

Konzentrationsanalyse von Proben mit Ultra-Mikrovolumen mittels UV-Vis-Spektroskopie

Einfache, präzise und zerstörungsfreie
Konzentrationsanalyse mit dem Agilent
Cary 60 UV-Vis und der TrayCell 2.0



Autoren

Geethika Weragoda,
Wesam Alwan und
Fabian Zieschang
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Mit dem Agilent Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer und einer TrayCell 2.0 Ultra-Mikrovolumen-Küvette wurden Analysen von Protein- und Nukleinsäureproben durchgeführt. Die zerstörungsfreie Messung von Probenvolumen im Mikroliterbereich hat Vorteile im Hinblick auf die Probenerhaltung und Probenhandhabung und macht mühsame und fehleranfällige Verdünnungen überflüssig. Die Verwendung der TrayCell 2.0 Küvette ist schnell und einfach und verbessert den Arbeitsablauf für den Benutzer.

Einführung

Moderne Labore suchen zunehmend nach genauen, präzisen und anwenderfreundlichen Methoden zur Analyse von Proben wie DNA-, RNA- und Proteinproben ohne Verdünnung. Das **Agilent Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer** in Verwendung mit einer TrayCell 2.0 Ultra-Mikrovolumen-Küvette mit einem Deckel mit geeigneter Schichtdicke ist eine praktische und anwendungsfreundliche Plattform für die direkte Messung von Ultra-Mikrovolumenmengen einer Probe. Proben mit hoher oder niedriger Konzentration werden jeweils mit einem Deckel mit kleiner bzw. großer Schichtdicke analysiert, sodass ein großer dynamischer Bereich sichergestellt ist. Die Methode ist zerstörungsfrei und ermöglicht so die Erhaltung wertvoller Proben. Zudem ist die TrayCell 2.0 leicht zu reinigen, was die Anwendbarkeit der Technik erhöht.

Das Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer (Abbildung 1) ist sowohl für häufig durchgeführte Routineanwendungen als auch für komplexere Anwendungen ausgelegt. Es handelt sich um ein Doppelstrahlgerät mit einer leistungsstarken, hochfokussierten Xenon-Blitzlampe. Die Lampe maximiert die Lichtmenge, die durch die Probe dringt, und gewährleistet so photometrische Ergebnisse hoher Qualität. Das Cary 60 UV-Vis ist daher ideal für die genaue und reproduzierbare Messung kleiner Probenvolumen. Die Xenon-Blitzlampe beleuchtet die Probe nur, wenn Daten erfasst werden, sodass empfindliche Proben vor Photodegradation geschützt werden und der Stromverbrauch reduziert wird. Das Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer ist außerdem immun gegen verfälschende Effekte von Raumlicht. Die Störfestigkeit des Cary 60 UV-Vis gegenüber Raumlicht ermöglicht den Betrieb mit einer offenen Probenkammer, die einen leichten Zugriff ermöglicht und das Risiko einer Datenkompromittierung aufgrund von Handhabungsfehlern reduziert. Im Vergleich zu bestehenden Methoden, die aufgrund von Einschränkungen durch das Gerät ungenaue oder nicht reproduzierbare Ergebnisse liefert, das Cary 60 UV-Vis qualitativ hochwertigere Daten.



Abbildung 1. Das Agilent Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer.

Für mehr Nachhaltigkeit im Labor

Das Cary 60 UV-Vis wurde unabhängig hinsichtlich seiner Umweltauswirkungen geprüft und erhielt von My Green Lab das **ACT-Siegel (Accountability, Consistency, Transparency – Verantwortlichkeit, Konsistenz, Transparenz)**. Das Siegel gibt Auskunft über die Umweltauswirkungen des Cary 60 UV-Vis im Lauf des gesamten Lebenszyklus des Geräts (Abbildung 2).

Das Cary 60 UV-Vis ermöglicht eine Verbesserung der Umweltauswirkungen von Laboren ohne Kompromisse bei der Produktivität oder dem wissenschaftlichen Fortschritt.



Abbildung 2. Das ACT-Siegel gibt Auskunft über die Umweltauswirkungen von Herstellung, Nutzung und Entsorgung eines Produkts und seiner Verpackung.

Bei einer typischen Extinktionsmessung wird die TrayCell 2.0 Ultra-Mikrovolumen-Küvette (Bestellnummer G6871C) in den Standard-Zellenhalter des Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometers gesetzt. Für die TrayCell 2.0 sind austauschbare Deckel mit vier verschiedenen Schichtdicken erhältlich, 2,0 (Bestellnummer G6871-68005), 1,0 (Bestellnummer G6871-68004), 0,2 (Bestellnummer G6871-68003) und 0,1 mm (Bestellnummer G6871-68002), sodass sich ein großer dynamischer Bereich ergibt. Ein Ultra-Mikrovolumen-Aliquot der Probe (0,7 bis 10 μl je nach Schichtdicke) wird auf das Messfenster der TrayCell 2.0 pipettiert und anschließend der entsprechende Deckel mit der ausgewählten Schichtdicke aufgesetzt. Der hochfokussierte Lichtstrahl des Cary 60 UV-Vis wird über eine Faseroptik durch die Probe in der TrayCell 2.0 geleitet (Abbildung 3). Daraufhin wird der Lichtstrahl vom Spiegel im Deckel zurück und zum Detektor des Spektralphotometers reflektiert und passiert die Probe erneut, wie in Abbildung 4 gezeigt.

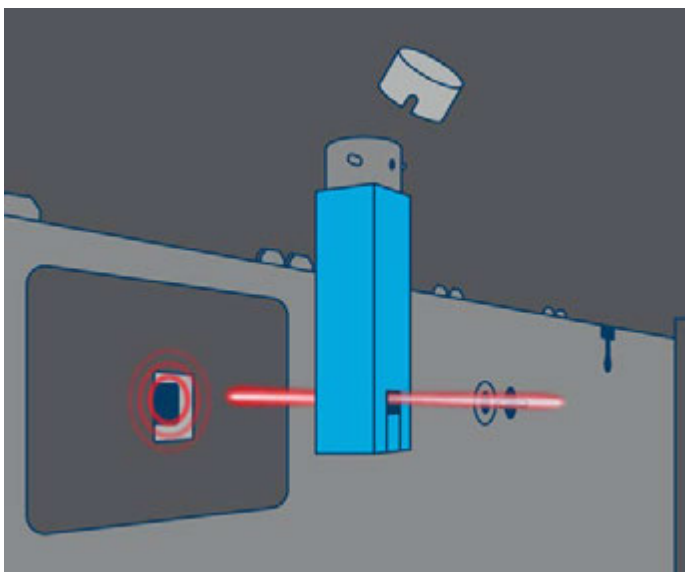


Abbildung 3. Schematische Darstellung des Agilent Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometers mit einer TrayCell 2.0 Ultra-Mikrovolumen-Küvette für die direkte Messung von Ultra-Mikrovolumenmengen einer Probe. Darstellung des hochfokussierten Strahls des Cary 60 UV-Vis auf dem Weg durch die TrayCell 2.0.

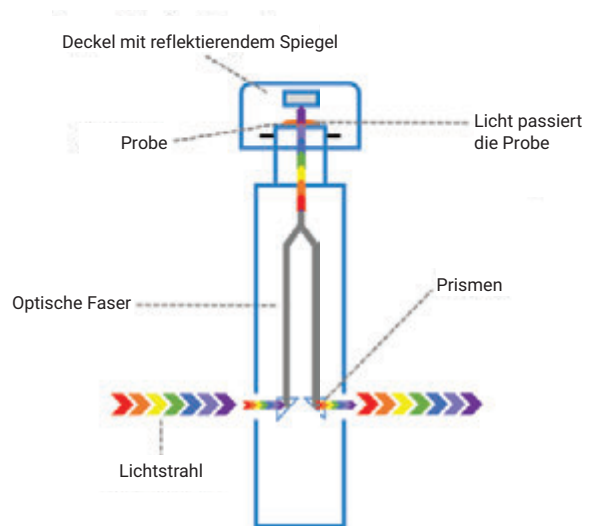


Abbildung 4. Optisches Design der TrayCell 2.0 Ultra-Mikrovolumen-Küvette.

Bevor die nächste Probe auf das Messfenster der TrayCell 2.0 pipettiert wird, müssen das Fenster und der Spiegel im Deckel gereinigt werden. Für die Reinigung des Fensters muss die TrayCell 2.0 nicht aus dem Küvettenhalter genommen werden. Durch den präzisen Abstand zwischen dem Fenster und dem Spiegel im Deckel ist sichergestellt, dass die Strahlengänglänge genau ist und bei jeder Messung konstant bleibt.

In dieser Studie wurde das Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer mit einer TrayCell 2.0 Ultra-Mikrovolumen-Küvette verwendet, um Ultra-Mikrovolumen von Protein- und DNA-Proben zu messen. Die TrayCell 2.0 wurde mit Deckeln in Ausführungen mit unterschiedlichen Schichtdicken verwendet, um die Notwendigkeit für Verdünnungen zu reduzieren und den messbaren Konzentrationsbereich der Probe zu vergrößern. Die photometrische Leistung des Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometers mit der TrayCell 2.0 wurde anhand von Rinderserumalbumin (BSA)- und Heringssperma-DNA-Proben demonstriert.

Geräte und Material

- Agilent Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer
- TrayCell 2.0 Ultra-Mikrovolumen-Küvette
- BSA-Protein: Zur Herstellung einer Stammlösung mit 400 mg/ml wurde eine bekannte Menge BSA-Protein (Sigma-Aldrich, CAS 9048-46-8) in PBS-Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung) gelöst. Die Stammlösung wurde seriell verdünnt, um eine Reihe von Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen herzustellen.
- Heringssperma-DNA: Zur Herstellung einer Stammlösung mit 5 mg/ml wurde eine bekannte Menge Heringssperma-DNA (Sigma-Aldrich, CAS 438545-06-3) in PBS-Puffer gelöst. Die Stammlösung wurde seriell verdünnt, um eine Reihe von Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen herzustellen.

Mit einer Pipette wurde ein Ultra-Mikrovolumen der Probe (3 μ l) auf das Messfenster gegeben, und die Datenakquisition wurde mit der Agilent Cary WinUV Software, Version 5.1.3.1042 durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Photometrische Reproduzierbarkeit bei niedrigen Konzentrationen

Zur Beurteilung des nutzbaren Extinktionsbereichs des Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometers mit der TrayCell 2.0 wurden sowohl hoch- als auch niedrig konzentrierte Proben gemessen. Die TrayCell 2.0 ist ideal für die Messung von niedrig konzentrierten Proben mit begrenztem Volumen, da nur Ultra-Mikrovolumen-Aliquots der Proben benötigt werden. Im Gegensatz zu vielen anderen Spektralphotometern, deren Empfindlichkeit nicht hoch genug ist, um niedrige Konzentrationen unter 25 ng/ μ l zu messen, ist das Cary 60 UV-Vis zudem empfindlich genug, um auch niedrige Konzentrationen zu messen. Bei derart niedrigen Konzentrationen sind die Leistungsmerkmale des Spektralphotometers von entscheidender Bedeutung. Daher müssen Wellenlängenscans durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass eine typische Probenkurve zu sehen ist. Mit dem Cary 60 UV-Vis und der TrayCell 2.0, die mit einem 1,0-mm-Deckel ausgestattet war, wurden zehn Wiederholungen eines Wellenlängenscans einer Probe mit 20 ng/ μ l Heringssperma-DNA durchgeführt. Die Extinktion dieser Probe beträgt 0,04, was 0,4 AU in einer 10-mm-Standardküvette entspricht. Wie in Abbildung 5 dargestellt, waren die Wellenlängenscans mit dem Cary 60 UV-Vis hervorragend reproduzierbar, eine wichtige Eigenschaft für die Analyse von Ultra-Mikrovolumen.

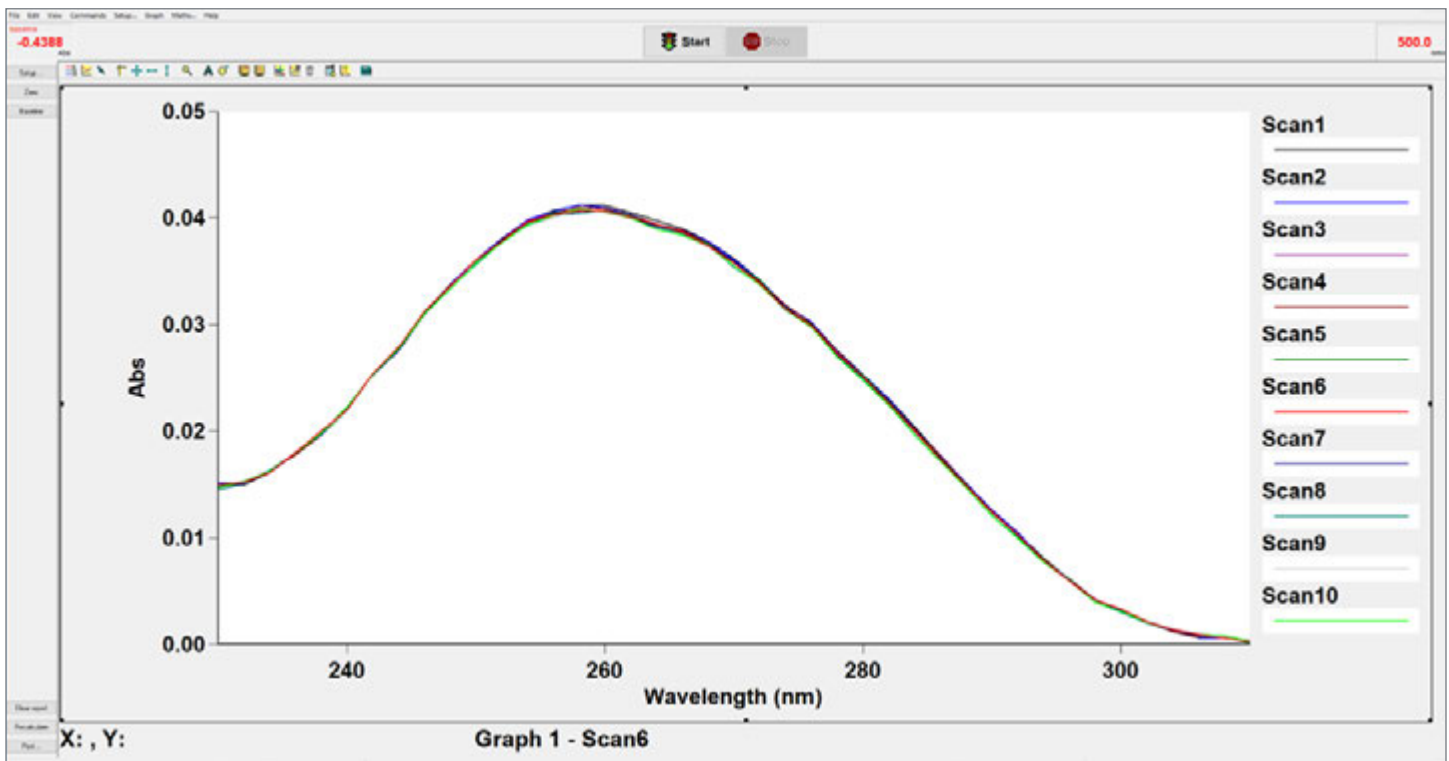


Abbildung 5. Wellenlängenscans von Heringssperma-DNA (20 ng/ μ l, 0,04 AU bei 260 nm) in zehn Wiederholungen mit dem Agilent Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer mit der TrayCell 2.0 Ultra-Mikrovolumen-Küvette mit einem Deckel mit 1,0 mm Schichtdicke.

Photometrische Linearität

Die quantitativen und qualitativen Messungen von Heringssperma-DNA und BSA-Protein wurden mit dem mit einer TrayCell 2.0 ausgestatteten Cary 60 UV-Vis erfasst. Der Deckel mit 1,0 mm Schichtdicke ist für die Messung von Probenvolumen im Bereich von 3 bis 5 µl ausgelegt und damit ideal für routinemäßig anfallende Arbeitskonzentrationen von DNA, RNA und Proteinen.

Messungen der photometrischen Linearität mit Heringssperma-DNA

Mit den Heringssperma-DNA-Proben im Konzentrationsbereich von 5 bis 1500 ng/µl wurden Absorptionsmessungen bei einer einzelnen Wellenlänge (260 nm) durchgeführt. Dabei wurde mit der TrayCell 2.0 mit einem Deckel mit 1,0 mm Schichtdicke eine exzellente photometrische Linearität bis 2,4 AU erzielt (Abbildung 6). Bei 2,4 AU betrug die entsprechende Konzentration der Heringssperma-DNA 1500 ng/µl. Auch bei extrem niedrigen Konzentrationen der DNA-Probe bis 5 ng/µl (0,008 AU, äquivalente Ext. 0,08 AU) war die photometrische Linearität bei Verwendung eines Deckels mit 1,0 mm Schichtdicke hervorragend (Abbildung 6, kleines Bild).

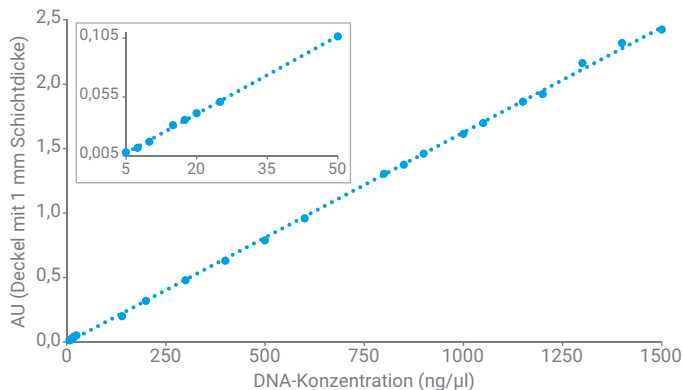


Abbildung 6. Photometrische Linearität von Heringssperma-DNA-Proben bis 1500 ng/µl. Das kleine Bild zeigt die Ergebnisse bei Proben mit niedriger Konzentration zwischen 5 und 50 ng/µl.

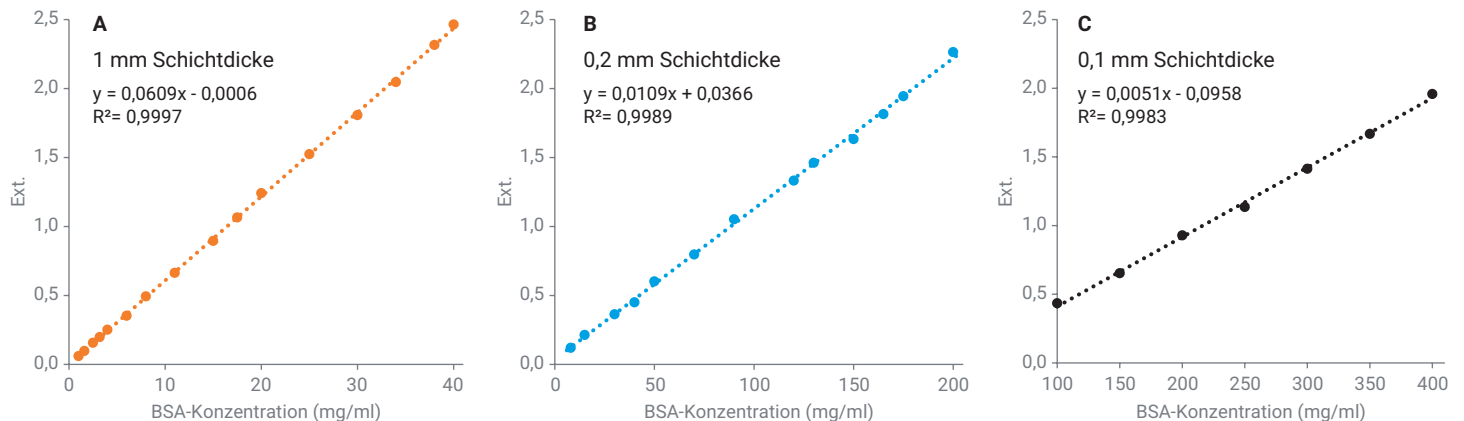


Abbildung 7. Messungen der photometrischen Linearität bei BSA-Konzentrationen bis 40 mg/ml mit dem Deckel mit 1,0 mm Schichtdicke (A), bis 200 mg/ml mit dem Deckel mit 0,2 mm Schichtdicke (B) und bis 400 mg/ml mit dem Deckel mit 0,1 mm Schichtdicke (C).

Messungen der photometrischen Linearität mit BSA-Protein

Mit dem Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer wurden Absorptionsmessungen bei einer einzelnen Wellenlänge, 280 nm, mit BSA-Protein (Konzentrationsbereich 1 bis 400 mg/ml) durchgeführt. Wie bei der Heringssperma-DNA-Probe wurde bei Verwendung des Deckels mit 1,0 mm Schichtdicke eine hervorragende photometrische Linearität bis zu 2,4 AU erzielt (Abbildung 7A). Bei 2,4 AU betrug die entsprechende Konzentration von BSA-Protein 40 mg/ml. Zur genauen Analyse hochkonzentrierter BSA-Proteinproben wurde der TrayCell 2.0 Deckel einfach gegen eine Ausführung mit kleinerer Schichtdicke ausgetauscht. BSA-Proteinkonzentrationen von bis zu 200 mg/ml wurden unter Verwendung des Deckels mit 0,2 mm Schichtdicke analysiert (Abbildung 7B). Die entsprechende Extinktion bei einer BSA-Proteinkonzentration von 200 mg/ml betrug 2,3 AU, was 115 AU bei Verwendung einer 10-mm-Standardküvette entspricht. Zur Messung von Konzentrationen bis zu 400 mg/ml wurde der Deckel mit 0,1 mm Schichtdicke, d. h. der Deckel mit der kleinsten verfügbaren Schichtdicke für die TrayCell 2.0, verwendet (Abbildung 7C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit dem Cary 60 UV-Vis und der TrayCell 2.0 eine direkte Messung von BSA-Proteinproben bis zu 400 mg/ml ohne zeitaufwändige und fehleranfällige Verdünnungen problemlos möglich ist (Tabelle 1).

Tabelle 1. Vergleich der äquivalenten Extinktion für BSA-Protein bei Schichtdicken von 1,0, 0,2 und 0,1 mm.

| | TrayCell 2.0 | | |
|--|----------------------------|-----|-----|
| | Ultra-Mikrovolumen-Küvette | | |
| Schichtdicke (mm) | 1,0 | 0,2 | 0,1 |
| Höchste gemessene Konzentration (mg/ml) | 40 | 200 | 400 |
| Gemessene Extinktion | 2,4 | 2,3 | 2,0 |
| Äquivalente Ext. mit einer 10-mm-Standardküvette | 24 | 115 | 200 |

Hinweis: Äquivalente Ext. ist der für eine Schichtdicke von 10 mm berechnete Extinktionswert. Der Vorteil, Konzentrationen bis zu 400 mg/ml messen zu können, besteht darin, dass hochkonzentrierte Proteinlösungen direkt gemessen und Verdünnungen somit überflüssig werden.

Das Cary WinUV-Konzentrationsmodul für die schnelle und einfache Datenakquisition und -analyse

Die Cary WinUV-Software bietet leistungsstarke Funktionen und optimierte Methoden für die Erfassung, Analyse, Speicherung und Anzeige von Daten bei gleichzeitiger Reduzierung der Komplexität. Sie enthält außerdem verschiedene Module, die für eine Reihe von Anwendungen ausgelegt sind, zum Beispiel für qualitative Wellenlängenscans oder -ablesungen, Konzentrationsanalyse, Enzymkinetik und vieles mehr.

In dieser Studie wurden Scans über den vollen Wellenlängenbereich mit dem **Scan**modul durchgeführt, wohingegen Messungen der photometrischen Linearität als Extinktionsmessungen bei nur einer Wellenlänge mit dem **Konzentrations**modul durchgeführt wurden. Zur Demonstration der Gerätekonfiguration und des zugehörigen, vom **Konzentrations**modul generierten Ergebnisberichts wurden die Messungen der photometrischen Linearität für BSA-Proteinproben unter Verwendung eines Deckels mit 0,1 mm Schichtdicke durchgeführt. (Diese Ergebnisse sind in Abbildung 7C gezeigt). Die Cary WinUV-Software lässt sich schnell und einfach konfigurieren und erfordert nur wenige Schritte, die im Folgenden beschrieben und in Abbildung 8 dargestellt sind:

- 1) Öffnen Sie das **Konzentrations**modul und klicken Sie auf die Registerkarte **Setup** (Konfiguration), um das Fenster zur Gerätekonfiguration zu öffnen.
- 2) Geben Sie in der Registerkarte **Cary** unter **Wavelength** (Wellenlänge) die Wellenlänge für Messungen bei nur einer Wellenlänge ein (für BSA-Proteine 280 nm eingeben).
- 3) Geben Sie die Anzahl der Replikate ein, die für jeden Standard benötigt werden, indem Sie **Replicates** (Replikate) oder **Sample/Std Averaging** (Probe/Std.-Mittelung) eingeben. In diesem Beispiel wurden Daten für jede BSA-Standardlösung als Durchschnitt von drei aufeinanderfolgenden Messungen erfasst.
- 4) Geben Sie im Abschnitt **Standards** die Konzentrationen der Standardproben in aufsteigender Reihenfolge ein und wählen Sie den **Fit type** (Anpassungstyp) aus. In diesem Beispiel wurde als **Fit type** (Anpassungstyp) **Linear** mit einem Mindestwert für R^2 (**Min R^2**) von 0,9500 ausgewählt.
- 5) Sowohl die Software als auch das Gerät sind nun bereit für die Analyse. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Start**, um die Analyse zu starten, und befolgen Sie einfach die Anweisungen zum Aufbringen der Standards/Proben, um mit der Analyse fortzufahren.

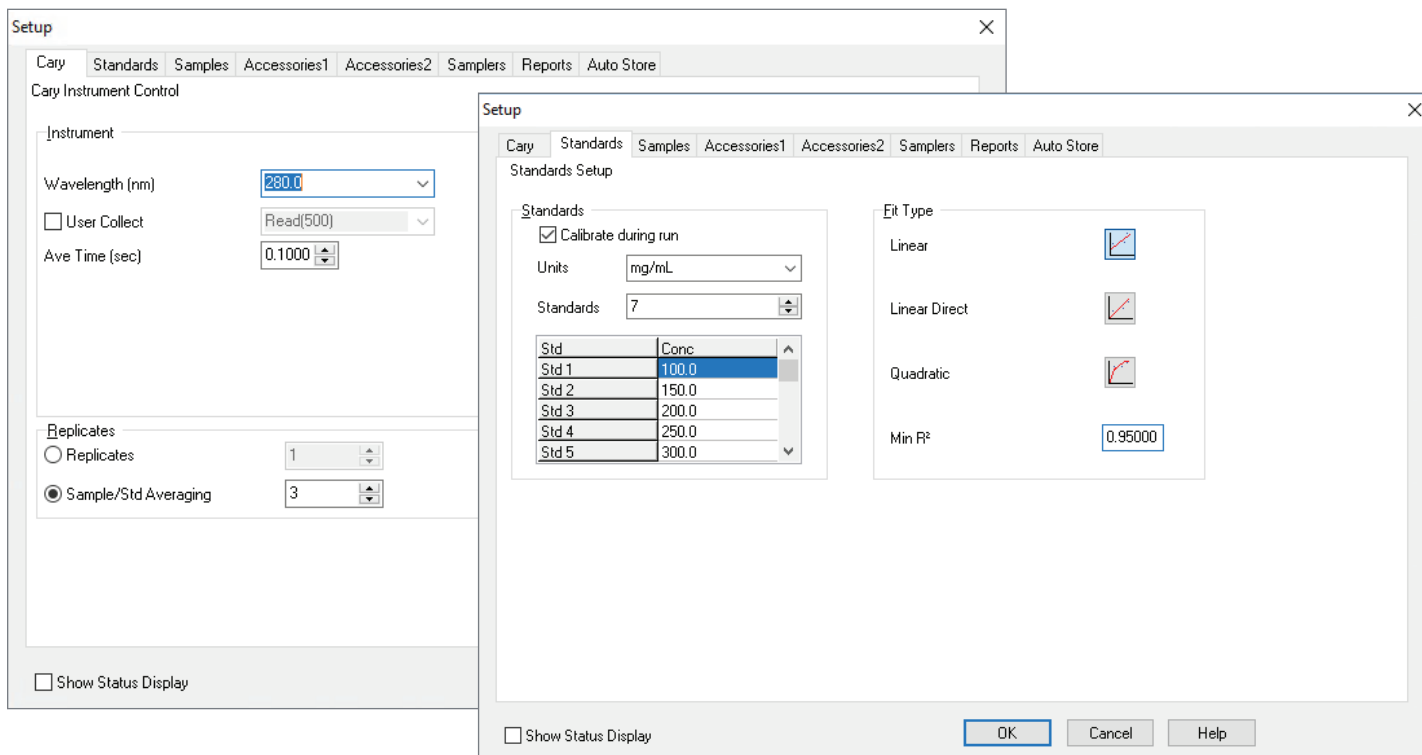


Abbildung 8. Gerätekonfiguration für die Datenakquisition und -analyse mit dem **Konzentrations**modul in der Agilent Cary WinUV-Software.

Nach der Datenakquisition wird von der Software automatisch das entsprechende Konzentrations-Extinktions-Diagramm (Kalibrierungskurve) erstellt (Abbildung 9), wodurch der Zeitaufwand für die Datenaufarbeitung reduziert wird. Die Kalibrierungskurve wird im **Konzentrations**modul gespeichert. Bei der Analyse einer unbekannt Probe verwendet die Software die Kalibrierungskurve automatisch zur Berechnung und Ausgabe der Probenkonzentration.

Reinigung der TrayCell 2.0 Ultra-Mikrovolumen-Küvette

In Abbildung 10 sind die einfachen Schritte gezeigt, die zum Reinigen der Küvette und zum Aufbringen einer Probe in die TrayCell 2.0 erforderlich sind. Das Probenfenster und der Deckel werden mit einem fusselfreien Wattestäbchen oder einem fusselfreien Labortuch sauber gewischt, und danach wird die nächste Probe mit einer Pipette aufgebracht. Dadurch entfallen zeitaufwändige Reinigungsschritte, die üblicherweise mit herkömmlichen Küvetten verbunden sind, und das Risiko eines Probenübertrags wird reduziert.

Vollständig flexible Lösung

Für sehr stark verdünnte Proben, die mit den verschiedenen, für die TrayCell 2.0 erhältlichen Deckeln nicht gemessen werden können, wird eine Standardküvette mit 10 mm Schichtdicke empfohlen. Standardküvetten mit 10 mm Schichtdicke sind für verschiedene Volumina von 40 µl bis 3,0 ml erhältlich.

Zur Durchführung einer größeren Bandbreite an Messungen wie etwa Quantifizierungen, Probenautomatisierung oder Analysen kinetischer Prozesse kann das Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer mit Küvetten mit großer Schichtdicke, automatisierten Multiküvettenwechslern sowie temperaturgesteuerten Küvettenhaltern ausgestattet werden. Die Komponenten sind problemlos austauschbar, was das Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer zu einem häufig eingesetzten Gerät für biologische UV-Vis-Routinemessungen macht.

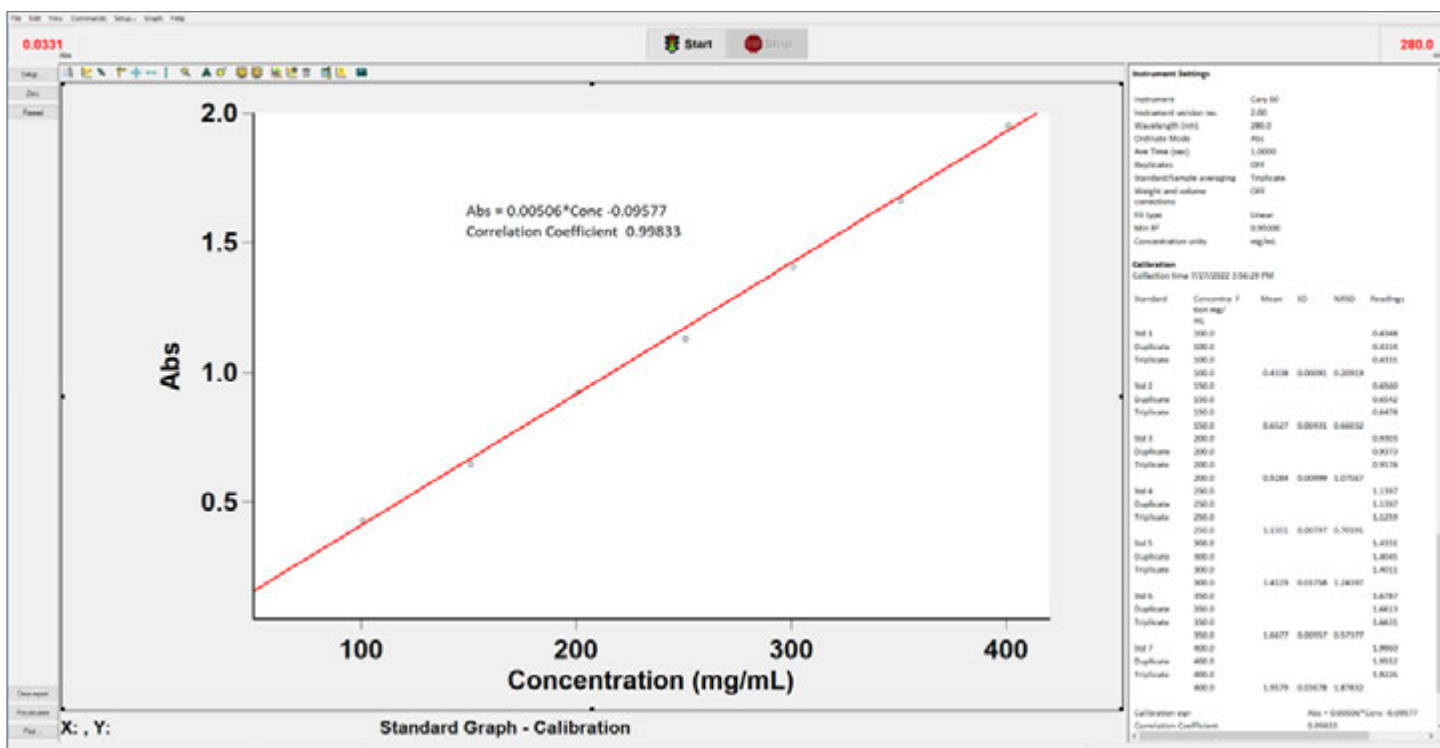


Abbildung 9. Die Kalibrierungskurve und der Konzentrationsanalysebericht für BSA-Protein unter Verwendung der TrayCell 2.0 mit einem Deckel mit 0,1 mm Schichtdicke werden von der Agilent Cary WinUV-Software automatisch erstellt. Dasselbe Diagramm ist in Abbildung 7C gezeigt.

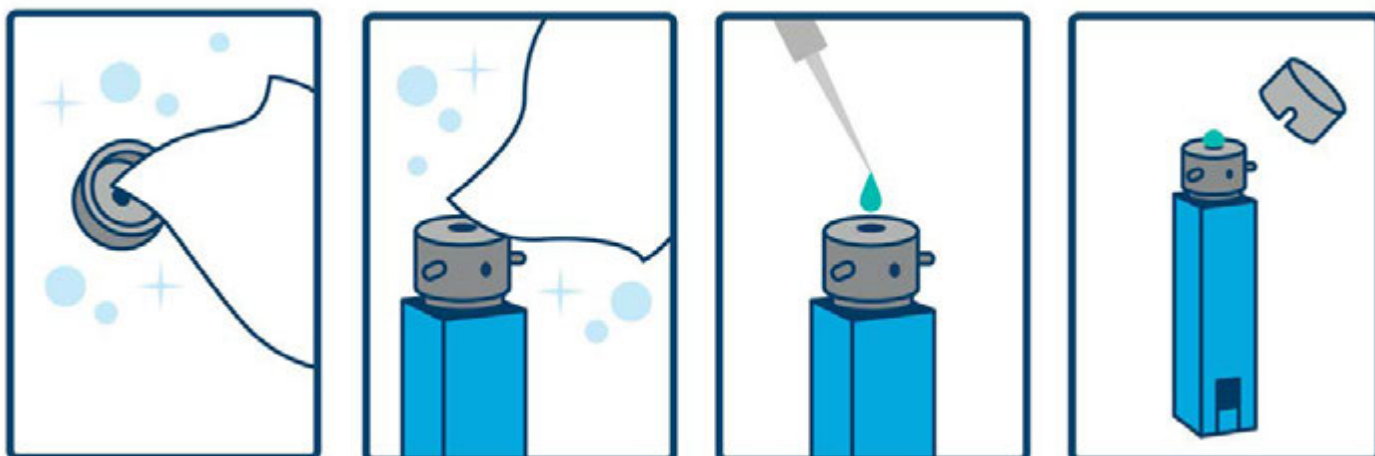


Abbildung 10. Schematische Darstellung der Reinigung der TrayCell 2.0 und der Aufbringung einer Probe.

Fazit

Das Agilent Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer mit der TrayCell 2.0 Ultra-Mikrovolumen-Küvette ist eine praktische und anwenderfreundliche Plattform zur Messung von Ultra-Mikrovolumen-Proben wie Nukleinsäuren und Proteinen. Wiederholte qualitative Wellenlängenscans einer Heringssperma-DNA-Probe mit 20 ng/µl zeigten die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit des Cary 60 UV-Vis für die Analyse von Ultra-Mikrovolumen-Proben. Durch die Verwendung von vier verschiedenen Deckeln (und damit Schichtdicken) für die TrayCell 2.0 wurde der analytische Bereich der Methode erweitert und die Notwendigkeit reduziert, langwierige und fehleranfällige Verdünnungen durchzuführen. Mit Heringssperma-DNA- und BSA-Proteinproben wurde ein linearer photometrische Bereich im Bereich von 5 bis 1500 ng/µl bzw. 1 bis 400 mg/ml beobachtet. Somit ist das Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer mit der TrayCell 2.0 durch den optimierten Arbeitsablauf, die Vielseitigkeit und die photometrische Leistung für exakte Messungen unverdünnter Nukleinsäuren und Proteine geeignet.

Weitere Informationen

- Agilent Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer
- Agilent Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer
- Lerninstrumente für die UV-Vis-Spektroskopie
- Auswahlhilfe für UV-Vis- und UV-Vis-NIR-Geräte
- Übersicht über die Anwendungen von UV-Vis-Spektralphotometern
- Häufig gestellte Fragen zur UV-Vis-Spektroskopie

www.agilent.com/chem/cary-60-uv-vis

DE21781667

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Gedruckt in den USA, 20. Dezember 2022
5994-5455DEE