Рекомендации по применению

Контроль качества биологических соединений

Agilent
Trusted Answers

Преимущества многокюветного спектрофотометра видимого и ультрафиолетового диапазона Cary 3500 Multicell для анализа белков

Улучшенная производительность и воспроизводимость для качественного и количественного анализа очень малых объемов пробы

Авторы

Kevin Grant и Matt Quinn

Agilent Technologies, Австралия

Введение

Спектрофотометрия видимого и ультрафиолетового диапазона — это быстрый и надежный способ проконтролировать качество образца. С ее помощью также можно определить удельную активность, оценить выход после очистки и идентифицировать различные фракции белков или аминокислот.

Белки с аминокислотами, содержащими ароматическое кольцо в боковой цепи, поглощают свет с длиной волны около 280 нм. Это позволяет определять их количественно с помощью УФ-ВИД-спектрофотометра. Согласно закону Бугера — Ламберта — Бера (*1*), зная коэффициент поглощения белков, содержащих такие аминокислоты, можно определять их концентрацию в растворе. Так как зачастую для анализа доступно ограниченное количество белка, для его экономии важна возможность выполнить измерение минимального объема пробы. Полный спектр поглощения пробы может дать некоторую информацию о возможных примесях.

Спектрофотометр видимого и ультрафиолетового диапазона Cary 3500 Multicell оборудован встроенным не требующим регулировки многокюветным держателем, который идеально подходит для выполнения качественного и количественного анализа в кюветах сверхмалого объема (рис. 1).

Рис. 1. Высококоллимированный луч УФ-ВИД-спектрофотометра Cary 3500 имеет ширину менее 1,5 мм. Узкий луч делает этот спектрофотометр идеально подходящим для узких кювет (таких, как показана на рисунке).

Данное исследование демонстрирует преимущества УФ-ВИД-спектрофотометра Cary 3500 Multicell для качественного и количественного анализа малых объемов растворов белка. В этом исследовании применялся бычий сывороточный альбумин (BSA) — широко распространенный белковый стандарт с известным коэффициентом поглощения.

Экспериментальная часть

Образцы

Раствор фосфатного буфера с концентрацией 0,01 моль/л, доведенный до значения pH 7,0. Исходный раствор BSA с концентрацией 10 мг/мл разбавлялся до концентраций 0,75, 1,5, 2,25, 3,00 и 3,75 мг/мл.

Для измерений применялось шесть кювет сверхмалого объема на 70 мкл с окном 2 x 2,5 мм и длиной оптического пути 10 мм (рис. 1). Одна из кювет содержала раствор сравнения, пять остальных — анализируемые растворы. Для проверки воспроизводимости применялась стандартная кварцевая кювета объемом 3,5 мл с длиной оптического пути 10 мм. В качестве раствора сравнения использовался раствор фосфатного буфера.

Оборудование и методика выполнения эксперимента

Все измерения проводились на спектрофотометре видимого и ультрафиолетового диапазона Cary 3500 Multicell. Регистрировался спектр поглощения в диапазоне от 250 до 350 нм с интервалом 1 нм и усреднением сигнала в течение 1 с. Система не требует предварительной регулировки.

Чтобы продемонстрировать воспроизводимость, выполнялось 20 повторных измерений раствора BSA с концентрацией 3,0 мг/мл в кювете сверхмалого объема (70 мкл) с раствором сравнения — фосфатным буферным раствором в аналогичной кювете сверхмалого объема. Дополнительно выполняли 10 повторных измерений того же раствора в стандартной кварцевой кювете объемом 3,5 мл с длиной оптического пути 10 мм. В этом случае в качестве раствора сравнения применялся раствор фосфатного буфера в идентичной кювете. Все эти измерения выполнялись при длине волны 278 нм с шириной полосы спектра 2 нм и усреднением сигнала в течение 1 с.

Результаты

Одновременное измерение

С помощью спектрофотометра Cary 3500 Multicell одновременно анализировалось пять проб раствора BSA с одним раствором сравнения в кюветах сверхмалого объема (окно 2 x 2,5 мм с длиной оптического пути 10 мм). Для количественного анализа регистрировался спектр в диапазоне от 250 до 350 нм (рис. 2). Эти данные затем использовались для оценки линейности прибора (см. раздел «Линейность в кюветах сверхмалого объема» ниже).

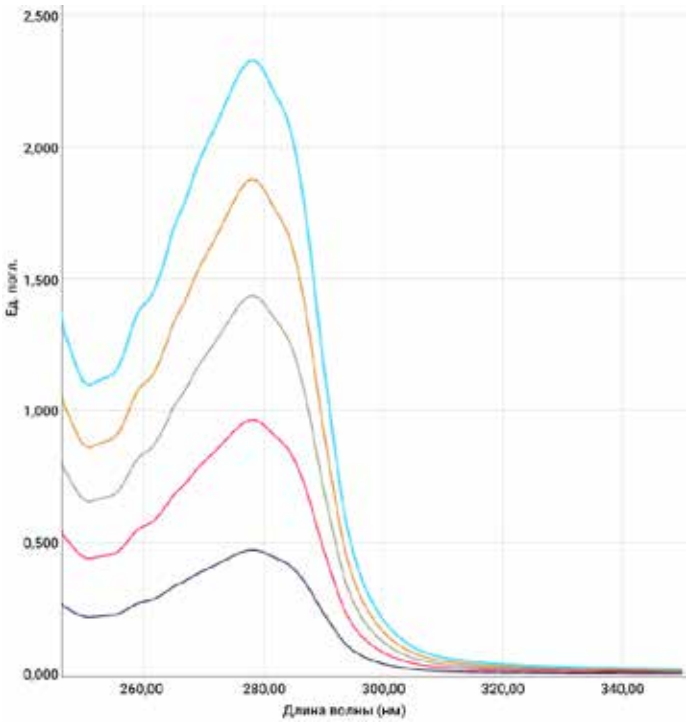

Рис. 2. Одновременно зарегистрированные спектры поглощения пяти проб BSA в кюветах сверхмалого объема 70 мкл.

Чистота белка

Оптическую плотность на длине волны 350 нм можно применять для количественного определения примесей в пробе белка и для соответствующей коррекции результатов измерения. Как видно из рис. 2, на длине волны 350 нм оптическая плотность всех исследуемых проб была равной 0 единиц поглощения. Таким образом, концентрация BSA в этих пробах в точности пропорциональна интенсивности максимума пика в спектре и не требует поправки на содержание примесей.

Линейность в кюветах сверхмалого объема

Максимум пика на каждом из спектров BSA находится на длине волны 278 нм (рис. 2). С помощью ПО Cary UV workstation оптическая плотность при длине волны 278 нм извлекалась из спектров и откладывалась на графике напротив концентрации белка в соответствующей пробе (рис. 3). Полученные данные явно свидетельствуют о линейности системы Cary 3500 (рис. 3). Полученные данные демонстрируют, что система сохраняет линейность до оптической плотности порядка 2,5 ед. поглощения даже для кювет с малым окном и сверхмалым объемом.

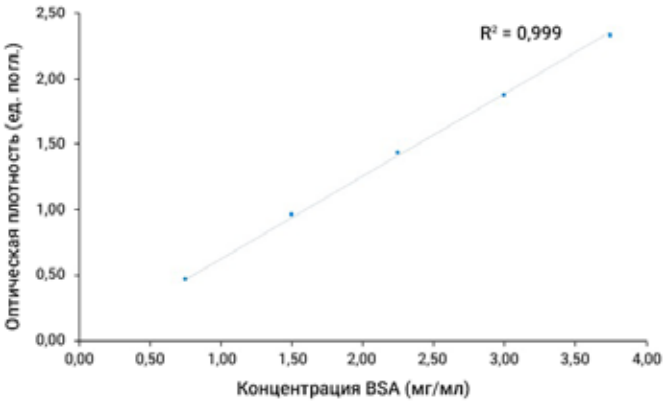

Рис. 3. Линейность УФ-ВИД-спектрофотометра Cary 3500 Multicell на примере графика оптической плотности проб с пятью различными концентрациями BSA при длине волны 278 нм.

Воспроизводимость

Для демонстрации воспроизводимости выполнялось по 20 повторных измерений пробы BSA с концентрацией 3,0 мг/мл в кюветах сверхмалого объема 70 мкл и окном 2 x 2,5 мм и в стандартных кюветах объемом 3,5 мл. Длина оптического пути всех кювет была равна 10 мм. Как видно из рис. 4, на воспроизводимость (стандартное отклонение) измерений уменьшенный размер окна кювет сверхмалого объема не влияет. Стандартное отклонение повторных измерений было равным 0,00042 для кюветы сверхмалого объема 70 мкл и 0,00029 для стандартной кюветы объемом 3,5 мл. Среднее измеренное значение оптической плотности в кювете сверхмалого объема было равным 1,863 ед. поглощения. Среднее измеренное значение оптической плотности в стандартной кювете объемом 3,5 мл было равным 1,858 ед. поглощения. Разница между двумя значениями не превышает погрешности измерения прибора.

Рис. 4. Оптическая плотность 20 повторных измерений в кювете сверхмалого объема 70 мкл в сравнении со стандартной кюветой объемом 3,5 мл.

Кюветы малого объема, как правило, имеют окна уменьшенного размера, что приводит к снижению светопропускания таких кювет. Сниженное светопропускание приводит к сужению линейного диапазона оптической плотности и снижению воспроизводимости измерений. Узкий сфокусированный луч спектрофотометра Cary 3500 практически целиком проходит через пробу и обеспечивает воспроизводимость не хуже, чем для стандартных кювет объемом 3,5 мл (рис. 4).

Обсуждение результатов

Если известен коэффициент поглощения, то значение оптической плотности в максимуме поглощения спектра ультрафиолетового и видимого диапазона позволяет определить концентрацию пробы. Для бычьего сывороточного альбумина, который применялся в этом исследовании, коэффициент поглощения хорошо известен. Если коэффициент поглощения неизвестен, его можно рассчитать из наклона калибровочной кривой, полученной измерением оптической плотности множества стандартных растворов. Этот процесс может отнять много времени привести к ошибкам измерения, которые могут остаться незамеченными до конца эксперимента.

Для повышения уверенности в полученных результатах аналитик может включить в набор исследуемых проб несколько проб с известной концентрацией. Эти пробы называются внутренними проверочными стандартами. Однако в таком случае пробы и стандарты измеряются в разные моменты времени и не дают гарантии того, что параметры не изменились между отдельными измерениями. Как показано в данной работе (рис. 2), одновременное измерение калибровочных стандартов и образцов позволяет существенно снизить влияние внешних факторов на результаты измерений.

Если измеряемые образцы нестабильны, то последовательное измерение всех образцов может привести к возникновению дополнительных погрешностей и ошибок. Пока пробы стоят в стороне, ожидая своей очереди на измерение, их оптическая плотность может измениться. Это может произойти из-за изменения температуры, из-за того, что образцы находятся на свету, или из-за химических реакций в растворе и привести к появлению систематической погрешности в количественном анализе. Измеряя оптическую плотность всех кювет одновременно, УФ-ВИД-спектрофотометр Cary 3500 Multicell исключает эти нежелательные переменные и увеличивает надежность полученных результатов. Это также позволяет значительно сократить продолжительность анализа.

Выводы

Спектрофотометр видимого и ультрафиолетового диапазона Cary 3500 Multicell предоставляет новые возможности для качественного и количественного анализа белков. Уникальный встроенный неподвижный многокюветный держатель обеспечивает системе максимальную производительность и воспроизводимость. Он позволяет производить измерения во всех восеми кюветах одновременно, что значительно снижает влияние всех нежелательных внешних воздействий, которые могут повлиять на последовательные измерения. Все это делает спектрофотометр видимого и ультрафиолетового диапазона Cary 3500 Multicell мощной аналитической системой.

Литература

1. Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fasman, D.G., Ed. (1992). CRC Press, Boston.

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

Информация в этом документе может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2018
Напечатано в США 30 октября 2018 г.
5994-0386RU

Agilent
Trusted Answers