

Analyse de concentration d'échantillons en cellule ultramicrovolumique par spectroscopie UV-Vis

Analyse de concentration simple, précise et non destructive à l'aide de l'UV-Vis Agilent Cary 60 et de la TrayCell 2.0



Auteurs

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

Résumé

Un spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 60 équipé d'une cellule ultramicrovolumique TrayCell 2.0 a été utilisé pour l'analyse d'échantillons de protéine et d'acide nucléique. Les mesures non destructives effectuées sur des volumes d'échantillon de l'ordre du microlitre sont avantageuses en termes de préservation et de manipulation des échantillons. En outre, elles rendent inutiles les étapes de dilution fastidieuses et sujettes aux erreurs. Simple et rapide, l'utilisation de la TrayCell 2.0 se traduit par des améliorations du flux de travail.

Introduction

Les laboratoires modernes recherchent de plus en plus des méthodes précises, exactes et simples d'utilisation pour analyser des échantillons tels que l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'ARN et les protéines sans avoir besoin de les diluer. Équipé d'une cellule ultramicrovolumique TrayCell 2.0 munie d'un capuchon de trajet optique adéquat, le **spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 60** est une plateforme pratique et simple d'utilisation pour la mesure directe d'un échantillon en quantité ultramicrovolumique. Les échantillons faiblement et fortement concentrés peuvent être analysés à l'aide respectivement d'un capuchon de court et long trajet optique, garantissant la disponibilité d'une large gamme dynamique. Non destructive, cette méthode permet la récupération d'échantillons de valeur, et la TrayCell 2.0 facile à nettoyer accroît la simplicité d'utilisation de la technique.

Le spectrophotomètre UV-Vis Cary 60 (figure 1) est conçu tant pour les applications de routine répétitives que pour les applications plus avancées. Il s'agit d'un instrument à double faisceau équipé d'une puissante lampe flash au xénon hautement focalisée. Cette lampe optimise la quantité de lumière traversant l'échantillon, garantissant ainsi des résultats photométriques de haute qualité. L'UV-Vis Cary 60 est donc idéal pour mesurer les petits volumes d'échantillon avec exactitude et reproductibilité. La lampe flash au xénon n'éclaire l'échantillon que lors de l'acquisition des données, protégeant ainsi les échantillons sensibles contre la photodégradation et réduisant la consommation électrique. De surcroît, le spectrophotomètre UV-Vis Cary 60 neutralise les effets de distorsion de la lumière ambiante. Grâce à son étanchéité à la lumière extérieure, l'UV-Vis Cary 60 peut être utilisé en gardant le compartiment échantillon ouvert, facilitant l'accès et diminuant le risque de compromettre les données à cause d'erreurs de traitement. Comparé aux méthodes existantes, qui peuvent donner des résultats inexacts ou non reproductibles en raison des limites de l'instrument, l'UV-Vis Cary 60 à haute performance génère des données de meilleure qualité.



Figure 1. Spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 60.

Vers un laboratoire plus durable

L'UV-Vis Cary 60 a fait l'objet d'un audit indépendant quant à son impact environnemental et a reçu le label **ACT (Responsabilité, cohérence et transparence)**, sous le contrôle de My Green Lab. Ce label fournit des informations sur l'impact environnemental qu'exerce l'UV-Vis Cary 60 tout au long de son cycle de vie (figure 2).

L'UV-Vis Cary 60 améliore l'impact environnemental des laboratoires sans pour autant nuire à la productivité et au progrès scientifique.



Figure 2. Le label ACT fournit des informations sur l'impact environnemental de la fabrication, de l'utilisation et de l'élimination d'un produit et de son emballage.

Lors d'une mesure typique d'absorbance, la cellule ultramicrovolumique TrayCell 2.0 (référence G6871C) est placée dans le support de cellule Agilent standard du spectrophotomètre UV-Vis Cary 60. Grâce à ses capuchons interchangeables de quatre trajets optiques différents, à savoir 2,0 (référence G6871-68005), 1,0 (référence G6871-68004), 0,2 (référence G6871-68003) et 0,1 mm (référence G6871-68002), la TrayCell 2.0 offre une large gamme dynamique. Une aliquote ultramicrovolumique d'échantillon (0,7 à 10 μL suivant le trajet optique) est déposée à l'aide d'une pipette sur la fenêtre de mesure de la TrayCell 2.0, puis le capuchon de trajet optique souhaité est apposé dessus. Le faisceau lumineux hautement focalisé de l'UV-Vis Cary 60 est dirigé à travers l'échantillon par l'intermédiaire d'une fibre optique située dans la TrayCell 2.0 (figure 3). Le faisceau lumineux est ensuite réfléchi vers le détecteur du spectrophotomètre par le miroir dans le capuchon, retransversant l'échantillon comme illustré sur la figure 4.

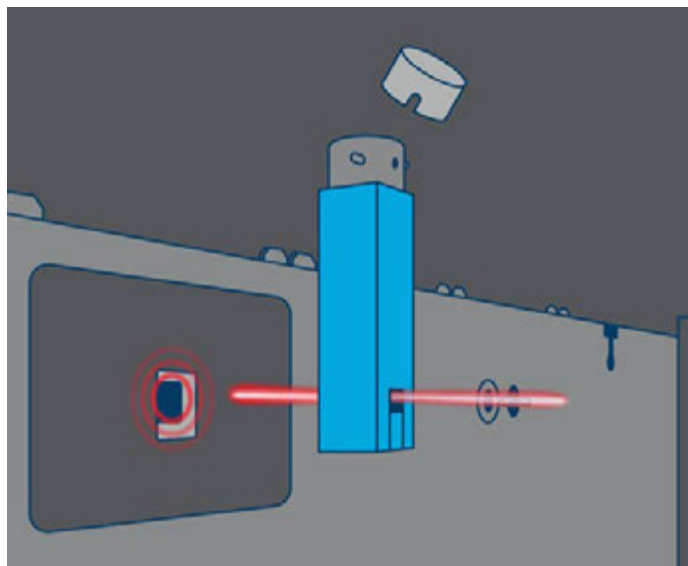


Figure 3. Schéma du spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 60 équipé d'une cellule ultramicrovolumique TrayCell 2.0 pour les mesures directes de quantités ultramicrovolumiques d'échantillons. Représentation du faisceau hautement focalisé de l'UV-Vis Cary 60 traversant la TrayCell 2.0.

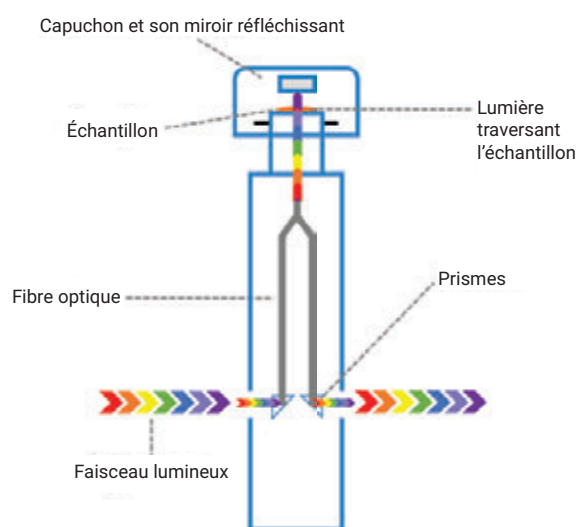


Figure 4. Optique de la cellule ultramicrovolumique TrayCell 2.0.

Avant de déposer l'échantillon suivant sur la fenêtre de mesure de la TrayCell 2.0, il faut nettoyer la fenêtre et le miroir à l'intérieur du capuchon. Il n'est pas nécessaire de retirer la TrayCell 2.0 du support de cellule pour nettoyer la fenêtre. La précision avec laquelle est défini l'espacement entre la fenêtre et le miroir dans le capuchon assure l'exactitude et la cohérence du trajet optique pour chaque mesure.

Dans cette étude, un spectrophotomètre UV-Vis Cary 60 équipé d'une cellule ultramicrovolumique TrayCell 2.0 a été utilisé pour mesurer des échantillons ultramicrovolumiques de protéine et d'acide désoxyribonucléique (ADN). Des capuchons de trajets optiques différents ont été utilisés avec la TrayCell 2.0 pour diminuer la dilution et étendre la gamme de concentrations mesurables de l'échantillon. Les performances photométriques du spectrophotomètre UV-Vis Cary 60 équipé de la TrayCell 2.0 ont été démontrées à l'aide d'échantillons d'albumine de sérum bovin (BSA) et d'acide désoxyribonucléique (ADN) de sperme de hareng.

Instruments et matériel

- Spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 60
- Cellule ultramicrovolumique TrayCell 2.0
- Protéine BSA : pour préparer une solution mère à 400 mg/mL, une quantité de protéine BSA connue (Sigma-Aldrich, numéro CAS 9048-46-8) a été dissoute dans du tampon PBS (solution saline et tampons de phosphate). Une série de dilutions ont été effectuées à partir de cette solution mère pour préparer un jeu d'échantillons à différentes concentrations.
- Acide désoxyribonucléique (ADN) de sperme de hareng : pour préparer une solution mère à 5 mg/mL, une quantité connue d'acide désoxyribonucléique (ADN) de sperme de hareng (Sigma-Aldrich, numéro CAS 438545-06-3) a été dissoute dans du tampon PBS (solution saline et tampons de phosphate). Une série de dilutions a été effectuée à partir de cette solution mère pour préparer un jeu d'échantillons à différentes concentrations.

Un ultramicrovolume (3 μ L) d'échantillon a été déposé sur la fenêtre de mesure à l'aide d'une pipette, et l'acquisition des données a été réalisée à l'aide du logiciel Agilent Cary WinUV version 5.1.3.1042.

Résultats et discussion

Reproductibilité photométrique aux faibles concentrations

Des échantillons fortement et faiblement concentrés ont été mesurés pour évaluer la gamme d'absorbance utilisable du spectrophotomètre UV-Vis Cary 60 équipé de la TrayCell 2.0. La TrayCell 2.0 est idéale pour les mesures à faible concentration d'échantillons en volume limité, car elle n'a besoin que d'aliquotes ultramicrovolumiques d'échantillon. De plus, l'UV-Vis Cary 60 est suffisamment sensible pour mesurer de faibles concentrations, contrairement à de nombreux spectrophotomètres n'ayant pas la sensibilité nécessaire pour mesurer des concentrations inférieures à 25 ng/ μ L. Les performances du spectrophotomètre sont essentielles aux mesures de si faibles concentrations. Il est donc nécessaire d'effectuer des balayages en longueur d'onde pour s'assurer que l'on obtient la courbe typique de l'échantillon. Les données de dix balayages en longueur d'onde répétés avec un échantillon d'acide désoxyribonucléique (ADN) de sperme de hareng à 20 ng/ μ L ont été collectées à l'aide du spectrophotomètre UV-Vis Cary 60 équipé de la TrayCell 2.0, elle-même munie d'un capuchon de 1,0 mm. L'absorbance de cet échantillon est de 0,04, ce qui est équivalent à 0,4 Abs dans une cuve classique de 10 mm. Comme illustré sur la figure 5, les balayages en longueur d'onde de l'UV-Vis Cary 60 étaient hautement reproductibles, ce qui est important pour l'analyse ultramicrovolumique.

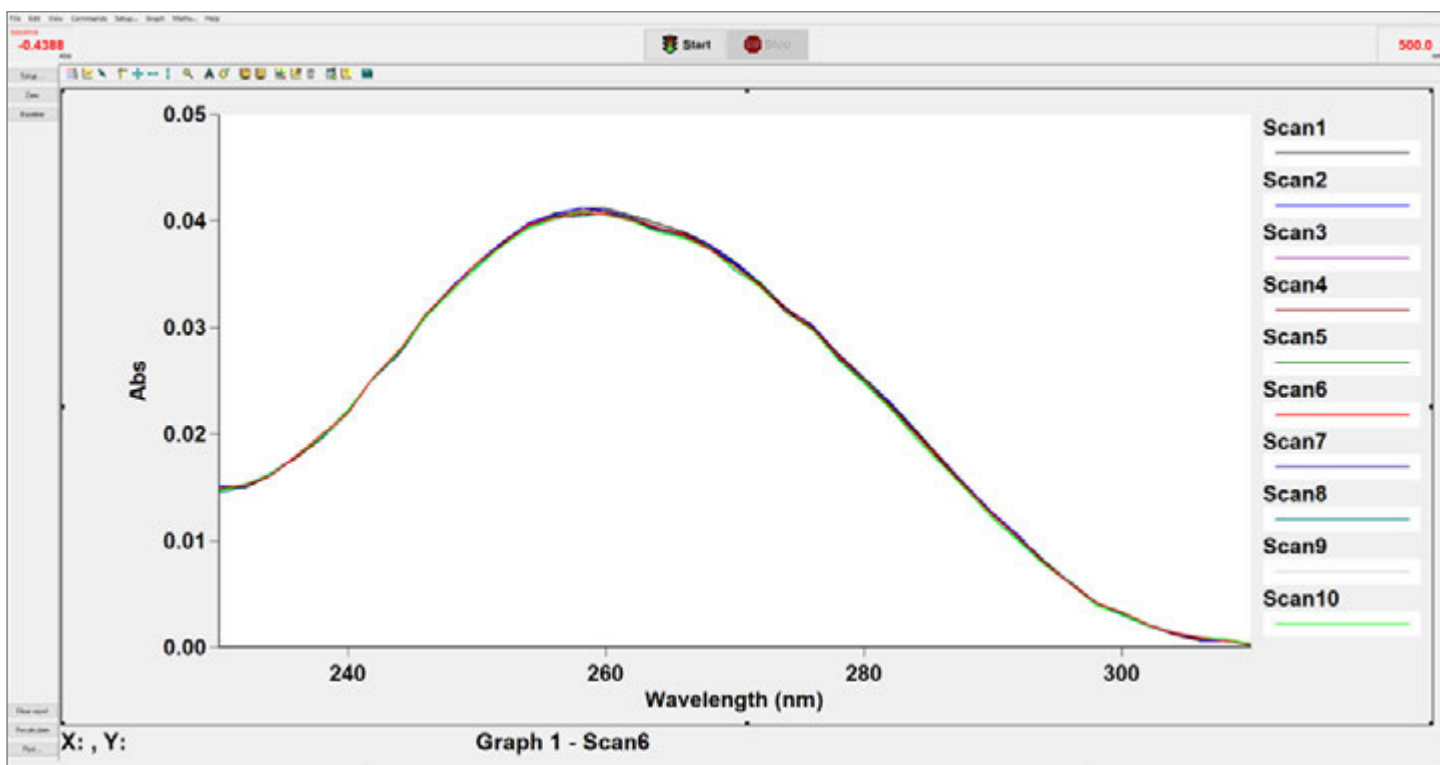


Figure 5. Dix balayages en longueur d'onde répétés d'acide désoxyribonucléique (ADN) de sperme de hareng (20 ng/ μ L, 0,04 Abs à 260 nm) effectués sur le spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 60 équipé de la cellule ultramicrovolumique TrayCell 2.0, elle-même munie d'un capuchon de 1,0 mm de trajet optique.

Linéarité photométrique

Les mesures quantitatives et qualitatives d'acide désoxyribonucléique (ADN) de sperme de hareng et de protéine BSA ont été réalisées à l'aide d'un UV-Vis Cary 60 équipé d'une TrayCell 2.0. Le capuchon de 1,0 mm de trajet optique est conçu pour les mesures de volumes d'échantillon de 3 à 5 µL, ce qui est idéal pour les concentrations de travail couramment utilisées pour l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'ARN et les protéines.

Mesures de linéarité photométrique pour l'acide désoxyribonucléique (ADN) de sperme de hareng

Des mesures d'absorption ont été effectuées sur des échantillons d'acide désoxyribonucléique (ADN) de sperme de hareng à une longueur d'onde fixe de 260 nm dans la gamme de concentration entre 5 et 1 500 ng/µL. Comme l'illustre la figure 6, la linéarité photométrique qui a été obtenue à l'aide de la TrayCell 2.0 et d'un capuchon de 1,0 mm de trajet optique était excellente jusqu'à 2,4 Abs. À 2,4 Abs, la concentration correspondante en acide désoxyribonucléique (ADN) de sperme de hareng était de 1 500 ng/µL. Avec un capuchon de 1,0 mm de trajet optique (encart de la figure 6), une excellente linéarité photométrique a été observée pour des concentrations extrêmement faibles de l'échantillon d'acide désoxyribonucléique (ADN) n'excédant pas 5 ng/µL (0,008 Abs, ce qui est équivalent à 0,08 Abs).

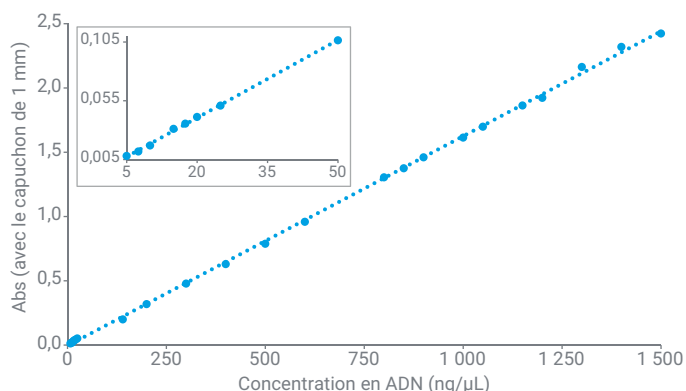


Figure 6. Linéarité photométrique pour des échantillons d'acide désoxyribonucléique (ADN) de sperme de hareng jusqu'à 1 500 ng/µL. L'encart présente les résultats pour des échantillons faiblement concentrés dans une gamme de 5 à 50 ng/µL.

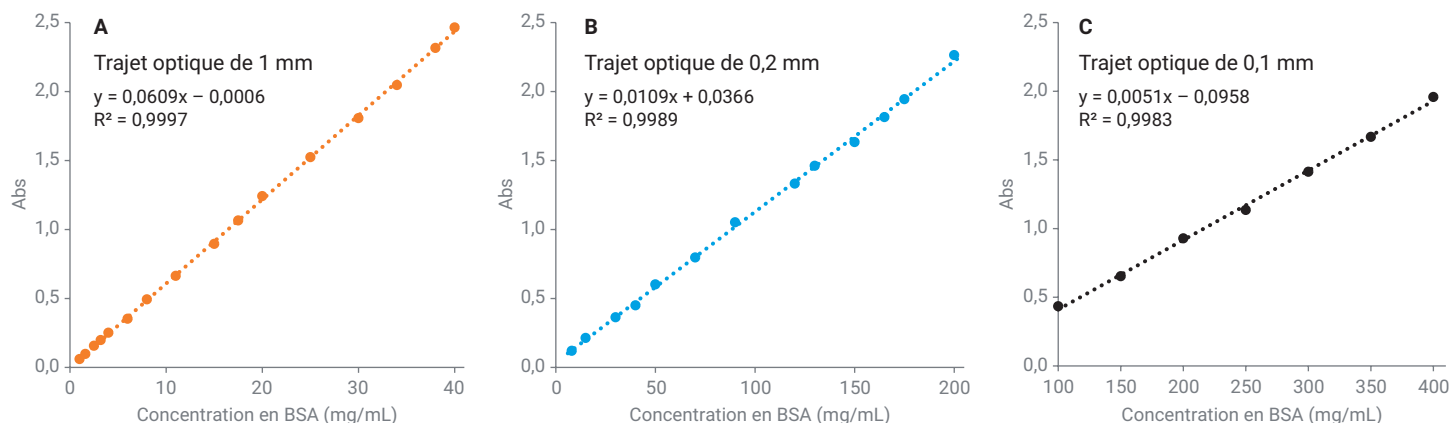


Figure 7. Mesures de linéarité photométrique pour des concentrations de BSA jusqu'à 40 mg/mL réalisées avec le capuchon de 1,0 mm de trajet optique (A), jusqu'à 200 mg/mL avec le capuchon de 0,2 mm de trajet optique (B) et jusqu'à 400 mg/mL avec le capuchon de 0,1 mm de trajet optique (C).

Mesures de linéarité photométrique pour la protéine BSA

Des mesures d'absorption ont été effectuées sur des échantillons de protéine BSA à une longueur d'onde fixe de 280 nm (avec une gamme de concentration entre 1 et 400 mg/mL) à l'aide du spectrophotomètre UV-Vis Cary 60. Comme pour l'échantillon d'ADN de sperme de hareng, une excellente linéarité photométrique a été obtenue jusqu'à 2,4 Abs avec le capuchon de 1,0 mm de trajet optique (figure 7A). À 2,4 Abs, la concentration correspondante en protéine BSA était de 40 mg/mL. Toutefois, les échantillons de protéine BSA fortement concentrés ont pu être analysés avec exactitude en munissant la TrayCell 2.0 de capuchons de trajets optiques plus courts. Des concentrations en protéine BSA d'un maximum de 200 mg/mL ont été analysées à l'aide du capuchon de 0,2 mm de trajet optique (figure 7B). L'absorbance correspondante de la protéine BSA à 200 mg/mL était de 2,3, ce qui est équivalent à 115 Abs pour une cuve classique de 10 mm. Le capuchon de 0,1 mm, qui est celui dont le trajet optique est le plus court parmi les capuchons adaptés à la TrayCell 2.0, a été utilisé pour mesurer des concentrations allant jusqu'à 400 mg/mL (figure 7C).

Ces résultats démontrent qu'un UV-Vis Cary 60 équipé d'une TrayCell 2.0 permet d'effectuer facilement des mesures directes d'échantillons de protéine BSA jusqu'à 400 mg/mL, tout en évitant les dilutions fastidieuses et sujettes aux erreurs (tableau 1).

Tableau 1. Comparaison de l'absorbance équivalente avec l'absorbance de la protéine BSA mesurée pour des trajets optiques de 1,0, 0,2 et 0,1 mm.

	Cellule ultramicrovolumique TrayCell 2.0		
Trajet optique (mm)	1,0	0,2	0,1
Plus forte concentration mesurée (mg/mL)	40	200	400
Absorbance mesurée	2,4	2,3	2,0
Abs équivalente pour une cuve classique de 10 mm	24	115	200

Remarque : l'Abs équivalente est la valeur d'absorbance calculée pour un trajet optique de 10 mm. Le fait de pouvoir mesurer jusqu'à 400 mg/mL présente l'avantage de pouvoir mesurer les solutions protéiques fortement concentrées directement, sans faire de dilutions.

Module Concentration de Cary WinUV pour plus de simplicité et de rapidité dans l'acquisition et le traitement des données

Le logiciel Cary WinUV offre des fonctionnalités efficaces et des méthodes rationalisées pour collecter, traiter, stocker et afficher les données, tout en simplifiant les opérations. Il comprend aussi différents modules conçus pour couvrir une gamme d'applications comme les mesures ou le balayage en longueur d'onde qualitatifs, l'analyse de concentration, la cinétique enzymatique, et bien d'autres encore.

Dans cette étude, des balayages du spectre complet de longueurs d'ondes ont été effectués à l'aide du module **Scan** (Balayage), tandis que les mesures de linéarité photométrique ont été réalisées en tant que mesures d'absorbance à longueur d'onde fixe à l'aide du module **Concentration**. Pour faire la démonstration de la configuration de l'instrument et des rapports de résultats générés par le module **Concentration**, les mesures de linéarité photométrique ont été effectuées pour les échantillons de protéine BSA à l'aide d'un capuchon de 0,1 mm de trajet optique. (Les mêmes résultats sont présentés sur la figure 7C.) La configuration du logiciel Cary WinUV s'effectue de façon rapide et intuitive, et ne nécessite que quelques étapes simples comme illustré sur la figure 8 :

- 1) Ouvrez le module **Concentration** et cliquez sur l'onglet **Setup** (Configuration) pour afficher la fenêtre de configuration de l'instrument.
- 2) Dans l'onglet **Cary**, entrez la longueur d'onde pour les mesures à longueur d'onde fixe dans le champ **Wavelength** (Longueur d'onde) (entrez 280 nm pour la protéine BSA).
- 3) Entrez le nombre de répliques nécessaires pour chaque étalon à l'aide de **Replicates** (Répliques) ou **Sample/Std Averaging** (Moyenne des échantillons/étalons). Dans cet exemple, les données ont été collectées pour chaque solution étalon de BSA sous la forme d'une moyenne de trois mesures consécutives.
- 4) Dans l'onglet **Standards** (Étalons), entrez les concentrations d'échantillons étalons dans l'ordre croissant et sélectionnez le **Fit type** (Type d'ajustement). Dans cet exemple, le **Fit type** (Type d'ajustement) sélectionné était **Linear** (Linéaire) avec un R² minimal (**Min R²**) de 0,9500.
- 5) Le logiciel et l'instrument sont alors prêts pour l'analyse. Cliquez sur le bouton **Start** (Démarrer) pour démarrer l'analyse et suivez simplement les instructions de chargement d'étalon/échantillon pour continuer.

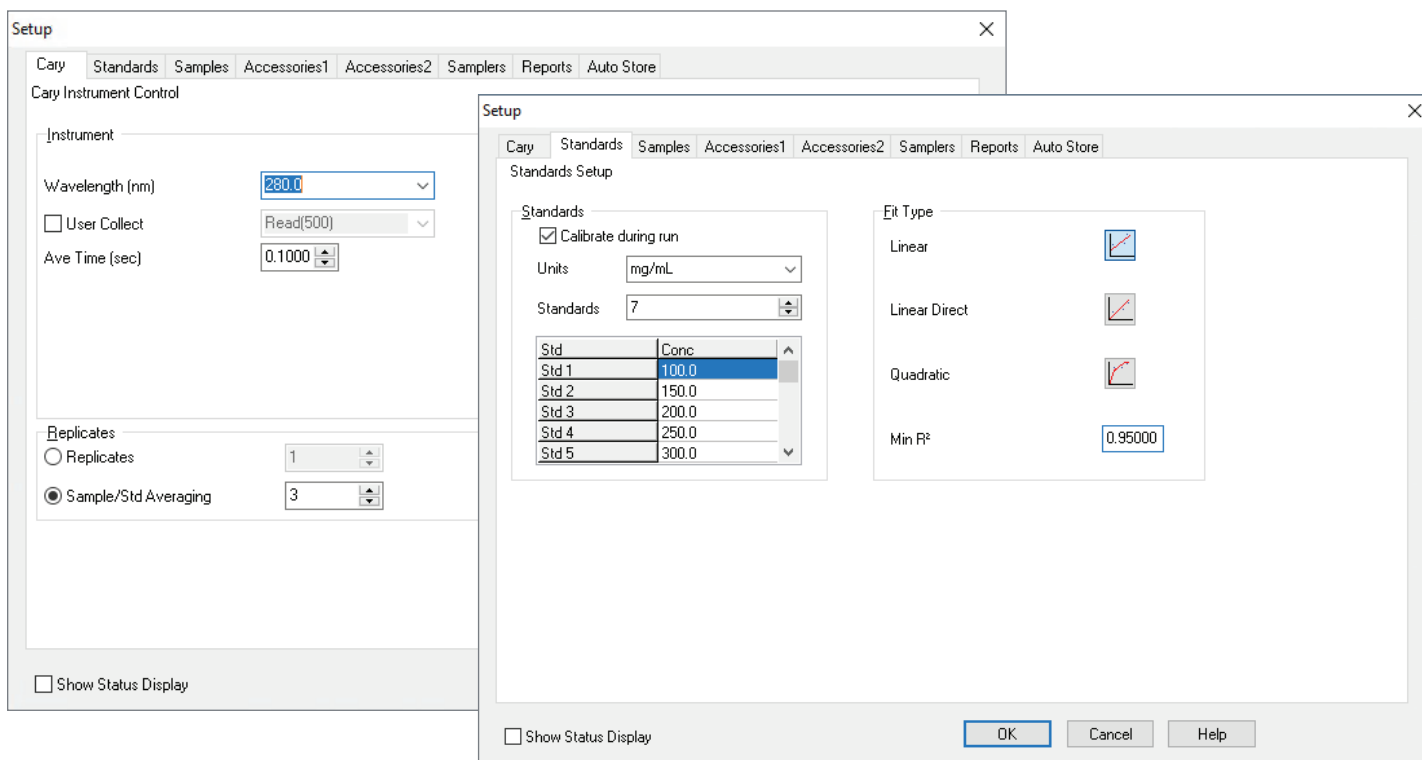


Figure 8. Configuration de l'instrument pour l'acquisition et le traitement des données effectuée à l'aide du module **Concentration** dans le logiciel Agilent Cary WinUV.

Après l'acquisition des données, le logiciel (figure 9) génère automatiquement un graphique représentant la concentration correspondante en fonction de l'absorbance (courbe d'étalonnage combinée), simplifiant les étapes chronophages de traitement des données. La courbe d'étalonnage combinée est enregistrée dans le module **Concentration**. Lors de l'analyse d'un échantillon inconnu, le logiciel utilise automatiquement la courbe d'étalonnage combinée pour calculer et rapporter la concentration de l'échantillon.

Nettoyage de la cellule ultramicrovolumique TrayCell 2.0

La figure 10 illustre les étapes simples qu'il faut suivre pour nettoyer la TrayCell 2.0 et y charger un échantillon. La fenêtre de mesure et le capuchon sont essuyés avec un écouvillon ou chiffon non pelucheux et l'échantillon suivant est déposé à l'aide d'une pipette. Ces procédures éliminent les étapes de nettoyage chronophages habituellement nécessaires avec les cuves conventionnelles et diminue le risque de contamination croisée entre les échantillons.

Une solution entièrement flexible

Une cuve classique de 10 mm de trajet optique est recommandée pour les échantillons extrêmement dilués, qui ne peuvent être mesurés à l'aide des différents capuchons disponibles pour la TrayCell 2.0. Les cuves classiques de 10 mm de trajet optique sont disponibles pour une gamme de volumes compris entre 40 µL et 3,0 mL.

Pour effectuer des mesures sur une gamme plus large, le spectrophotomètre UV-Vis Cary 60 peut être équipé de cellules de long trajet optique, de passeurs multicuves automatisés et de porte-cuve à température régulée. La gamme de mesures comprend la quantification, l'automatisation des échantillons ou l'analyse des processus cinétiques. Les composants sont facilement interchangeables, faisant du spectrophotomètre UV-Vis Cary 60 un instrument très utilisé pour les mesures UV-Vis de routine des échantillons biologiques.

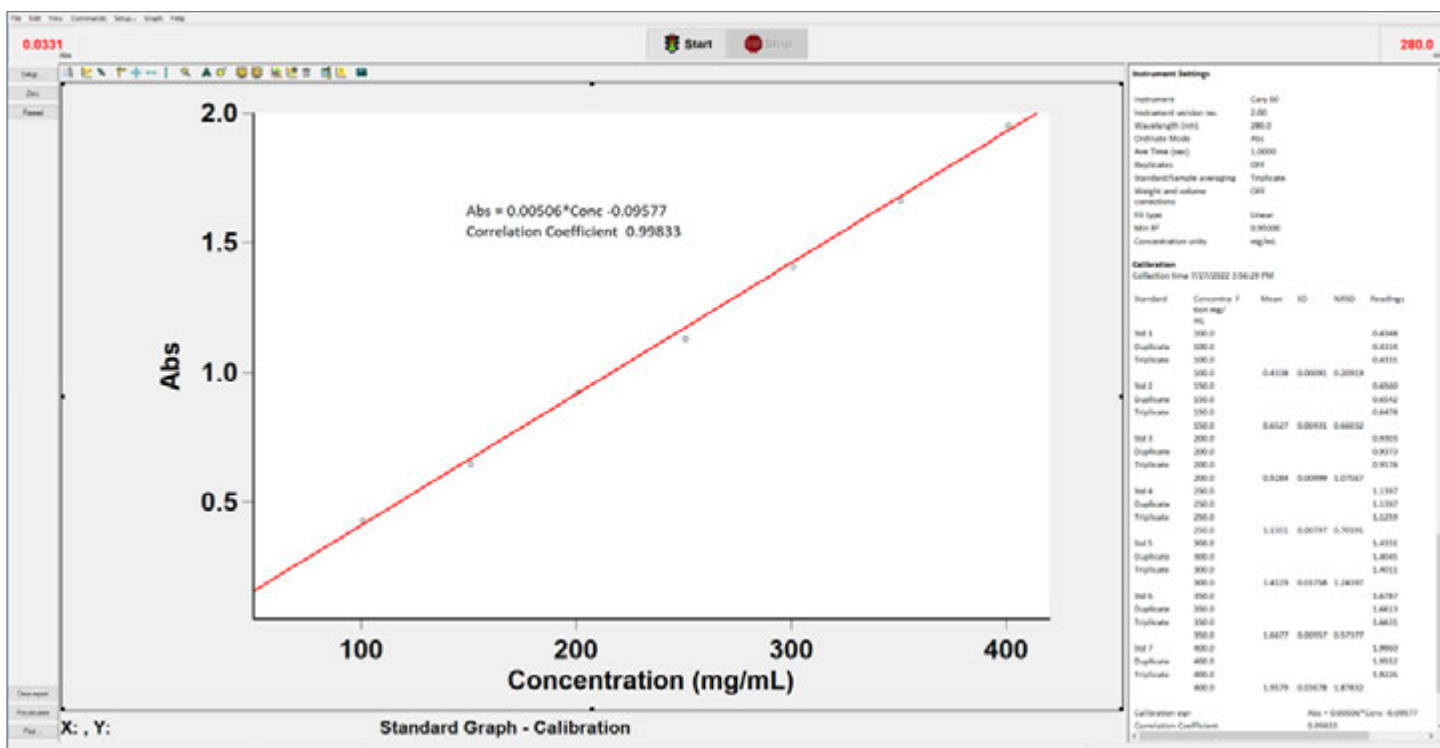


Figure 9. Courbe d'étalonnage combinée et rapport de l'analyse de concentration générés automatiquement par le logiciel Agilent Cary WinUV pour la protéine BSA à l'aide de la TrayCell 2.0 munie d'un capuchon de 0,1 mm de trajet optique. Le même graphique est présenté sur la figure 7C.

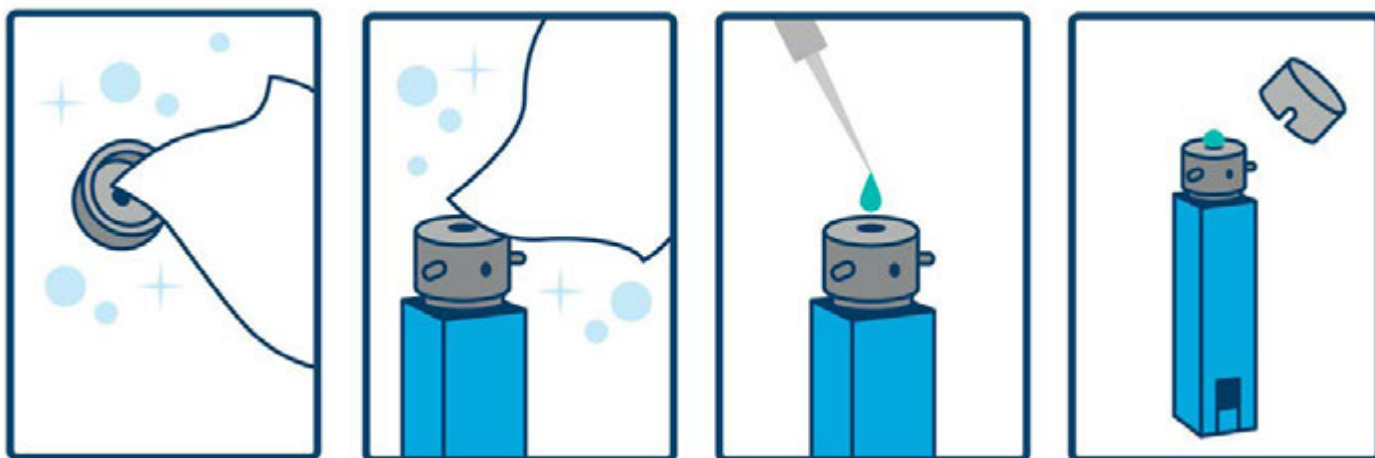


Figure 10. Schéma du nettoyage de la TrayCell 2.0 et du chargement d'un échantillon.

Conclusion

Équipé d'une cuve ultramicrovolumique TrayCell 2.0, le spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 60 constitue une plate-forme pratique et simple d'utilisation pour mesurer les échantillons ultramicrovolumiques tels que les protéines et les acides nucléiques. Les balayages en longueur d'onde qualitatifs répétés d'un échantillon de 20 ng/μL d'acide désoxyribonucléique (ADN) de sperme de hareng ont démontré la sensibilité et la reproductibilité de l'UV-Vis Cary 60 pour l'analyse d'échantillons ultramicrovolumiques. L'utilisation de quatre capuchons différents (et donc de différents trajets optiques) avec la TrayCell 2.0 a permis d'étendre la gamme analytique de la méthode, évitant ainsi la nécessité d'effectuer des dilutions fastidieuses et sujettes aux erreurs. Une gamme photométrique linéaire a été observée pour les échantillons d'acide désoxyribonucléique (ADN) de sperme de hareng et de protéine BSA dans une gamme de 5 à 1 500 ng/μL et de 1 à 400 mg/mL, respectivement. Le flux de travail rationalisé, la polyvalence et les performances photométriques du spectrophotomètre UV-Vis Cary 60 équipé de la TrayCell 2.0 rendent cet instrument adapté aux mesures exactes de protéines et d'acides nucléiques non dilués.

Informations complémentaires (en anglais)

- Spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 60
- Spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500
- Outils pédagogiques sur la spectroscopie UV-visible
- Guide de sélection d'instruments UV-Vis et UV-Vis-PIR
- Présentation des applications des spectrophotomètres UV-Vis
- FAQ sur la spectroscopie UV-Vis

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

DE21781667

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Imprimé aux États-Unis, le 20 décembre 2022
5994-5455FR