

Análisis de la concentración de muestras ultramicrovolumétricas mediante espectroscopia UV-vis

Análisis sencillo, preciso y no destructivo de la concentración con el espectrofotómetro UV-vis Agilent Cary 60 y TrayCell 2.0



Autores

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

Resumen

El espectrofotómetro UV-vis Agilent Cary 60, equipado con una celda de ultramicrovolumen TrayCell 2.0, se utilizó para el análisis de muestras de proteínas y ácidos nucleicos. La medida no destructiva de volúmenes de muestra del orden de los microlitros ofrece ventajas en lo que respecta a la conservación y la manipulación de la muestra, y evita tener que realizar diluciones tediosas y propensas a errores. El uso de la celda TrayCell 2.0 resulta rápido y sencillo, y permite a los usuarios mejorar el flujo de trabajo.

Introducción

Los laboratorios modernos no cesan de buscar métodos exactos, precisos y fáciles de usar para analizar muestras de ADN, ARN y proteínas sin necesidad de diluirlas.

El **espectrofotómetro UV-vis Agilent Cary 60**, equipado con una celda de ultramicrovolumen TrayCell 2.0 y un tapón de longitud de paso adecuada, sirve como una plataforma cómoda y fácil de usar para la medida directa de ultramicrovolúmenes de muestra. Permite analizar muestras con concentraciones altas o bajas usando un tapón de longitud de paso corta o larga, respectivamente, lo que garantiza un amplio intervalo analítico. Se trata de un método no destructivo que permite la recuperación de valiosas muestras; además, la celda TrayCell 2.0 se puede limpiar con facilidad, lo que facilita el uso de la técnica.

El espectrofotómetro UV-vis Cary 60 (Figura 1) está diseñado para aplicaciones rutinarias repetitivas, así como para otras aplicaciones más avanzadas. Se trata de un instrumento de doble haz equipado con una potente lámpara de xenón pulsante, altamente focalizada. La lámpara maximiza la cantidad de luz que atraviesa la muestra, garantizando unos resultados fotométricos de alta calidad. Por lo tanto, el espectrofotómetro UV-vis Cary 60 es idóneo para medir pequeños volúmenes de muestra de forma exacta y reproducible. La lámpara de xenón pulsante solo ilumina la muestra cuando se adquieren datos protegiendo las muestras sensibles de la fotodegradación y reduciendo el consumo eléctrico. Asimismo, el espectrofotómetro UV-vis Cary 60 es inmune a los efectos distorsionadores de la luz ambiental. La inmunidad del espectrofotómetro UV-vis Cary 60 frente a la luz ambiental posibilita que pueda funcionar con el compartimento de muestras abierto, permitiendo un fácil acceso y reduciendo el riesgo de que los datos se vean afectados debido a errores de manipulación. En comparación con los métodos existentes, que pueden generar resultados inexactos o no reproducibles debido a las limitaciones de los instrumentos, el espectrofotómetro UV-vis Cary 60 de alto rendimiento proporciona datos de mayor calidad.



Figura 1. El espectrofotómetro UV-vis Agilent Cary 60.

Hacia un laboratorio más sostenible

El espectrofotómetro UV-vis Cary 60 se ha sometido a una auditoría independiente de impacto medioambiental y ha recibido la etiqueta **Accountability, Consistency, and Transparency (ACT)**, verificada por My Green Lab. La etiqueta proporciona información sobre el impacto medioambiental del espectrofotómetro UV-vis Cary 60 durante toda su vida útil (Figura 2).

El espectrofotómetro UV-vis Cary 60 mejora el impacto medioambiental de los laboratorios sin que ello afecte a la productividad o al progreso científico.

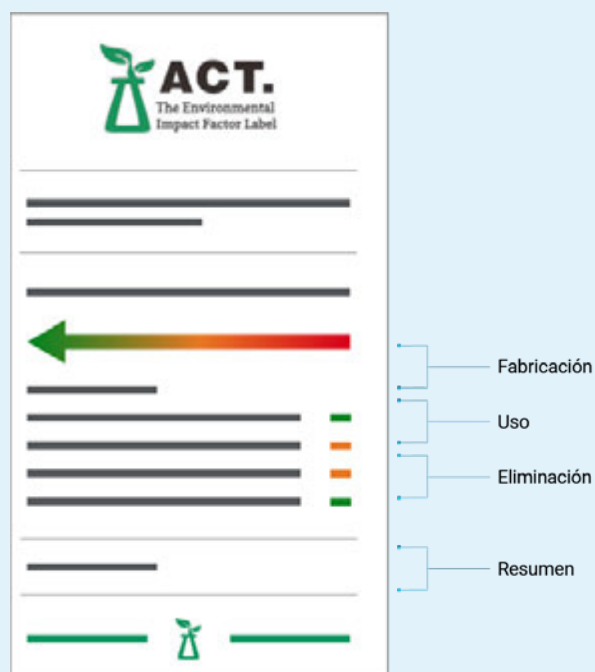


Figura 2. La etiqueta ACT facilita información sobre el impacto medioambiental de la fabricación, el uso y la eliminación de un producto y su embalaje.

En una medida típica de absorbancia, la celda de ultramicrovolumen TrayCell 2.0 (número de referencia G6871C) se coloca en el soporte para celdas estándar del espectrofotómetro UV-vis Cary 60. La celda TrayCell 2.0 se puede equipar con tapones intercambiables con cuatro longitudes de paso diferentes: 2,0 (número de referencia G6871-68005), 1,0 (número de referencia G6871-68004), 0,2 (número de referencia G6871-68003) y 0,1 mm (número de referencia G6871-68002), que proporcionan un amplio intervalo analítico. Se pipetea una alícuota ultramicrovolumétrica de la muestra (entre 0,7 y 10 μl , en función de la longitud de paso) en la ventana de medida de la celda TrayCell 2.0; además, se coloca en la parte superior el tapón correspondiente con la longitud de paso seleccionada. El haz de luz altamente focalizado del espectrofotómetro UV-vis Cary 60 se hace pasar a través de la muestra mediante fibra óptica en la celda TrayCell 2.0 (Figura 3). A continuación, el haz de luz se refleja en el espejo del tapón y se dirige hacia el detector del espectrofotómetro, volviendo a atravesar la muestra, tal como se muestra en la Figura 4.

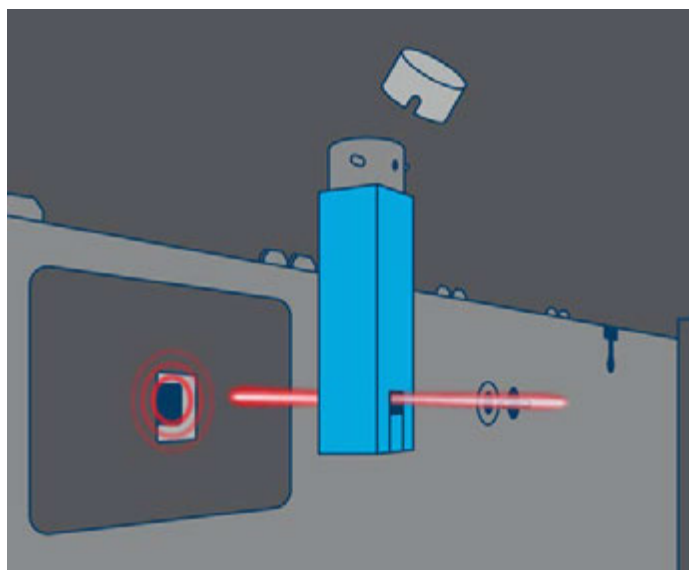


Figura 3. Esquema del espectrofotómetro UV-vis Cary 60 equipado con una celda de ultramicrovolumen TrayCell 2.0 para la medida directa de muestras ultramicrovolumétricas. Representación del haz altamente focalizado del espectrofotómetro UV-vis Cary 60 atravesando la celda TrayCell 2.0.

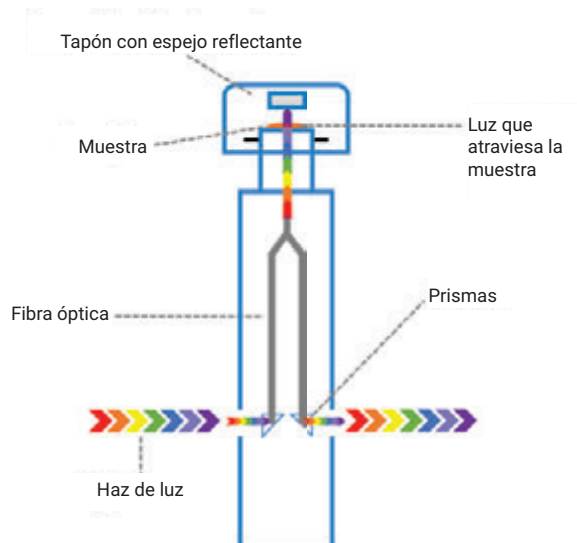


Figura 4. Diseño óptico de la celda de ultramicrovolumen TrayCell 2.0.

Antes de introducir la siguiente muestra en la ventana de medida de la celda TrayCell 2.0, es necesario limpiar la ventana y el espejo del interior del tapón. No es necesario retirar la celda TrayCell 2.0 de su soporte durante la limpieza de la ventana. La precisa separación existente entre la ventana y el espejo del interior del tapón garantiza que la longitud del paso de luz sea exacta y se mantenga constante en todas las medidas.

En este estudio, se usó un espectrofotómetro UV-vis Agilent Cary 60 equipado con una celda de ultramicrovolumen TrayCell 2.0 para medir muestras ultramicrovolumétricas de proteínas y ADN. Se utilizaron tapones con distintas longitudes de paso para la celda TrayCell 2.0 con el fin de reducir la dilución y ampliar el intervalo de concentración medible de la muestra. El rendimiento fotométrico del espectrofotómetro UV-vis Cary 60 con la celda TrayCell 2.0 se probó usando muestras de seroalbúmina bovina (BSA) y ADN de esperma de arenque.

Instrumentos y materiales

- Espectrofotómetro UV-vis Agilent Cary 60
- Celda de ultramicrovolumen TrayCell 2.0
- BSA: para preparar una solución madre de 400 mg/ml, se disolvió una cantidad conocida de BSA (Sigma-Aldrich, CAS 9048-46-8) en solución salina tamponada con fosfato (tampón PBS). Se realizó una dilución en serie de la solución madre para preparar un conjunto de muestras con distintas concentraciones.
- ADN de esperma de arenque: para preparar una solución madre de 5 mg/ml, se disolvió una cantidad conocida de ADN de esperma de arenque (Sigma-Aldrich, CAS 438545-06-3) en tampón PBS. Se realizó una dilución en serie de la solución madre para preparar un conjunto de muestras con distintas concentraciones.

Se depositó un ultramicrovolumen (3 μ l) de la muestra en la ventana de medida con una pipeta, y la adquisición de datos se llevó a cabo mediante el software Agilent Cary WinUV (versión 5.1.3.1042).

Resultados y comentarios

Reproducibilidad fotométrica a concentraciones bajas

Para evaluar el intervalo útil de absorbancia del espectrofotómetro UV-vis Cary 60 equipado con la celda TrayCell 2.0, se midieron muestras con concentraciones altas y bajas. La celda TrayCell 2.0 resulta idónea para las medidas de muestras de volumen limitado con bajas concentraciones, ya que únicamente requiere alícuotas ultramicrovolumétricas de la muestra. Además, el espectrofotómetro UV-vis Cary 60 ofrece una sensibilidad adecuada para medir concentraciones bajas, mientras que muchos espectrofotómetros no alcanzan la sensibilidad necesaria para medir concentraciones inferiores a 25 ng/ μ l. Las capacidades de rendimiento del espectrofotómetro resultan cruciales con estas bajas concentraciones, y es necesario realizar barridos de longitud de onda para garantizar que se observe una curva típica para la muestra. Se realizaron diez réplicas del barrido de longitud de onda para una muestra de 20 ng/ μ l de ADN de esperma de arenque con el espectrofotómetro UV-vis Cary 60 equipado con la celda TrayCell 2.0 con un tapón de 1,0 mm. La absorbancia para esta muestra fue de 0,04, que equivale a 0,4 Abs en una cubeta estándar de 10 mm. Tal como se muestra en la Figura 5, el espectrofotómetro UV-vis Cary 60 generó barridos de longitud de onda altamente reproducibles, lo que es importante para el análisis ultramicrovolumétrico.

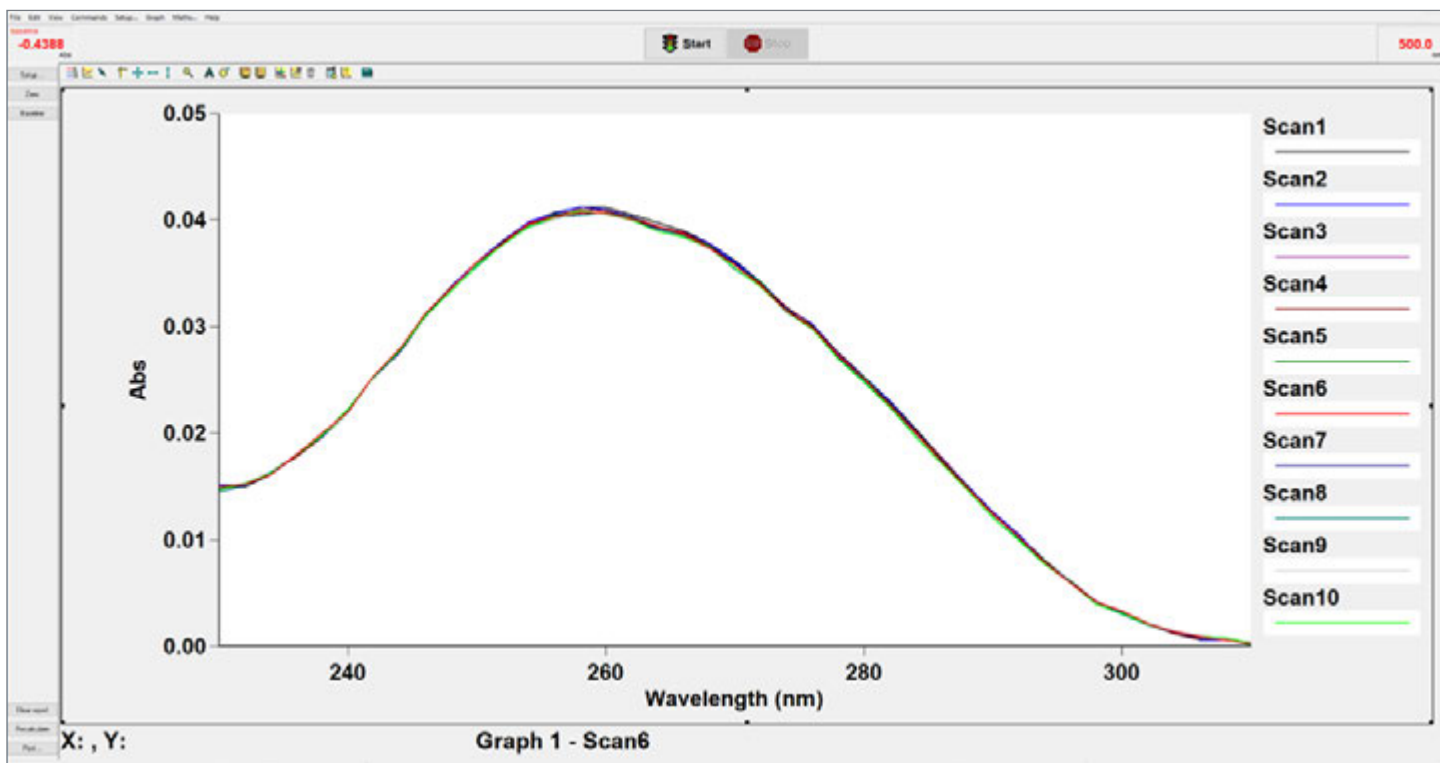


Figura 5. Diez réplicas del barrido de longitud de onda de una muestra de ADN de esperma de arenque (20 ng/ μ l, 0,04 Abs a 260 nm) adquiridas usando el espectrofotómetro UV-vis Cary 60 con la celda de ultramicrovolumen TrayCell 2.0 equipada con un tapón con una longitud de paso de 1,0 mm.

Linealidad fotométrica

Las medidas cuantitativas y cualitativas de ADN de esperma de arenque y BSA se obtuvieron con un espectrofotómetro UV-vis Cary 60 equipado con una celda TrayCell 2.0. El tapón con una longitud de paso de 1,0 mm está diseñado para la medida de volúmenes de muestra en un intervalo de entre 3 y 5 µl, que resulta idóneo para las concentraciones rutinarias de trabajo de ADN, ARN y proteínas.

Medidas de linealidad fotométrica para el ADN de esperma de arenque

Se tomaron medidas de absorbancia de longitud de onda única a 260 nm para las muestras de ADN de esperma de arenque en el intervalo de concentración de 5 a 1.500 ng/µl. Tal como se muestra en la Figura 6, se obtuvo una linealidad fotométrica excelente hasta 2,4 Abs usando la celda TrayCell 2,0 con un tapón con una longitud de paso de 1,0 mm. A 2,4 Abs, la concentración correspondiente de ADN de esperma de arenque fue de 1.500 ng/µl. Se observó una linealidad fotométrica excelente para muestras de ADN con concentraciones extremadamente bajas, de tan solo 5 ng/µl (0,0008 Abs, equivalente a 0,08 Abs), con un tapón de longitud de paso de 1,0 mm (recuadro de la Figura 6).

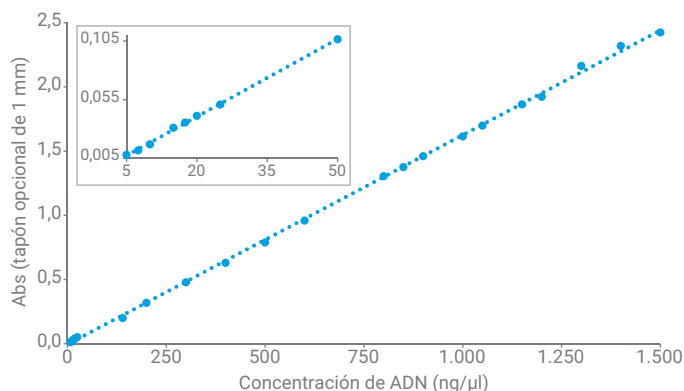


Figura 6. Linealidad fotométrica para muestras de ADN de esperma de arenque con concentraciones de hasta 1.500 ng/µl. El recuadro muestra los resultados obtenidos para muestras con concentraciones bajas de entre 5 y 50 ng/µl.

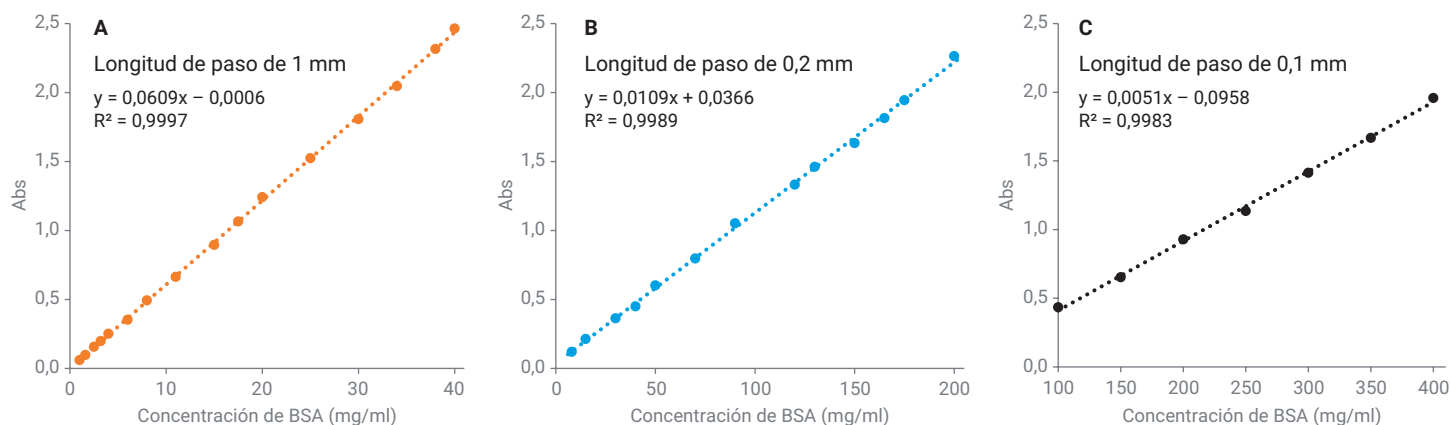


Figura 7. Medidas de linealidad fotométrica obtenidas para concentraciones de BSA de hasta 40 mg/ml usando el tapón con una longitud de paso de 1,0 mm (A); de hasta 200 mg/ml usando el tapón con una longitud de paso de 0,2 mm (B); y de hasta 400 mg/ml usando el tapón con una longitud de paso de 0,1 mm (C).

Medidas de linealidad fotométrica para la BSA

Se obtuvieron medidas de absorbancia de longitud de onda única para la BSA a 280 nm (intervalo de concentración de 1 a 400 mg/ml) con el espectrofotómetro UV-vis Cary 60. Al igual que sucedió para las muestras de ADN de esperma de arenque, se obtuvo una linealidad fotométrica excelente hasta 2,4 Abs usando el tapón con una longitud de paso de 1,0 mm (Figura 7A). A 2,4 Abs, la concentración correspondiente de BSA fue de 40 mg/ml. No obstante, también se analizaron de forma exacta muestras de BSA con concentraciones altas mediante el simple cambio del tapón de la celda TrayCell 2.0 por otros con longitudes de paso más cortas. Se analizaron concentraciones de BSA de hasta 200 mg/ml usando el tapón con una longitud de paso de 0,2 mm (Figura 7B). La absorbancia correspondiente a una concentración de 200 mg/ml de BSA fue de 2,3, que equivale a 115 Abs para una cubeta estándar de 10 mm. Se usó el tapón con la longitud de paso más corta (0,1 mm) que había disponible para la celda TrayCell 2.0 para medir concentraciones de hasta 400 mg/ml (Figura 7C).

Estos resultados demuestran que se puede realizar fácilmente la medida directa de muestras de BSA con concentraciones de hasta 400 mg/ml con el espectrofotómetro UV-vis Cary 60 equipado con una celda TrayCell 2.0 sin tener que realizar diluciones laboriosas y propensas a errores (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de la absorbancia equivalente de la BSA usando longitudes de paso de 1,0, 0,2 y 0,1 mm.

Longitud de paso (mm)	Celda de ultramicrovolumen TrayCell 2.0		
	1,0	0,2	0,1
Concentración máxima medida (mg/ml)	40	200	400
Absorbancia medida	2,4	2,3	2,0
Absorbancia (Abs) equivalente con una cubeta estándar de 10 mm	24	115	200

Nota: La absorbancia equivalente es el valor de absorbancia calculado para una longitud de paso de 10 mm. La ventaja de ser capaz de medir concentraciones de hasta 400 mg/ml es que eso permite analizar directamente soluciones concentradas de proteínas y evita tener que realizar diluciones.

El módulo Concentration (Concentración) del software Cary WinUV agiliza y facilita la adquisición y el análisis de datos

El software Cary WinUV incluye funciones potentes y métodos sencillos para la recogida, el análisis, el almacenamiento y la visualización de datos y, además, reduce la complejidad del proceso. También incluye distintos módulos diseñados para abarcar diversas aplicaciones, como barridos o lecturas cualitativos de longitud de onda, análisis de concentraciones o cinética enzimática, entre muchas otras.

En este estudio, se realizaron barridos completos de longitud de onda usando el módulo **Scan** (Barrido); asimismo, se efectuaron medidas de absorbancia de longitud de onda única con el módulo **Concentration** (Concentración) para obtener medidas de linealidad fotométrica. Para demostrar la validez de la configuración del instrumento y los informes de resultados correspondientes generados por el módulo **Concentration** (Concentración), se realizaron medidas de linealidad fotométrica para muestras de BSA usando un tapón con una longitud de paso de 0,1 mm (esos resultados se muestran en la Figura 7C). La configuración del software Cary WinUV resulta rápida y fácil, y requiere unos pocos pasos sencillos que se indican a continuación y se ilustran en la Figura 8:

- 1) Abra el módulo **Concentration** (Concentración) y haga clic en la pestaña **Setup** (Configuración) para abrir la ventana de configuración del instrumento.
- 2) En la pestaña **Cary**, introduzca la longitud de onda para las medidas de longitud de onda única en la opción **Wavelength** (Longitud de onda) (para la BSA, introduzca 280 nm).
- 3) Introduzca el número de réplicas necesarias para cada patrón usando **Replicates** (Réplicas) o **Sample/Std Averaging** (Promedio de muestras/patrones). En este ejemplo, los datos recogidos para cada solución patrón de BSA correspondieron a la media de tres medidas consecutivas.
- 4) En la sección **Standards** (Patrones), introduzca las concentraciones de las muestras de patrón en orden ascendente y seleccione una opción en el campo **Fit type** (Tipo de ajuste). En este ejemplo, se seleccionó la opción **Linear** (Lineal) en el campo **Fit type** (Tipo de ajuste) con un valor mínimo de R^2 (**Min R²**) de 0,9500.
- 5) Ahora, tanto el software como el instrumento estarán listos para el análisis. Haga clic en el botón **Start** (Iniciar) para iniciar el análisis; después, siga simplemente las instrucciones de carga de patrón/muestra para continuar con el análisis.

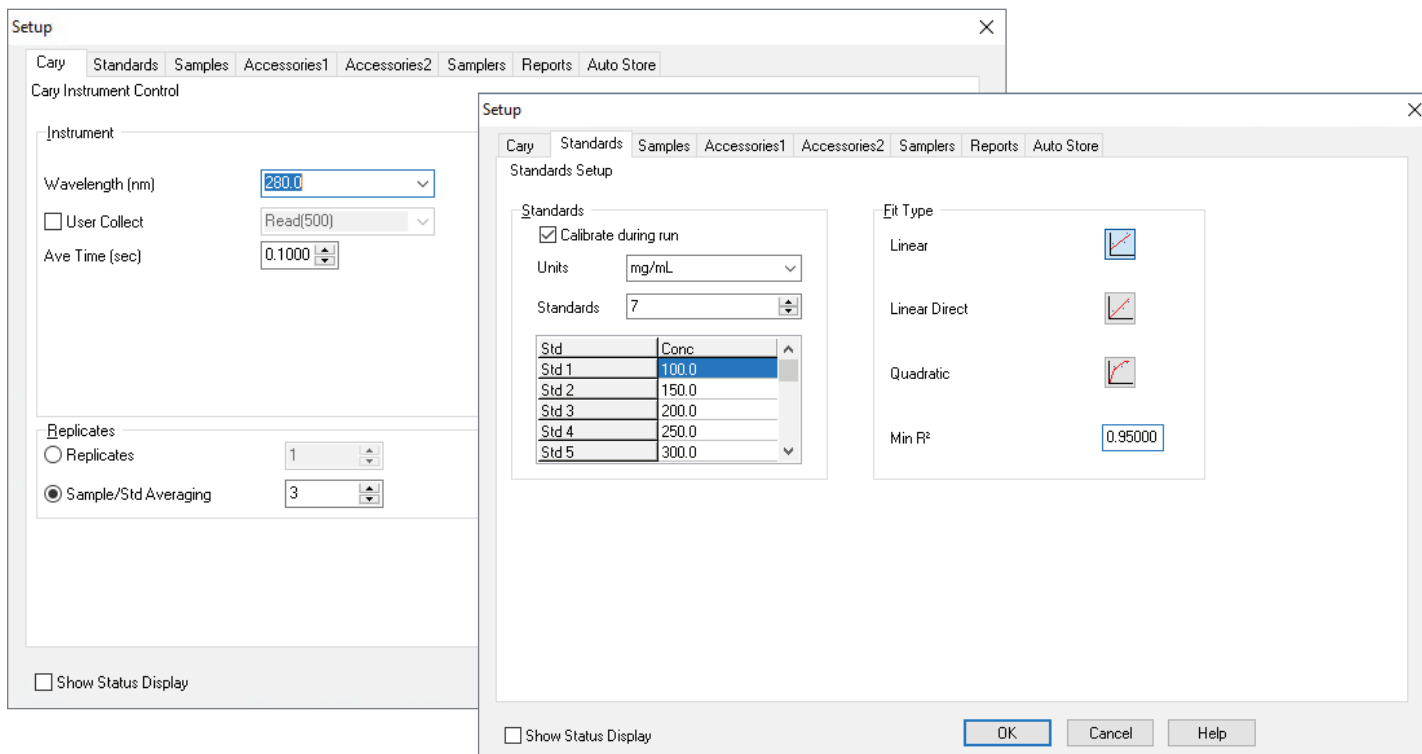


Figura 8. Configuración del instrumento para la adquisición y el análisis de datos mediante el módulo **Concentration** (Concentración) del software Agilent Cary WinUV.

Tras la adquisición de datos, el software genera automáticamente la curva correspondiente de concentración frente a absorbancia (curva de calibración) (Figura 9), lo que reduce la necesidad de laboriosos procedimientos de preparación de datos. La curva de calibración se guarda en el módulo **Concentration** (Concentración). Al analizar una muestra desconocida, el software usa automáticamente la curva de calibración para calcular y registrar la concentración de la muestra.

Limpieza de la celda de ultramicrovolumen TrayCell 2.0

La Figura 10 describe los sencillos pasos necesarios para limpiar y cargar una muestra en la celda TrayCell 2.0. La ventana para la muestra y el tapón se limpian con un bastoncillo o un paño que no dejen pelusa antes de cargar la siguiente muestra con una pipeta. Estos procedimientos eliminan los laboriosos pasos de limpieza asociados habitualmente a las cubetas convencionales y reducen el riesgo de arrastre de muestras.

Solución completamente flexible

Se recomienda usar una cubeta estándar con una longitud de paso de 10 mm para aquellas muestras extremadamente diluidas que no se puedan medir usando los distintos tapones disponibles para la celda TrayCell 2.0. Hay disponibles cubetas estándar con una longitud de paso de 10 mm en un intervalo de volumen entre 40 µl y 3,0 ml.

Para poder realizar una mayor variedad de medidas, el espectrofotómetro UV-vis Cary 60 se puede equipar con celdas con longitudes de paso largas, intercambiadores multicelda automatizados y soportes para cubetas con control de temperatura. Entre los distintos tipos de medidas se incluyen la cuantificación, la automatización del análisis de muestras y el análisis de procesos cinéticos. Los componentes se pueden intercambiar fácilmente, lo que convierte el espectrofotómetro UV-vis Cary 60 en un instrumento de uso muy amplio para medidas rutinarias de muestras biológicas mediante espectroscopia UV-vis.

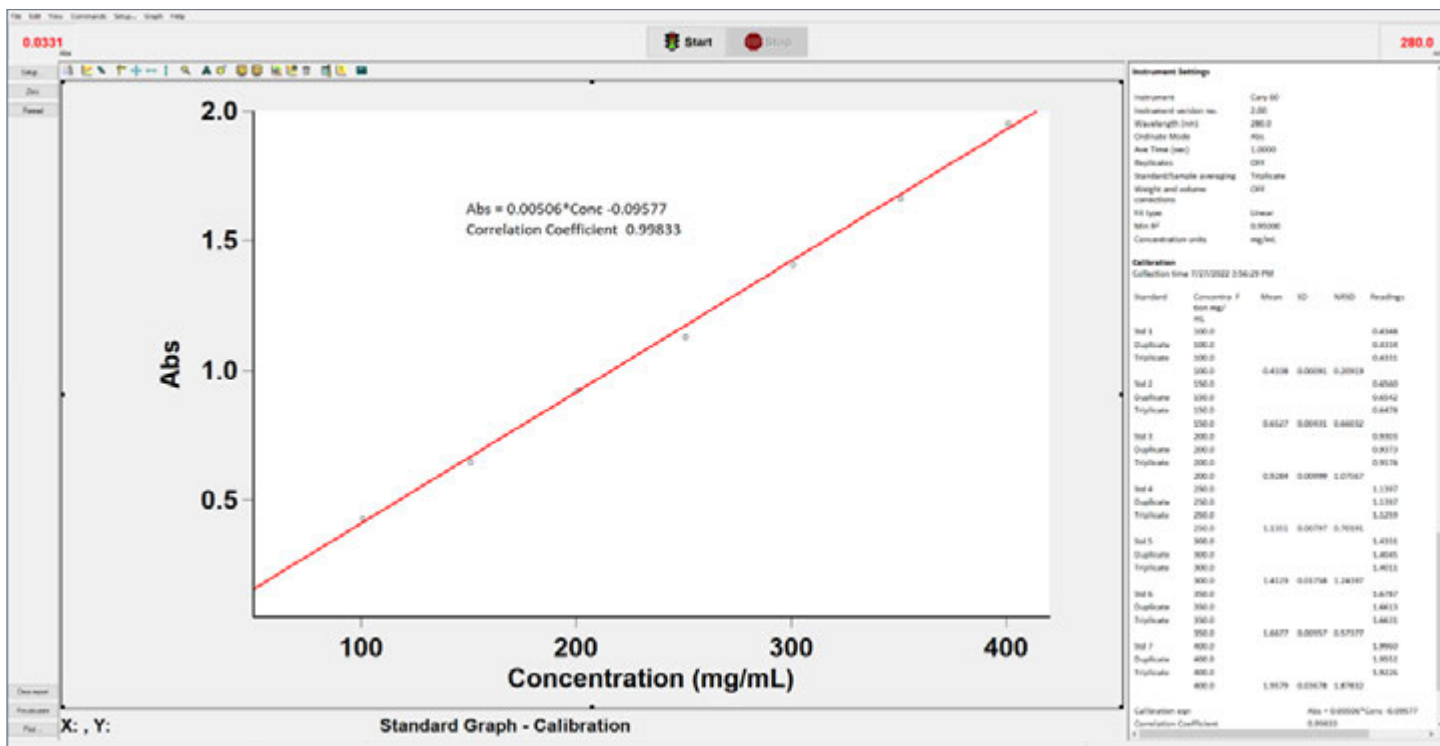


Figura 9. Curva de calibración e informe de análisis de concentraciones generado automáticamente por el software Agilent Cary WinUV para la BSA usando la celda TrayCell 2.0 con un tapón con una longitud de paso de 0,1 mm. Es el mismo gráfico que aparece en la Figura 7C.

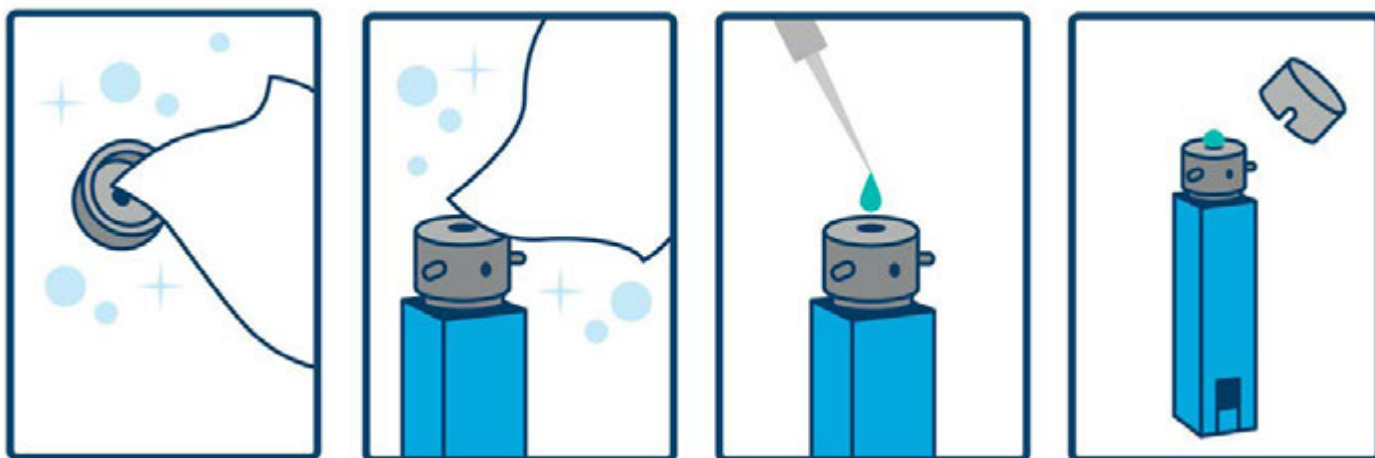


Figura 10. Esquema de la limpieza y la carga de una muestra en la celda TrayCell 2.0.

Conclusión

El espectrofotómetro UV-vis Agilent Cary 60 equipado con la celda de ultramicrovolumen TrayCell 2.0 ofrece una plataforma cómoda y fácil de usar para medir muestras ultramicrovolumétricas, como ácidos nucleicos y proteínas. La realización de barridos cualitativos repetidos de longitud de onda usando una muestra con 20 ng/μl de ADN de esperma de arenque permitió confirmar la sensibilidad y la reproducibilidad del espectrofotómetro UV-vis Cary 60 para el análisis de muestras ultramicrovolumétricas. El uso de cuatro tapones (y, por lo tanto, cuatro longitudes de paso) diferentes para la celda TrayCell 2.0 amplió el intervalo analítico del método y eliminó la necesidad de realizar diluciones tediosas y propensas a errores. Se observó un intervalo lineal fotométrico de entre 5 y 1.500 ng/μl y de entre 1 y 400 mg/ml para las muestras de ADN de esperma de arenque y de BSA, respectivamente. El flujo de trabajo sencillo, la versatilidad y el rendimiento fotométrico del espectrofotómetro UV-vis Cary 60 equipado con la celda TrayCell 2.0 lo convierten en una herramienta adecuada para la medida exacta de ácidos nucleicos y proteínas sin diluir.

Más información

- Espectrofotómetro UV-vis Agilent Cary 60
- Espectrofotómetro UV-vis Agilent Cary 3500
- Herramientas formativas sobre espectroscopia UV-vis
- Guía de selección de instrumentos de espectroscopia UV-vis y UV-vis-NIR
- Resumen de aplicaciones de los espectrofotómetros UV-vis
- Preguntas frecuentes sobre espectroscopia UV-vis

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

DE21781667

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Impreso en EE.UU., 20 de diciembre de 2022
5994-5455ES