

Analisi della concentrazione di campioni di ultra-microvolumi mediante spettroscopia UV-visibile

Analisi della concentrazione semplice, precisa e non distruttiva con il sistema UV-Vis Agilent Cary 60 e TrayCell 2.0



Autori

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

Abstract

Lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 60 munito di cella per ultra-microvolumi TrayCell 2.0 è stato usato per l'analisi di campioni di proteine e acidi nucleici. La misurazione non distruttiva di volumi di campione dell'ordine di microlitri è utile in termini di conservazione e manipolazione dei campioni ed elimina la necessità di eseguire diluizioni noiose e suscettibili di errori. L'uso di TrayCell 2.0 è rapido e facile e determina un miglioramento del flusso di lavoro per gli utilizzatori.

Introduzione

I laboratori moderni sono sempre più alla ricerca di metodi accurati, precisi e facili da usare per analizzare campioni quali DNA, RNA e proteine, senza diluirli. Lo **spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 60** con cella per ultra-microvolumi TrayCell 2.0 munita di un tappo con lunghezza del percorso idonea rappresenta una piattaforma comoda e facile da usare per la misurazione diretta di quantità di campioni dell'ordine di ultra-microvolumi. I campioni ad alta e bassa concentrazione possono essere analizzati usando un tappo con lunghezza del percorso rispettivamente corta e lunga, assicurando un range dinamico ampio. Il metodo non è distruttivo e permette il recupero di campioni preziosi; inoltre, TrayCell 2.0 è facile da pulire, aumentando la fruibilità della tecnica.

Lo spettrofotometro UV-Vis Cary 60 (Figura 1) è progettato per applicazioni ripetitive di routine nonché per applicazioni più avanzate. Si tratta di uno strumento a doppio raggio dotato di una lampada pulsata allo xeno potente e altamente concentrata. La lampada sfrutta al massimo il livello di luce che attraversa il campione, garantendo risultati fotometrici di alta qualità. Il sistema UV-Vis Cary 60 è quindi ideale per misurare piccoli volumi di campione in modo accurato e riproducibile. La lampada pulsata allo xeno illumina il campione solo quando vengono acquisiti i dati, proteggendo i campioni sensibili dalla fotodegradazione e riducendo il consumo energetico. Inoltre, lo spettrofotometro UV-Vis Cary 60 è immune da effetti distorsivi della luce ambientale. L'immunità alla luce ambientale del sistema UV-Vis Cary 60 consente il funzionamento con il vano per i campioni aperto, il che permette un facile accesso e riduce il rischio di compromettere i dati a causa di errori di manipolazione. Rispetto ai metodi esistenti, che possono produrre risultati inaccurati o irripetibili a causa di limitazioni degli strumenti, il sistema UV-Vis Cary 60 ad alte prestazioni fornisce dati di migliore qualità.



Figura 1. Lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 60.

Verso un laboratorio più sostenibile

Il sistema UV-Vis Cary 60 è stato sottoposto ad audit indipendente per l'impatto ambientale e ha ricevuto il **marchio ACT (Accountability, Consistency, Transparency)**, verificato da My Green Lab. Il marchio fornisce informazioni sull'impatto ambientale del sistema UV-Vis Cary 60 durante tutto il suo ciclo di vita (Figura 2).

Il sistema UV-Vis Cary 60 migliora l'impatto ambientale dei laboratori senza ostacolare la produttività o il progresso scientifico.

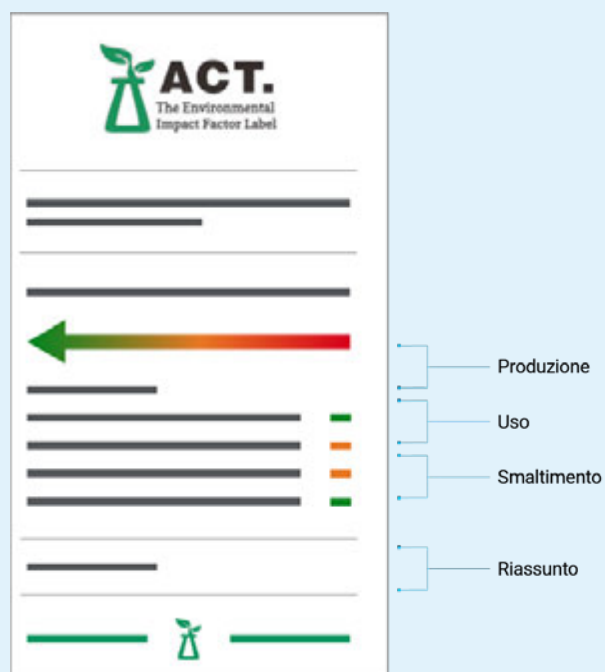


Figura 2. Il marchio ACT fornisce informazioni riguardo all'impatto ambientale della produzione, dell'utilizzo e dello smaltimento di un prodotto, e del suo imballaggio.

In una tipica misurazione dell'assorbanza, la cella per ultra-microvolumi TrayCell 2.0 (codice G6871C) viene posta nel supporto cella standard dello spettrofotometro UV-Vis Cary 60. TrayCell 2.0 può essere munito di tappi intercambiabili con quattro diverse lunghezze del percorso: 2,0 (codice G6871-68005), 1,0 (codice G6871-68004), 0,2 (codice G6871-68003) e 0,1 mm (codice G6871-68002), che forniscono un ampio range dinamico. Un'aliquota di ultra-microvolume del campione (da 0,7 a 1,0 μL , a seconda della lunghezza del percorso) viene pipettata nella finestra di misurazione di TrayCell 2.0 e il tappo corrispondente con la lunghezza del percorso selezionata viene posto al di sopra. Il fascio luminoso altamente concentrato del sistema UV-Vis Cary 60 viene diretto attraverso il campione tramite fibre ottiche in TrayCell 2.0 (Figura 3). Il fascio luminoso viene quindi riflesso dallo specchio contenuto nel tappo verso il rivelatore dello spettrofotometro, ripassando attraverso il campione, come mostrato nella Figura 4.

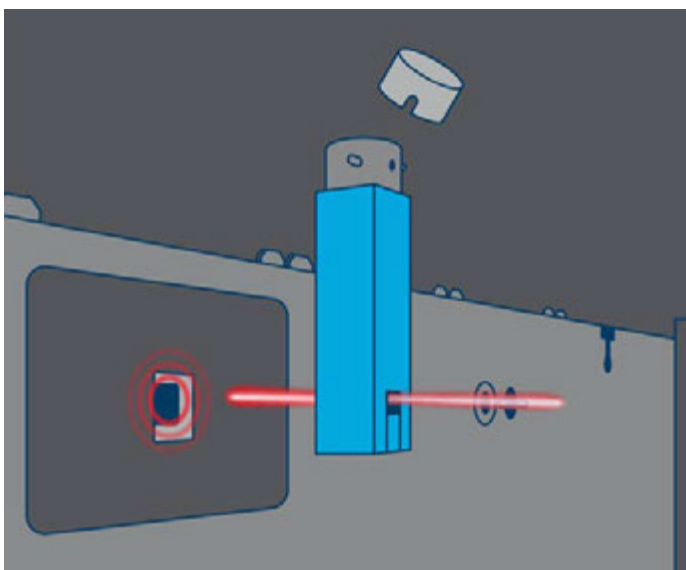


Figura 3. Schema dello spettrofotometro Agilent Cary 60 UV-Vis, munito di cella per ultra-microvolumi TrayCell 2.0 per la misurazione diretta di ultra-microvolumi di campioni. Rappresentazione del fascio altamente concentrato del sistema UV-Vis Cary 60 che attraversa TrayCell 2.0.

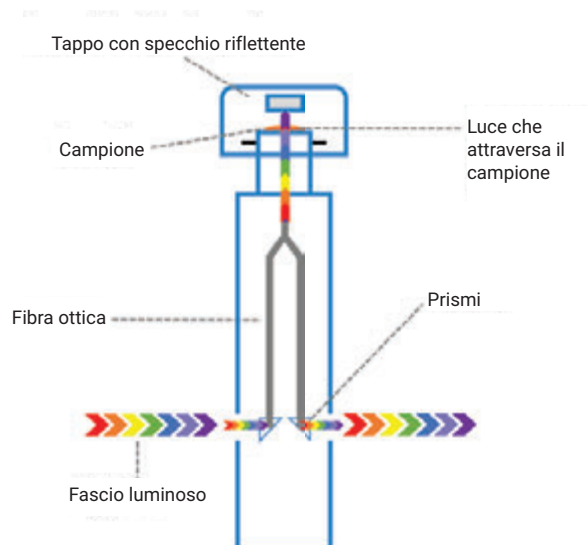


Figura 4. Design ottico della cella per ultra-microvolumi TrayCell 2.0.

Prima che il campione successivo venga introdotto nella finestra di misurazione di TrayCell 2.0, la finestra e lo specchio all'interno del tappo devono essere puliti. Non è necessario rimuovere TrayCell 2.0 dal supporto cella durante la pulizia della finestra. La distanza definita con precisione tra la finestra e lo specchio all'interno del tappo garantisce che la lunghezza del percorso ottico sia accurata e resti costante per ogni misurazione.

In questo studio, lo spettrofotometro UV-Vis Cary 60 munito di cella per ultra-microvolumi TrayCell 2.0 è stato usato per misurare campioni di ultra-microvolumi di proteine e DNA. Tappi con diverse lunghezze del percorso sono stati usati in TrayCell 2.0 per ridurre la diluizione e ampliare l'intervallo di concentrazione misurabile del campione. Le prestazioni fotometriche dello spettrofotometro UV-Vis Cary 60 con TrayCell 2.0 sono state dimostrate usando campioni di albumina sierica bovina (BSA) e di DNA di sperma di aringa.

Strumentazione e materiali

- Spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 60
- Cella per ultra-microvolumi TrayCell 2.0
- BSA: per preparare una soluzione stock da 400 mg/mL, una quantità nota di BSA (Sigma-Aldrich, CAS 9048-46-8) è stata disciolta in tampone PBS (tampone fosfato salino). La soluzione stock è stata diluita in serie per preparare un set di campioni a diverse concentrazioni.
- DNA di sperma di aringa: per preparare una soluzione stock da 5 mg/mL, una quantità nota di DNA di sperma di aringa (Sigma-Aldrich, CAS 438545-06-3) è stata disciolta in tampone PBS. La soluzione stock è stata diluita in serie per preparare un set di campioni a diverse concentrazioni.

Un ultra-microvolume (3 μ L) di campione è stato posto nella finestra di misurazione usando una pipetta e l'acquisizione dei dati è stata effettuata usando il software Agilent Cary WinUV, versione 5.1.3.1042.

Risultati e discussione

Riproducibilità fotometrica a basse concentrazioni

Per valutare l'intervallo di assorbanza utilizzabile dello spettrofotometro UV-Vis Cary 60 con TrayCell 2.0 sono stati misurati campioni a bassa e ad alta concentrazione. Per le misurazioni a bassa concentrazione di campioni di volume limitato, TrayCell 2.0 è ideale in quanto richiede solo aliquote di ultra-microvolumi di campione. Inoltre, il sistema UV-Vis Cary 60 è abbastanza sensibile da misurare concentrazioni basse, mentre molti spettrofotometri non hanno la sensibilità per misurare concentrazioni inferiori a 25 ng/ μ L. Le capacità prestazionali dello spettrofotometro sono fondamentali a queste basse concentrazioni per cui devono essere effettuate scansioni della lunghezza d'onda per garantire che si osservi una tipica curva del campione. Sono state acquisite dieci scansioni delle lunghezze d'onda di un campione di DNA di sperma di aringa di 20 ng/ μ L usando il sistema UV-Vis Cary 60 con TrayCell 2.0 munita di tappo da 1,0 mm. L'assorbanza per questo campione è di 0,04, che è equivalente a 0,4 Abs in una cuvetta standard da 10 mm. Come illustrato nella Figura 5, il sistema UV-Vis Cary 60 ha prodotto scansioni della lunghezza d'onda altamente riproducibili, il che è importante per l'analisi di ultra-microvolumi.

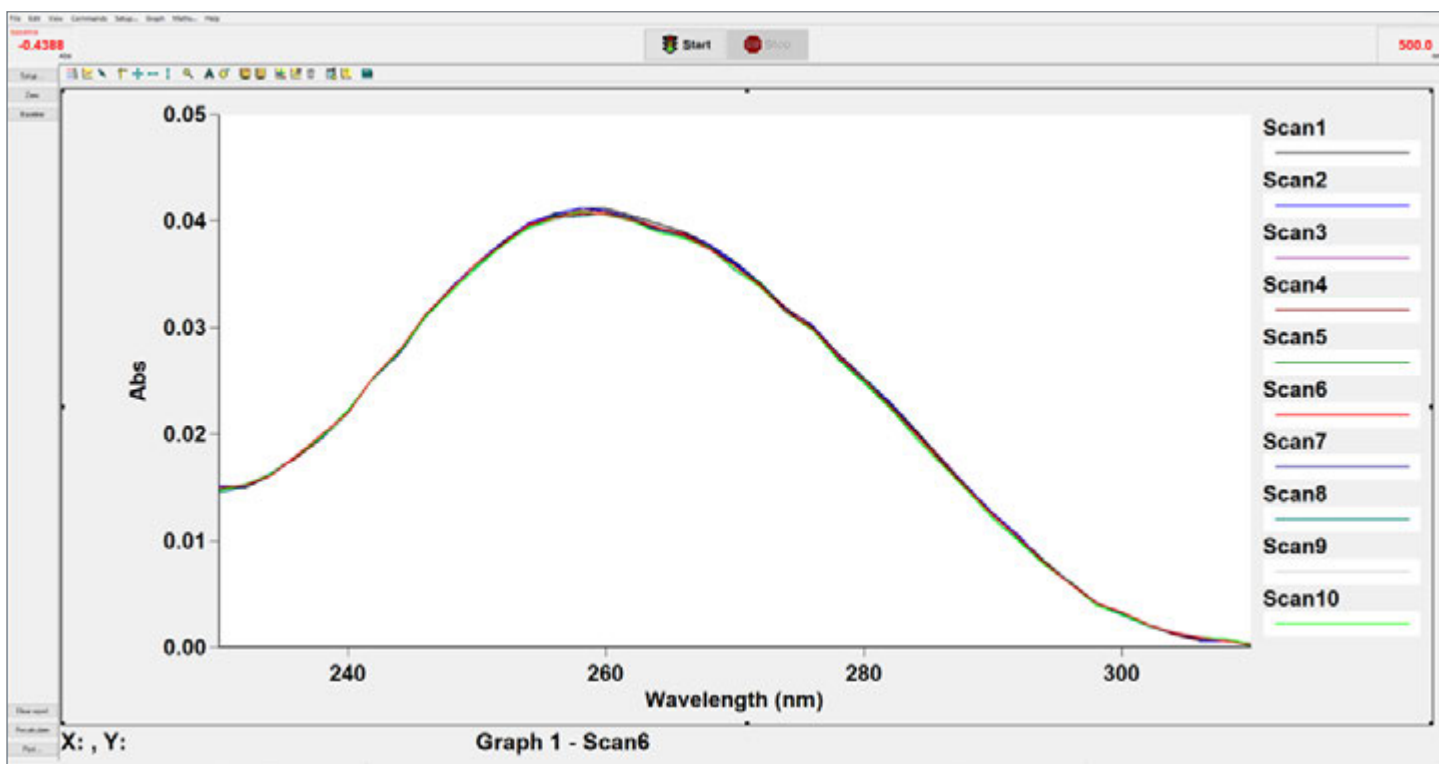


Figura 5. Dieci scansioni ripetute della lunghezza d'onda di DNA di sperma di aringa (20 ng/ μ L, 0,04 Abs a 260 nm) acquisite usando lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 60 con cella per ultra-microvolumi TrayCell 2.0 munita di tappo con lunghezza del percorso di 1,0 mm.

Linearità fotometrica

Le misurazioni quantitative e qualitative del DNA di sperma di aringa e della BSA sono state acquisite usando il sistema UV-Vis Cary 60 munito di TrayCell 2.0. Il tappo con lunghezza del percorso di 1,0 mm è progettato per la misurazione di volumi di campione compresi tra 3 e 5 µL, ideali per le concentrazioni operative di routine di DNA, RNA e proteine.

Misurazioni della linearità fotometrica per il DNA di sperma di aringa

Le misurazioni dell'assorbimento di una singola lunghezza d'onda a 260 nm sono state effettuate per campioni di DNA di sperma di aringa nell'intervallo di concentrazione tra 5 e 1.500 ng/µL. Come mostrato nella Figura 6, è stata ottenuta un'eccellente linearità fotometrica fino a 2,4 Abs usando TrayCell 2.0 munita di tappo con lunghezza del percorso di 1,0 mm. A 2,4 Abs, la concentrazione corrispondente di DNA di sperma di aringa era di 1.500 ng/µL. Un'eccellente linearità fotometrica è stata osservata per concentrazioni estremamente basse del campione di DNA, fino a 5 ng/µL (0,008 Abs, equivalenti a Abs 0,08), con tappo con lunghezza del percorso di 1,0 mm (Figura 6, inserto).

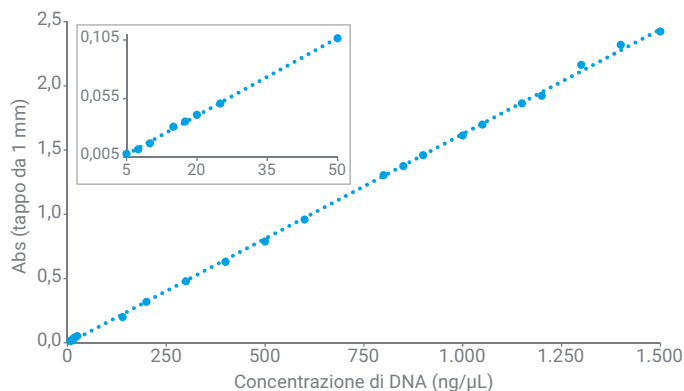


Figura 6. Linearità fotometrica di campioni di DNA di sperma di aringa fino a 1.500 ng/µL. L'inserto mostra i risultati per campioni a bassa concentrazione compresa tra 5 e 50 ng/µL.

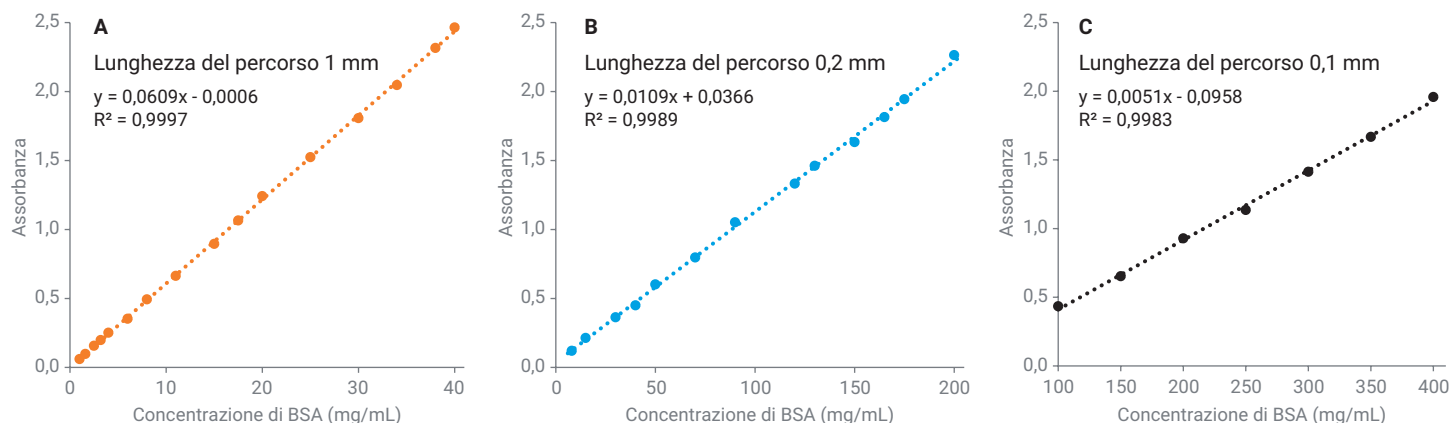


Figura 7. Misurazioni della linearità fotometrica della concentrazione di BSA fino a 40 mg/mL, usando il tappo con lunghezza del percorso di 1,0 mm (A), fino a 200 mg/mL usando il tappo con lunghezza del percorso di 0,2 mm (B) e fino a 400 mg/mL usando il tappo con lunghezza del percorso di 0,1 mm (C).

Misurazioni della linearità fotometrica per la BSA

Le misurazioni dell'assorbimento di una singola lunghezza d'onda per la BSA sono state effettuate a 280 nm (intervallo di concentrazione da 1 a 400 mg/mL) usando lo spettrofotometro UV-Vis Cary 60. Come per il campione di DNA di sperma di aringa, è stata ottenuta un'eccellente linearità fotometrica fino a 2,4 Abs usando il tappo con lunghezza del percorso di 1,0 mm (Figura 7A). A 2,4 Abs, la concentrazione corrispondente della BSA era di 40 mg/mL. Campioni di BSA altamente concentrati sono tuttavia stati analizzati accuratamente cambiando semplicemente il tappo di TrayCell 2.0 con opzioni dotate di una minore lunghezza del percorso. Concentrazioni di BSA fino a 200 mg/mL sono state analizzate usando il tappo con lunghezza del percorso di 0,2 mm (Figura 7B). L'assorbanza corrispondente per la BSA a 200 mg/mL era di 2,3, che equivalgono a 115 Abs per una cuvetta standard da 10 mm. Il tappo con lunghezza del percorso di 0,1 mm, che è la minore disponibile in TrayCell 2.0, è stato usato per misurare concentrazioni fino a 400 mg/mL (Figura 7C).

Questi risultati dimostrano che la misurazione diretta di campioni di BSA fino a 400 mg/mL può essere effettuata facilmente usando il sistema UV-Vis Cary 60 con TrayCell 2.0 senza diluizioni dispendiose in termini di tempo e suscettibili di errori (Tabella 1).

Tabella 1. Confronto dell'assorbanza equivalente per la BSA usando lunghezze del percorso di 1,0, 0,2 e 0,1 mm.

| | Cella per ultra-microvolumi TrayCell 2.0 | | |
|---|--|-----|-----|
| Lunghezza del percorso (mm) | 1,0 | 0,2 | 0,1 |
| Massima concentrazione misurata (mg/mL) | 40 | 200 | 400 |
| Assorbanza misurata | 2,4 | 2,3 | 2,0 |
| Abs equivalente a cuvetta standard da 10 mm | 24 | 115 | 200 |

Nota: L'Abs equivalente è il valore di assorbanza calcolato per una lunghezza del percorso di 10 mm. Il vantaggio di riuscire a misurare fino a 400 mg/mL è che le soluzioni di proteine altamente concentrate possono essere misurate direttamente, eliminando le diluizioni.

Modulo Concentrazione di Cary WinUV per una rapida e semplice acquisizione e analisi dei dati

Il software Cary WinUV include funzioni potenti e metodi semplificati per la raccolta, l'analisi, la conservazione e la visualizzazione di dati, riducendo al contempo la complessità. Include anche diversi moduli progettati per coprire un'ampia gamma di applicazioni tra cui scansione o lettura qualitativa della lunghezza d'onda, analisi della concentrazione, cinetica enzimatica e molto altro.

In questo studio, sono state effettuate scansioni complete della lunghezza d'onda usando il modulo **Scansione**, mentre le misurazioni della linearità fotometrica sono state effettuate come misurazioni dell'assorbanza a singola lunghezza d'onda usando il modulo **Concentrazione**. Per dimostrare la configurazione dello strumento e i relativi rapporti dei risultati generati dal modulo **Concentrazione**, le misurazioni della linearità fotometrica sono state effettuate per i campioni di BSA usando un tappo con lunghezza del percorso di 0,1 mm. (Gli stessi risultati sono mostrati nella Figura 7C). La configurazione del software Cary WinUV è rapida e facile e richiede i pochi semplici passaggi di seguito, illustrati nella Figura 8.

- 1) Aprire il modulo **Concentrazione** e fare clic sulla scheda **Setup (Configurazione)** per aprire la finestra di configurazione dello strumento.
- 2) Nella scheda **Cary**, inserire la lunghezza d'onda per le misurazioni di una singola lunghezza d'onda nell'opzione **Wavelength (Lunghezza d'onda)** (per BSA, inserire 280 nm).
- 3) Inserire il numero di replicati necessari per ogni standard usando **Replicates (Replicati)** o **Sample/Std Averaging (Campione/Media std)**. In questo esempio, i dati sono stati acquisiti per ogni soluzione standard di BSA come media di tre misurazioni consecutive.
- 4) Nella sezione **Standard**, inserire le concentrazioni dei campioni standard in ordine crescente e selezionare il **tipo di Fit (Regressione)**. In questo esempio, il **tipo di Fit (Regressione)** selezionato era **Linear (Lineare)** con R^2 minimo (**Min R²**) di 0,9500.
- 5) Sia il software che lo strumento sono pronti per l'analisi. Fare clic sul pulsante **Start (Avvio)** per avviare l'analisi e seguire semplicemente le istruzioni per il caricamento dello standard/campione per continuare l'analisi.

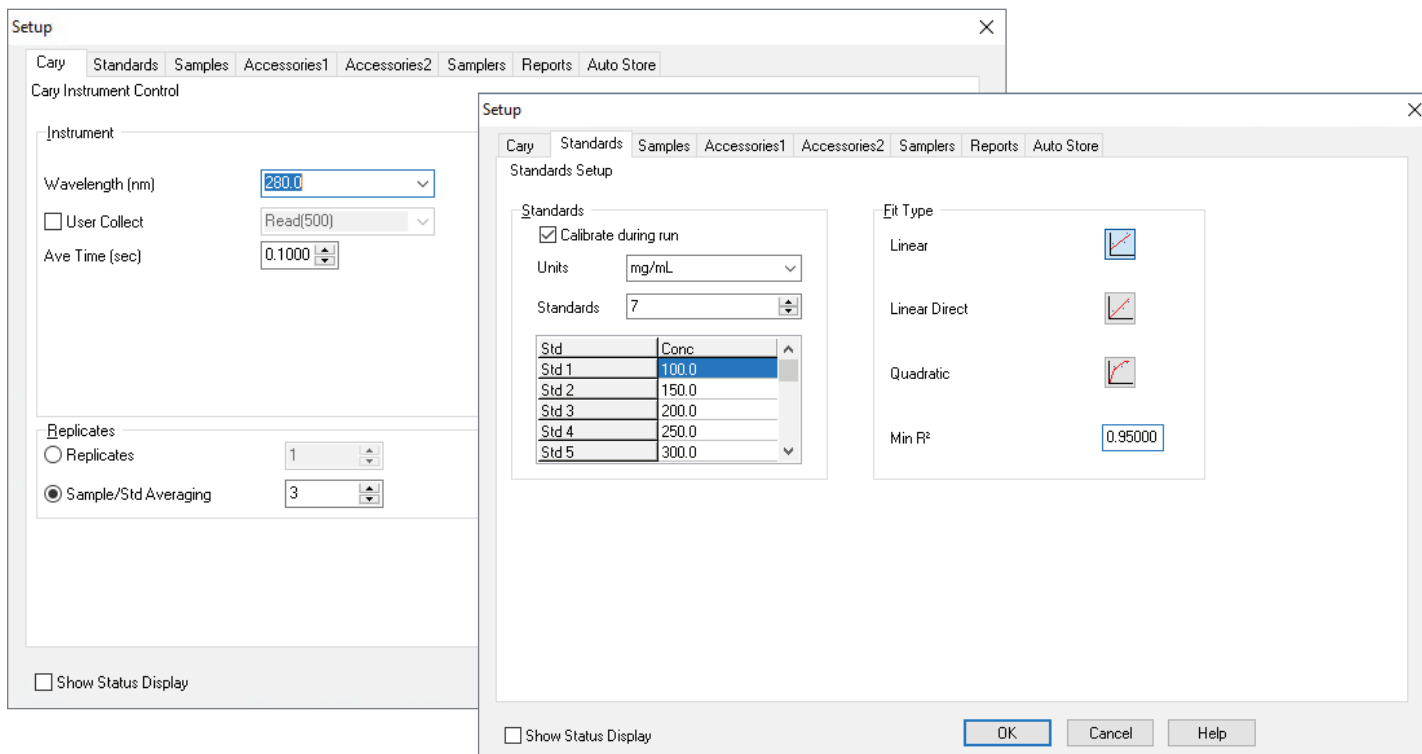


Figura 8. Configurazione dello strumento per l'acquisizione e l'analisi dei dati usando il modulo **Concentrazione** nel software Agilent Cary WinUV.

In seguito all'acquisizione dei dati, il software genera automaticamente il grafico corrispondente della concentrazione rispetto all'assorbanza (curva di calibrazione) (Figura 9), riducendo procedure di controllo dei dati dispendiose in termini di tempo. La curva di calibrazione viene salvata nel modulo **Concentrazione**. Quando si analizza un campione sconosciuto, il software usa automaticamente la curva di calibrazione per calcolare e riportare la concentrazione del campione.

Pulizia della cella per ultra-microvolumi TrayCell 2.0

La Figura 10 indica i semplici passaggi necessari per pulire e caricare un campione in TrayCell 2.0. La finestra del campione e il tappo vengono puliti con un tampone privo di pelucchi o con un panno da laboratorio privo di pelucchi e il campione successivo viene caricato con una pipetta. Queste procedure eliminano i passaggi di pulizia, dispendiosi in termini di tempo, comunemente associati alle cuvette tradizionali e riducono il rischio di carryover del campione.

Soluzione totalmente flessibile

È raccomandato l'uso di una cuvetta standard con lunghezza del percorso di 10 mm per i campioni estremamente diluiti, che non possono essere misurati usando i diversi tappi disponibili con TrayCell 2.0. Le cuvette standard con lunghezza del percorso di 10 mm sono disponibili in diversi volumi, da 40 µL a 3,0 mL.

Per eseguire una gamma più ampia di misurazioni, lo spettrofotometro UV-Vis Cary 60 può essere munito di celle con lunghezza del percorso maggiore, cambiaccelle automatizzato e supporti per cuvette a temperatura controllata. La gamma di misurazioni include quantificazione, automazione del campione e analisi di processi cinetici. I componenti sono facilmente intercambiabili, il che rende lo spettrofotometro UV-Vis Cary 60 uno strumento ampiamente utilizzato per le misurazioni UV-Vis biologiche di routine.

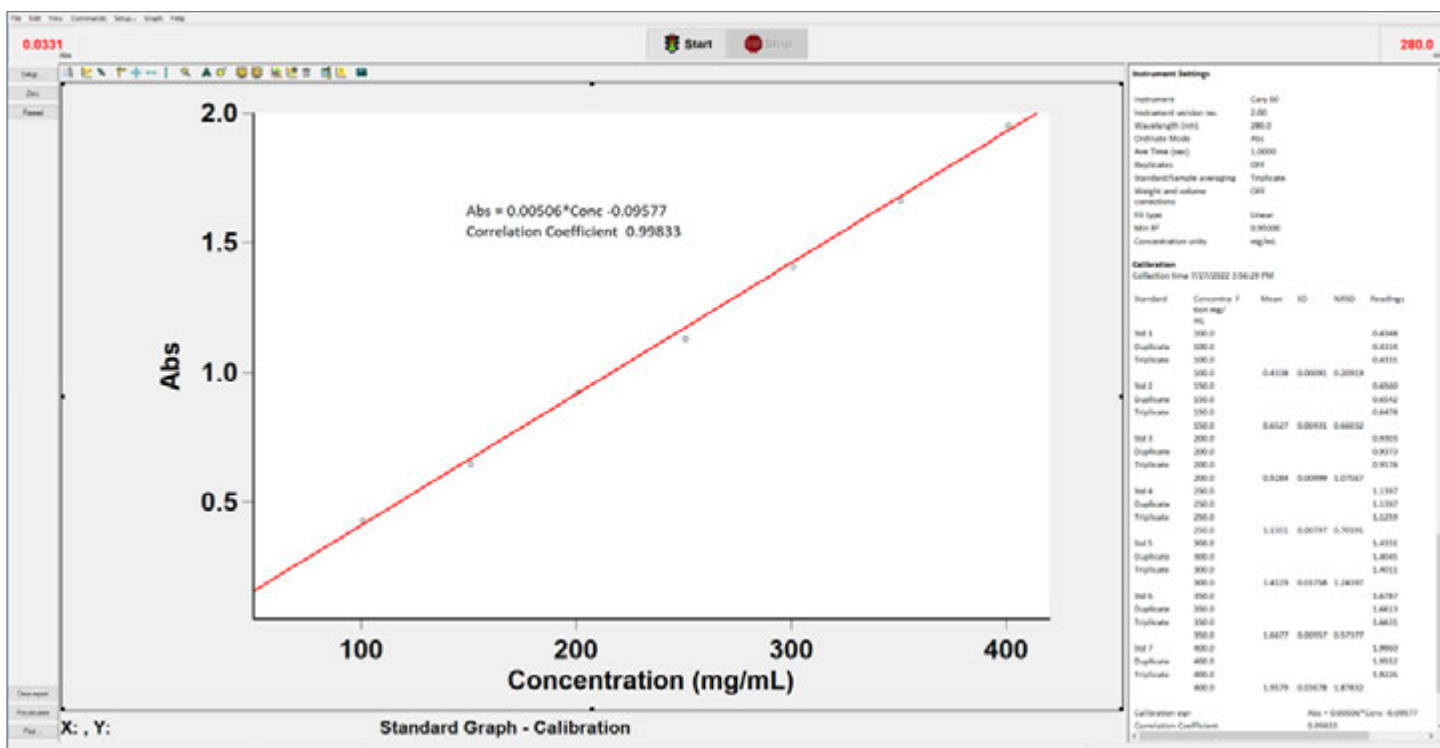


Figura 9. Curva di calibrazione e rapporto di analisi della concentrazione generati automaticamente dal software Agilent Cary WinUV per la BSA usando TrayCell 2.0 con tappo con lunghezza del percorso di 0,1 mm. Lo stesso grafico è mostrato nella Figura 7C.

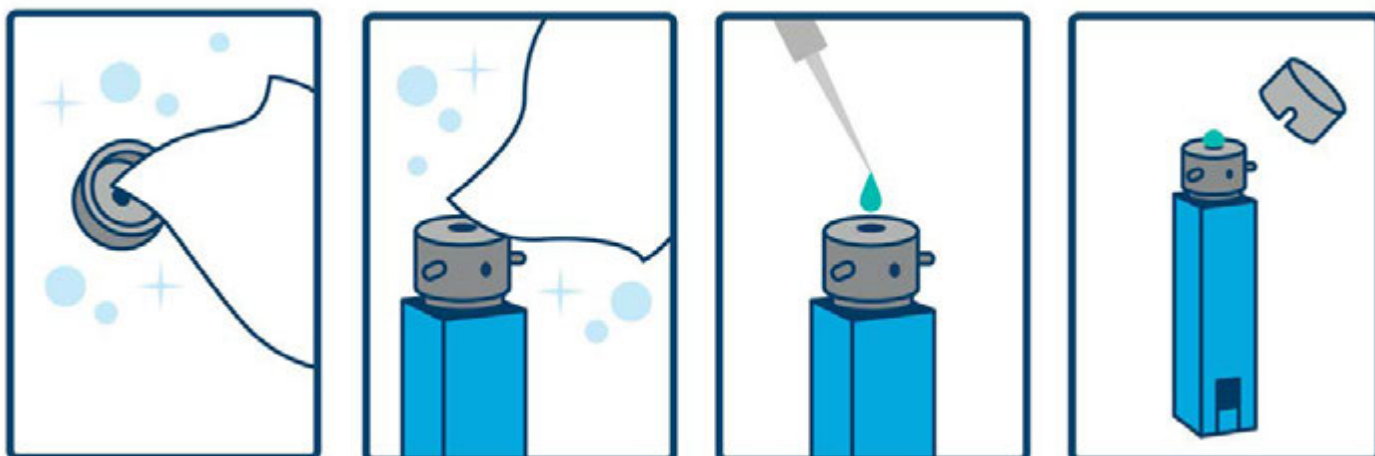


Figura 10. Schema della pulizia e del caricamento di un campione in TrayCell 2.0.

Conclusione

Lo spettrofotometro Agilent Cary 60 UV-Vis munito di cella per ultra-microvolumi TrayCell 2.0 rappresenta una piattaforma comoda e facile da usare per misurare campioni di ultra-microvolumi come acidi nucleici e proteine. Le scansioni ripetute qualitative delle lunghezze d'onda di un campione di DNA di sperma di aringa alla concentrazione di 20 ng/ μ L hanno dimostrato la sensibilità e la riproducibilità del sistema UV-Vis Cary 60 per l'analisi di campioni di ultra-microvolumi. L'uso di quattro diversi tappi per TrayCell 2.0 (e quindi di diverse lunghezze del percorso) ha ampliato il range analitico del metodo, riducendo la necessità di eseguire diluizioni noiose e suscettibili di errori. È stata osservata una gamma fotometrica lineare per i campioni di DNA di sperma di aringa e di BSA nell'intervallo compreso rispettivamente tra 5 e 1.500 ng/ μ L e tra 1 e 400 mg/mL. Il flusso di lavoro semplificato, la versatilità e le prestazioni fotometriche dello spettrofotometro UV-Vis Cary 60 con TrayCell 2.0 lo rendono adatto a misurazioni accurate di acidi nucleici e proteine non diluiti.

Ulteriori informazioni

- Spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 60
- Spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 3500
- Strumenti formativi sulla spettroscopia UV-Vis
- Guida alla selezione degli strumenti UV-Vis e UV-Vis-NIR
- Panoramica delle applicazioni dello spettrofotometro UV-Vis
- Domande frequenti sulla spettroscopia UV-Vis

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

DE21781667

Le informazioni fornite sono soggette a modifica senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Stampato negli Stati Uniti il 20 dicembre 2022
5994-5455ITE