcionam resultados com alta sensibilidade, com limites de detecção abaixo de 100ng/ml. O limite de detecção de 100ng/ml pode ser alcançado com um mínimo volume de ensaio de 200µl a 80µl (placas de 384 cavidades). A detecção de 100ng/ml é tipicamente realizada com um volume de 80µl significando uma medida de 8ng de proteína absoluta.

2. Protocolo Experimental

Materiais Requeridos

- Zenyth 1100 e/ou Zenyth 3100 multidetectores (Anthos)
- NanoOrange® protein quantification kit (Molecular Probe, Inc. cat. N-6666)
- Microplacas de 96 e 384 cavidades (anthos)

NOTA: Para determinação de proteína usando NanoOrange um filtro de emissão adicional de 595 é requerido (não é padrão de fornecimento na Zenyth 1100). O filtro de emissão 595nm é padrão de fornecimento na Zenyth 3100

Preparação dos Reagentes

Prepare o diluente de quantificação de proteína 1X: Dilua o diluente concentrado NanoOrange® de quantificação de proteína 10 vezes em água destilada.

Prepare a solução de trabalho NanoOrange® 1X: Dilua o reagente NanoOrange® de quantificação de proteína 500 vezes com o diluente de quantificação de proteína 1X. Proteja a solução de trabalho NanoOrange® 1X da luz para evitar a foto degradação do NanoOrange®. Para resultados melhores, a solução de trabalho deve ser usada poucas horas depois de seu preparo.

Curva Padrão de Proteína

Desde variações entre diferentes fluorímetros até variações de procedimentos diários podem influenciar a performance do ensaio, por isso é extremamente recomendado uma curva de calibração para proteínas. Idealmente, o tipo de proteína utilizada na curva padrão deve ser do mesmo tipo da usada no experimento; entretanto, como em outros ensaios de proteína, BSA (bovine serum albumin) serve como conveniente padrão de referencia. O kit NanoOrange® inclui amostra de 2mg/ml de BSA que pode ser usada para preparar a curva padrão. A curva padrão pode ser preparada para cobrir toda faixa do ensaio, 0-10µg/ml, ou cobrir apenas uma faixa selecionada. Vamos descrever como gerar uma curva de calibração de 10µg/ml a 100ng/ml com os seguintes pontos de calibração: 10, 6, 3, 1, 0.6, 0.3, e 0.1ng de BSA por mL. Faixa de padrões adicionais de 0.001 a 0.6 µg/mL pode ser preparada para cobrir concentrações baixas..

Prepare uma solução de 10µg/mL de BSA diluindo o padrão BSA de 2mg/ml 1:200 na solução de trabalho NanoOrange® 1X. Dilua a solução de 10µg/mL de BSA para gerar

pontos de calibração de 0, 1, 3, 6, e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como descrito na tabela 1. Se desejar, prepare padrões de 0.1, 0.3 e 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ como descrito na tabela 1 diluindo a solução de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA. Para uma curva de calibração mais precisa medidas com replicatas múltiplas podem ser realizadas preparando-se grandes volumes de padrões como descrito na tabela 2 (suficiente para 10 medidas por ponto de calibração)

Tabela 1. Protocolo de preparação de curva de calibração usando BSA		
Volume (μl) de solução de BSA	Volume da solução de trabalho NanoOrange® 1X	Concentração final de BSA
0 μl	250 μl	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
250 μl da sol. de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 μl	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
150 μl da sol. de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 μl	6 $\mu\text{g}/\text{mL}$
75 μl da sol. de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	175 μl	3 $\mu\text{g}/\text{mL}$
25 μl da sol. de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	225 μl	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
150 μl da sol. de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 μl	0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$
75 μl da sol. de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	175 μl	0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$
25 μl da sol. de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	225 μl	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Tabela 2. Protocolo de preparação de curva de calibração usando BSA para 10 replicatas		
Volume (μl) de solução de BSA	Volume da solução de trabalho NanoOrange® 1X	Concentração final de BSA
0mL	2.5mL	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
2.5mL da sol. de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0mL	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1.5mL da sol. de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.0mL	6 $\mu\text{g}/\text{mL}$
0.75mL da sol. de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.75mL	3 $\mu\text{g}/\text{mL}$
0.25mL da sol. de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2.25mL	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1.5mL da sol. de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1mL	0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$
0.75mL da sol. de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.75mL	0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$
0.25mL da sol. de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2.25mL	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

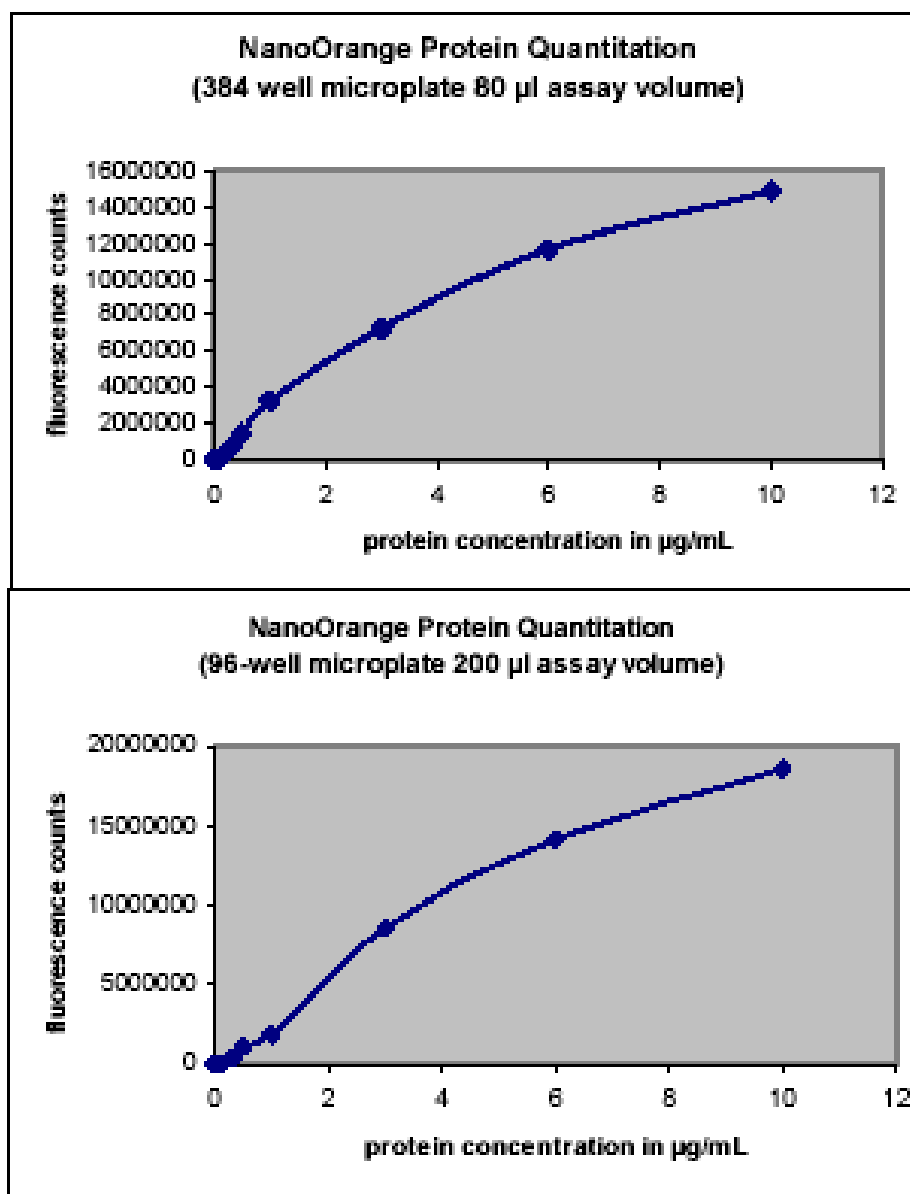
Incubar as amostras a 90°C por 10 minutos, protegida da luz e resfriar a temperatura ambiente por 20 minutos (protegida da luz)

Medir a fluorescência transferindo 200 μl ou 80 μl de amostra em microplacas de 384 ou 96 cavidades. O leitor de fluorescência deve ser equipado com filtros ou ajustes que permitam excitação em 485nm e capturar a emissão em 590nm. Para evitar o efeito do

foto degradação, mantenha o tempo de leitura fluorescente o mais curto possível e constante para todas as amostras.

A curva padrão é gerada subtraindo o valor de fluorescência do reagente branco de cada amostra. Estes valores corrigidos podem ser usados para gerar a curva padrão de fluorescência x concentração de proteína (ver figura 1.).

Figura 1. Curva padrão e esquema de pipetagem para placas de 384 cavidade



Parâmetros de leitura

Após a incubação, medir a fluorescência usando Anthos Zenyth 1100/3100 Multimode Detector e Multimode Detection Software com o apropriado método de detecção, filtro de excitação (485nm), filtro de emissão (590 nm), e tempo de integração de 1 segundo. A Zenyth 1100/3100 também oferece a capacidade de detectar fluorescência em vários ciclos e detecção repetidos, permitindo medidas de cinética fluorescente em aplicações especiais.

Análise da Amostra

Amostras desconhecidas de proteínas são diluídas na solução de trabalho NanoOrange® em um volume final de 250 µL. O volume da amostra não deve ser maior que 4% do volume total. Se um volume maior for usado, é recomendado realizar uma curva padrão usando volume similar. (Ex. Tabela 1 pode ser multiplicada por 10 e usar um volume final de 2,5mL). Pode se escolher o uso de dois ou três fatores de diluição na amostra. Fatores de diluição altos podem diluir contaminantes em níveis aceitáveis, entretanto, volumes de amostras extremamente pequenos devem ser evitados em função da dificuldade de pipetagem.

Amostras devem ser incubadas a 90°C a 96°C por 10 minutos (protegidos da luz) e resfriadas a temperatura ambiente por 20 minutos (protegidas da luz)

Transferir 200µL ou 80µL de amostra para uma microplaca de 96 ou 384 cavidades respectivamente. Determine a concentração de proteína: Subtraia do valor de fluorescência da amostra o valor do reagente branco e use a curva padrão gerada para determinar a concentração da mostra.

Resultados e Discussão

O uso da Zenyth 1100/3100 com o reagente NanoOrange, permite detectar traços de proteína em quantidades menores que 8 ng em um volume de ensaio de 80µL. Comparando com outros detectores de fluorescência que alcançam uma detecção de 100 ng/ml somente com volume de amostra de 20 a 2000µl o qual determinando uma quantidade de proteína absoluta de 20 a 200ng respectivamente. A Zenyth 1100/3100 é capaz de aumentar em duas vezes a sensibilidade de detecção quando comparado com outros dispositivos de fluorescência com um volume bem menor de amostra. Na tabela 3 é demonstrado a habilidade da Zenyth 1100/3100 em medir 384 cavidades com um volume mínimo de amostra de 80µL e detectar 2ng de proteína absoluta em um único experimento com um background acima de 10,7%. Os valores de CV das replicatas dos padrões da curva de calibração (para placas de 96 e 384 cavidades) ficam em torno e abaixo de 5%.

Tabela 3. CV calculados utilizando 3 replicatas

	10µg/mL	6µg/mL	3µg/mL	1µg/mL	0.5µg/mL	0.3µg/mL	0.1µg/mL
Microplaca de 384 cavidades	4%	4%	2%	3%	3%	5%	1%
Microplaca de 96 cavidades	3%	3%	4%	5%	1%	2%	3%

Cuidados e Precauções

Não existem dados disponíveis sobre a toxicidade e mutagenicidade do reagente NanoOrange®. A solução estoque DMSO deve ser manuseada com particular cuidado, pois o DMSO é conhecido como facilitador da entrada de moléculas orgânicas nos tecidos. Soluções de reagente NanoOrange® devem ser tratadas com carvão ativado antes de serem descartadas. O carvão ativado deve ser incinerado para eliminar substâncias perigosas. O reagente NanoOrange® é patente da Molecular Probe, Inc., e não está disponível para outro fim comercial sem prévia autorização da Molecular Probe Inc.

Referências

1. Anal Biochem 150, 76 (1985)
2. Anal Biochem 72, 248 (1976)
3. J Biol Chem 193, 265 (1951)
4. Scopes, R.K. Protein Purification, Principles and Practice, 2nd Edition, Springer-Verlag (1987)