

Vantaggi del sistema UV-Vis multicella Cary 3500 per l'analisi delle proteine

Miglioramenti nella produttività e riproducibilità per misure qualitative e quantitative di volumi ridotti



Autori

Kevin Grant e Matt Quinn

Agilent Technologies,
Australia

Introduzione

Le misure effettuate da uno spettrofotometro UV-Vis forniscono un rapido e affidabile controllo della qualità di un campione. Possono anche essere utilizzate per calcolare una specifica attività o stimare la resa dopo una purificazione e per identificare le frazioni contenenti proteine o aminoacidi.

Le proteine che contengono aminoacidi con catene laterali aromatiche assorbono la luce a circa 280 nm. Grazie a questa caratteristica, è possibile effettuare delle analisi quantitative utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis. Secondo la legge di Beer-Lambert (1), è possibile determinare la concentrazione delle proteine contenenti questi aminoacidi quando è noto il coefficiente di assorbimento. Spesso non si hanno a disposizione grandi quantità di campione della proteina; per questo poter eseguire le misure su volumi minimi è importante per conservare il campione. L'esecuzione di una scansione delle lunghezze d'onda può fornire informazioni circa la presenza di potenziali contaminanti.

Il sistema UV-Vis multicella Cary 3500 è dotato di un supporto multicella integrato, permanentemente allineato, ideale per misure qualitative e quantitative riproducibili e affidabili, con cuvette ultra-micro (Figura 1).



Figura 1. Il sistema UV-Vis Cary 3500 ha un fascio altamente focalizzato di ampiezza inferiore a 1,5 mm. Grazie al fascio di piccole dimensioni, il sistema è ideale per l'utilizzo con cuvette dotate di piccole aperture, come quella mostrata qui.

Questo studio dimostra i vantaggi dello spettrofotometro UV-Vis multicella Cary 3500 per l'analisi qualitativa e quantitativa di piccoli volumi di proteine. Per questa analisi è stata utilizzata l'albumina di siero bovino (BSA, bovine serum albumin), una proteina standard comune il cui coefficiente di assorbimento è noto.

Condizioni sperimentali

Campioni

Una soluzione tampone fosfato (PBS) 0,01 M è stata preparata a pH 7.0. Una soluzione stock di BSA da 10 mg/mL è stata preparata e quindi diluita a 0,75, 1,50, 2,25, 3,00 e 3,75 mg/mL.

Per le misure sono state utilizzate sei cuvette ultra-micro da 70 μ L, con apertura di 2 x 2,5 mm e cammino ottico di 10 mm (Figura 1). Una cuvetta è stata utilizzata come riferimento e cinque come campioni. Una cuvetta standard in quarzo, da 3,5 mL, con cammino ottico di 10 mm è stata utilizzata per le misure di riproducibilità. Il tampone PBS è stato utilizzato come soluzione di riferimento.

Strumentazione e metodo

Per tutte le misure è stato usato uno spettrofotometro UV-Vis multicella Cary 3500. È stata eseguita una scansione delle lunghezze d'onda da 250 a 350 nm, con un tempo per la media del segnale di 1 secondo e un intervallo dei dati di 1 nm. Non è stato necessario eseguire alcun pre-allineamento del sistema.

Al fine di dimostrare la riproducibilità, sono state eseguite 20 misure ripetute della soluzione di BSA da 3,0 mg/mL, usando un cuvetta ultra-micro (70 μ L), insieme a un'identica cuvetta ultra-micro contenente il tampone PBS nella posizione di riferimento. In aggiunta, è stato condotto un altro set di 10 misure ripetute della stessa soluzione, usando una cuvetta standard in quarzo da 3,5 mL, con cammino ottico di 10 mm. In questo caso, una cuvetta identica contenente tampone PBS è stata utilizzata come riferimento. Tutte le misure sono state eseguite a 278 nm con un tempo per la media del segnale di 1 secondo e larghezza di banda spettrale di 2 nm.

Risultati

Misure simultanee

Il bianco e i cinque campioni di BSA sono stati misurati simultaneamente nel sistema UV-Vis multicella Cary 3500. Sono state utilizzate cuvette ultra-micro (apertura di 2 x 2,5 mm con cammino ottico di 10 mm). Per l'analisi qualitativa del campione, è stata eseguita una scansione delle lunghezze d'onda da 250 a 350 nm (Figura 2). Questi dati sono stati poi utilizzati per valutare la linearità dello strumento (si veda qui di seguito la sezione Linearità nelle microcelle).

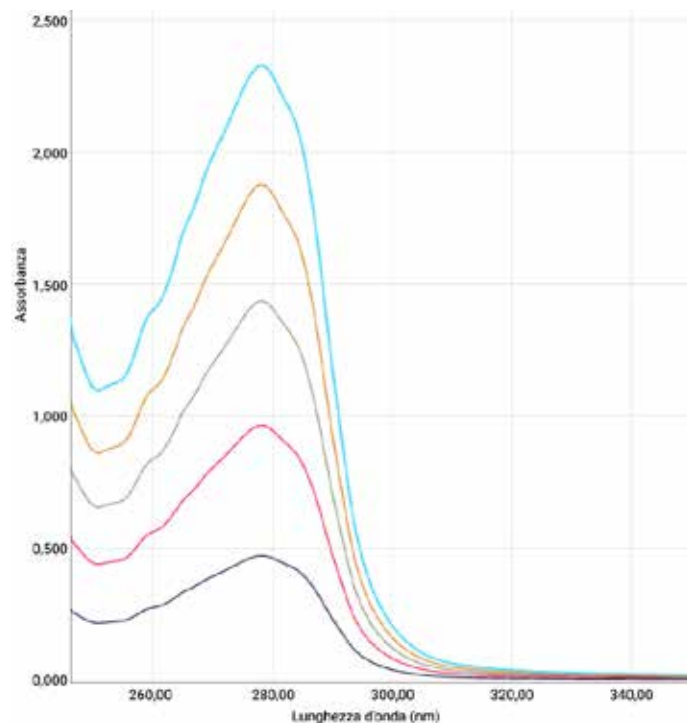


Figura 2. Scansioni delle lunghezze d'onda di cinque campioni di BSA in cuvette ultra-micro da 70 μ L raccolte simultaneamente.

Purezza delle proteine

L'intensità dell'assorbanza a 350 nm può essere usata per quantificare e correggere per la presenza di eventuali contaminanti in un campione di proteina. Come mostrato in Figura 2, l'assorbanza a 350 nm nei campioni qui esaminati è 0 Abs. In questi campioni, quindi, la concentrazione di BSA può essere determinata con precisione in quanto direttamente proporzionale all'intensità del picco massimo nello spettro. Non è richiesta alcuna correzione delle impurezze.

Linearità nelle microcelle

Il picco massimo evidente in ciascuna scansione delle lunghezze d'onda di BSA si trova a 278 nm (Figura 2). L'intensità dell'assorbanza al picco di 278 nm è stata estratta per ciascun campione, utilizzando il software della workstation Cary UV, e riportata in un grafico rispetto alla concentrazione della proteina in ciascuno dei campioni misurati (Figura 3). Questi dati dimostrano chiaramente la linearità del sistema Cary 3500 (Figura 3). I dati mostrano che la linearità si estende a quasi 2,5 Abs, anche quando sono usate le cuvette ultra-micro con apertura piccola.

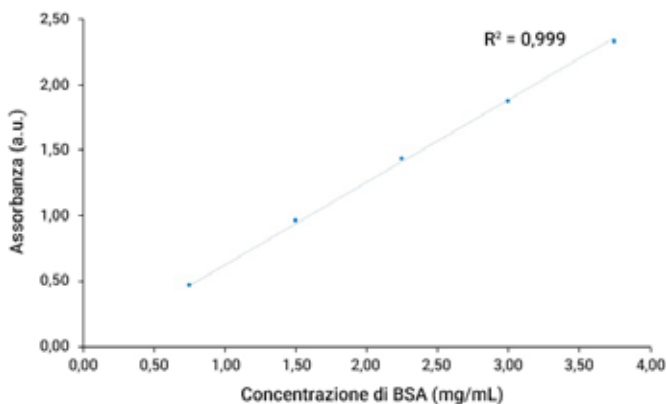


Figura 3. Linearità del sistema UV-Vis multicella Cary 3500 dimostrata riportando l'assorbanza a 278 nm e la concentrazione dei cinque campioni di BSA.

Riproducibilità

Al fine di dimostrare la riproducibilità, 20 misure ripetute del campione di BSA a 3,0 mg/mL sono state eseguite sia in cuvetta ultra-micro da 70 μ L, con apertura di 2 x 2,5 mm, che in cuvetta standard da 3,5 mL. Entrambe le cuvette avevano un cammino ottico di 10 mm. La riproducibilità (deviazione standard) delle misure non è stata influenzata dalla dimensione ridotta dell'apertura della cuvetta ultra-micro, come mostrato in Figura 4. La deviazione standard delle misure ripetute è 0,00042 per la cuvetta ultra-micro da 70 μ L e 0,00029 per la cuvetta standard da 3,5 mL. La media delle misure utilizzando la cuvetta ultra-micro era 1,863 Abs. La

media delle misure utilizzando la cuvetta standard da 3,5 mL era 1,858 Abs. La differenza tra le due misure rientrava tra i valori d'incertezza di misura dello strumento.

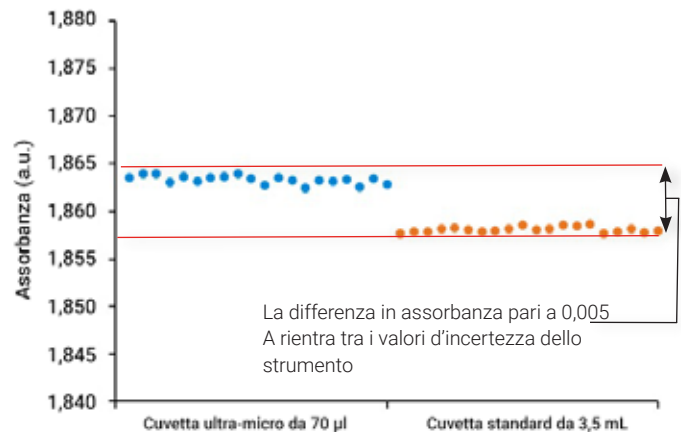


Figura 4. L'assorbanza delle 20 misure ripetute per una cuvetta ultra-micro da 70 μ L, rispetto a una cuvetta standard da 3,5 mL.

L'utilizzo di cuvette a basso volume comporta il rischio di una ridotta emissione di luce, in quanto il design di tali cuvette comunemente prevede una finestra con apertura più piccola. L'emissione di luce ridotta contribuisce alla diminuzione sia dell'intervallo di assorbanza lineare che della riproducibilità della misura. Cary 3500 ha un fascio altamente focalizzato che assicura la massima emissione di luce attraverso il campione e la stessa buona riproducibilità di quella ottenuta con la cuvetta standard da 3,5 mL (Figura 4).

Discussione

Le misure quantitative possono essere realizzate tramite l'intensità dei massimi di assorbanza su uno spettro UV-Vis, se si conosce il coefficiente di assorbimento. Nel caso di campioni come la BSA misurata nel presente studio, tale coefficiente di assorbimento è noto. Quando non è noto, il coefficiente di assorbimento viene calcolato dalla pendenza della curva di calibrazione, creata mediante la misura di più standard. Questo processo potrebbe richiedere molto tempo e portare ad errori di misura identificabili solo alla fine dell'esperimento.

In certi casi gli analisti scelgono di migliorare l'affidabilità dei dati includendo campioni con concentrazioni note all'interno di una sequenza analitica. Questi campioni fungono da controlli interni. Il problema con questo tipo di misura è che i campioni e gli standard non sono misurati allo stesso tempo: le variabili potrebbero così avere subito un cambiamento tra una misura e l'altra. Misurando i campioni e gli standard di calibrazione allo stesso tempo come dimostrato in questa nota (Figura 2), è possibile ridurre notevolmente altre variabili esterne o errori che potrebbero influenzare la preparazione del campione.

Nel caso di campioni potenzialmente instabili, il metodo che prevede misure in tempi diversi potrebbe introdurre degli errori. Per esempio, l'assorbimento può subire uno spostamento nei campioni lasciati sul banco in attesa di venire misurati. Tale spostamento può essere dovuto a cambiamenti di temperatura, all'effetto della luce che colpisce la soluzione o a cambiamenti chimici nella soluzione. Questo può introdurre errori sistemici per la misura quantitativa. Misurando tutte le posizioni delle cuvette contemporaneamente, lo spettrofotometro UV-Vis multicella Cary 3500 elimina queste variabili indesiderate e aumenta l'affidabilità dei risultati generati. Inoltre, consente di ridurre significativamente i tempi di misura.

Conclusioni

Lo spettrofotometro multicella UV-Vis Cary 3500 crea nuove possibilità per l'analisi quantitativa e qualitativa delle proteine. Il sistema è progettato per migliorare produttività e riproducibilità, con il suo unico supporto multicella stazionario integrato. Misurando tutte le otto posizioni delle cuvette contemporaneamente, si riduce efficacemente qualsiasi variabile indesiderata che può presentarsi durante le misure successive. Tutte queste caratteristiche forniscono un potente sistema analitico UV-Vis.

Bibliografia

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

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Stampato negli Stati Uniti, 30 ottobre 2018
5994-03861TE