

UV-Vis 분광기를 이용한 초소형 시료의 농도 분석

Agilent Cary 60 UV-Vis 및 TrayCell 2.0을 사용한 간단하고 정밀한 비파괴 농도 분석



저자

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

개요

단백질 및 핵산 시료 분석에는 TrayCell 2.0 Ultra-Microvolume Cell이 장착된 Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계가 사용되었습니다. 마이크로리터 크기의 시료 부피를 비파괴 측정하면 시료 보존, 시료 처리, 지루하고 오류가 발생하기 쉬운 희석 작업의 필요성 제거 측면에서 이점을 얻을 수 있습니다. TrayCell 2.0을 빠르고 쉽게 사용할 수 있어 사용자의 워크플로가 개선됩니다.

서론

현대 실험실은 점점 더 DNA, RNA, 단백질과 같은 시료를 희석하지 않고 분석하기 위해 정확하고 정밀하며 사용하기 쉬운 분석법을 찾고 있습니다. 알맞은 경로 길이 캡이 장착된 TrayCell 2.0 Ultra-Microvolume Cell이 장착된 **Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계**는 초미량 시료의 직접 측정을 위한 편리하고 사용하기 쉬운 플랫폼을 제공합니다. 고농도 및 저농도 시료는 각각 짧은 경로 길이 캡과 긴 경로 길이 캡을 사용하여 분석할 수 있어 넓은 측정 범위를 보장합니다. 이 분석법은 비파괴적이기 때문에 귀중한 시료를 회수할 수 있으며, TrayCell 2.0은 세척이 용이하여 기술의 유용성을 높입니다.

Cary 60 UV-Vis 분광 광도계(그림 1)는 반복적이고 일상적인 응용 분야뿐만 아니라 고급 응용 분야에도 사용할 수 있도록 설계되었습니다. 강력하고 고도로 집중된 xenon 플래시 램프가 장착된 이중 빔 기기입니다. 이 램프는 시료를 통과하는 빛의 수준을 최대화하여 고품질의 광도 측정 결과를 보장합니다. 따라서 Cary 60 UV-Vis는 소량의 시료를 정확하고 재현성 있게 측정하는데 이상적입니다. Xenon 플래시 램프는 데이터를 수집할 때만 시료에 빛을 조사하기 때문에 민감한 시료가 광분해되지 않도록 보호하고 전력 소비를 줄입니다. 또한 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계는 실내광의 왜곡 효과에 영향을 받지 않습니다. Cary 60 UV-Vis의 실내광에 대한 내성을 통해 시료부가 열려 있는 상태에서 작동할 수 있어 접근이 용이하고 취급 오류로 인한 데이터 손상 위험을 줄일 수 있습니다. 기기의 한계로 인해 부정확하거나 반복할 수 없는 결과를 생성할 수 있는 기존 분석법에 비해 고성능 Cary 60 UV-Vis는 더 나은 품질의 데이터를 제공합니다.



그림 1. Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계.

보다 지속 가능한 실험실을 향해

Cary 60 UV-Vis는 환경에 미치는 영향에 대해 독립적인 감사를 받았으며 My Green Lab에서 검증한 **ACT(책임감, 일관성, 투명도) 라벨**을 획득했습니다. 이 라벨은 전체 수명 주기 동안 Cary 60 UV-Vis가 환경에 미치는 영향에 대한 정보를 제공합니다(그림 2).

Cary 60 UV-Vis는 생산성이나 과학적 진보를 저해하지 않으면서 실험실의 환경에 미치는 영향을 개선합니다.



그림 2. ACT 라벨은 제품을 제조, 사용, 폐기하고 포장하는 과정에서 환경에 미치는 영향에 관한 정보를 제공합니다.

일반적인 흡광도 측정에서는 TrayCell 2.0 Ultra-Microvolume Cell(부품 번호 G6871C)을 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계의 표준 셀 홀더에 놓습니다. TrayCell 2.0은 2.0(부품 번호 G6871-68005), 1.0(부품 번호 G6871-68004), 0.2(부품 번호 G6871-68003), 0.1mm(부품 번호 G6871-68002) 등 네 가지 서로 다른 경로 길이의 교체 가능한 캡을 장착할 수 있어 넓은 측정 범위를 제공합니다. 시료의 초미량 분취액(경로 길이에 따라 0.7~10 μ L)을 TrayCell 2.0의 측정 창에 피펫팅하고 선택한 경로 길이의 해당 캡을 그 위에 놓습니다. Cary 60 UV-Vis의 고도로 집중된 광선은 TrayCell 2.0의 광섬유를 통해 시료를 통과합니다(그림 3). 그런 다음 광선은 캡의 거울에 의해 분광 광도계 검출기로 반사되어 그림 4에 설명된 대로 시료를 다시 통과합니다.

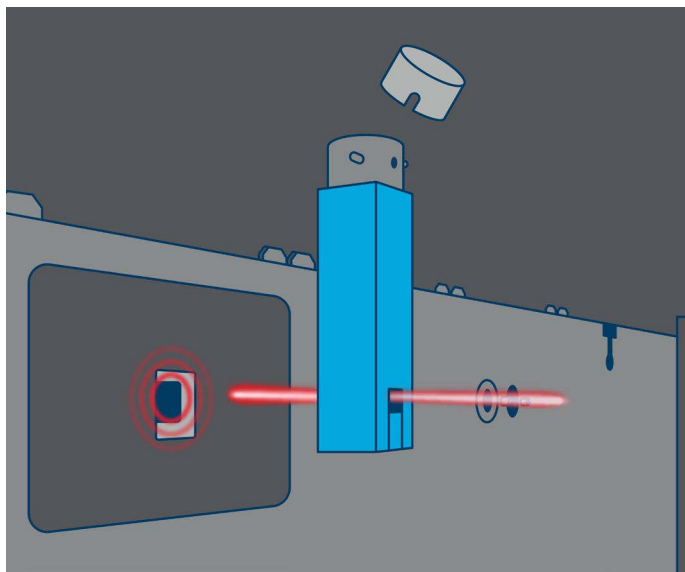


그림 3. 초미량 시료의 직접 측정을 위한 TrayCell 2.0 Ultra-Microvolume Cell이 장착된 Agilent Cary 60 UV Vis 분광 광도계의 개요도. TrayCell 2.0을 통과하는 Cary 60 UV-Vis의 고도로 집중된 빔.

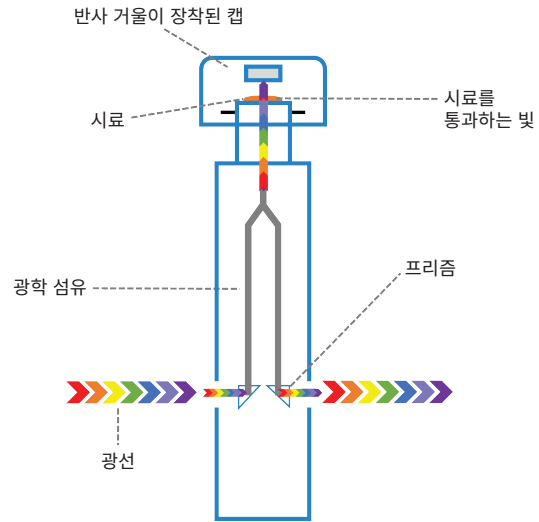


그림 4. TrayCell 2.0 Ultra-Microvolume Cell의 광학 설계.

다음 시료를 TrayCell 2.0의 측정 창에 주입하기 전에 창과 캡 내부의 거울을 세척해야 합니다. 창을 세척하는 동안 TrayCell 2.0을 셀 홀더에서 분리할 필요가 없습니다. 캡 내부의 창과 거울 사이의 간격을 정밀하게 정의하여 광학 경로 길이가 정확하고 모든 측정에서 일정하게 유지되도록 보장합니다.

이 연구에서는 단백질과 DNA의 초미량 샘플을 측정하기 위해 TrayCell 2.0 Ultra-Microvolume Cell이 장착된 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계를 사용했습니다. TrayCell 2.0에 대한 다양한 경로 길이 캡 옵션을 사용하여 희석을 줄이고 시료의 측정 가능한 농도 범위를 확장했습니다. 소 혈청 알부민(BSA) 및 청어 정자 DNA 시료를 사용하여 TrayCell 2.0이 장착된 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계의 광도 측정 성능을 입증했습니다.

기기 및 재료

- Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계
- TrayCell 2.0 Ultra-Microvolume Cell
- BSA 단백질: 400mg/mL의 원액을 전처리하기 위해 알려진 양의 BSA 단백질(Sigma-Aldrich, CAS 9048-46-8)을 PBS 완충액(인산염 완충 식염수)에 용했습니다. 원액을 연속적으로 희석하여 다양한 농도의 시료 세트를 전처리했습니다
- 청어 정자 DNA: 5mg/mL 원액을 전처리하기 위해 알려진 양의 청어 정자 DNA(Sigma-Aldrich, CAS 438545-06-3)를 PBS 완충액에 용해 시켰습니다. 원액을 연속적으로 희석하여 다양한 농도의 시료 세트를 전처리했습니다

피펫을 사용하여 초미량(3 μ L)의 시료를 측정 창에 넣고 Agilent Cary WinUV 소프트웨어 버전 5.1.3.1042를 사용하여 데이터 수집을 수행했습니다.

결과 및 토의

저농도에서의 광도 재현성

TrayCell 2.0이 장착된 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계의 사용 가능한 흡광도 범위를 평가하기 위해 고농도 및 저농도 시료를 모두 측정했습니다. 제한된 부피의 시료에 대한 저농도 측정의 경우 초미량 시료 분취액만 필요한 TrayCell 2.0이 이상적입니다. 또한 많은 분광 광도계가 25ng/ μ L 미만의 농도를 측정할 수 있을 만큼 감도가 높지 않은 반면에, Cary 60 UV-Vis는 저농도도 측정할 수 있을 만큼 감도가 높습니다. 분광 광도계의 성능은 이러한 저농도에서 매우 중요하므로 일반적인 시료 곡선을 관찰하기 위해 파장 스캔을 수행해야 합니다. 1.0mm 캡이 장착된 TrayCell 2.0이 장착된 Cary 60 UV-Vis를 사용하여 20ng/ μ L 청어 정자 DNA 시료의 10회 반복 파장 스캔을 수집했습니다. 이 시료의 흡광도는 0.04이며, 이는 표준 10mm 큐벳에서 0.4Abs에 해당합니다. 그림 5에서 볼 수 있듯이 Cary 60 UV-Vis는 초미량 분석에 중요한 재현성이 높은 파장 스캔을 생성했습니다.

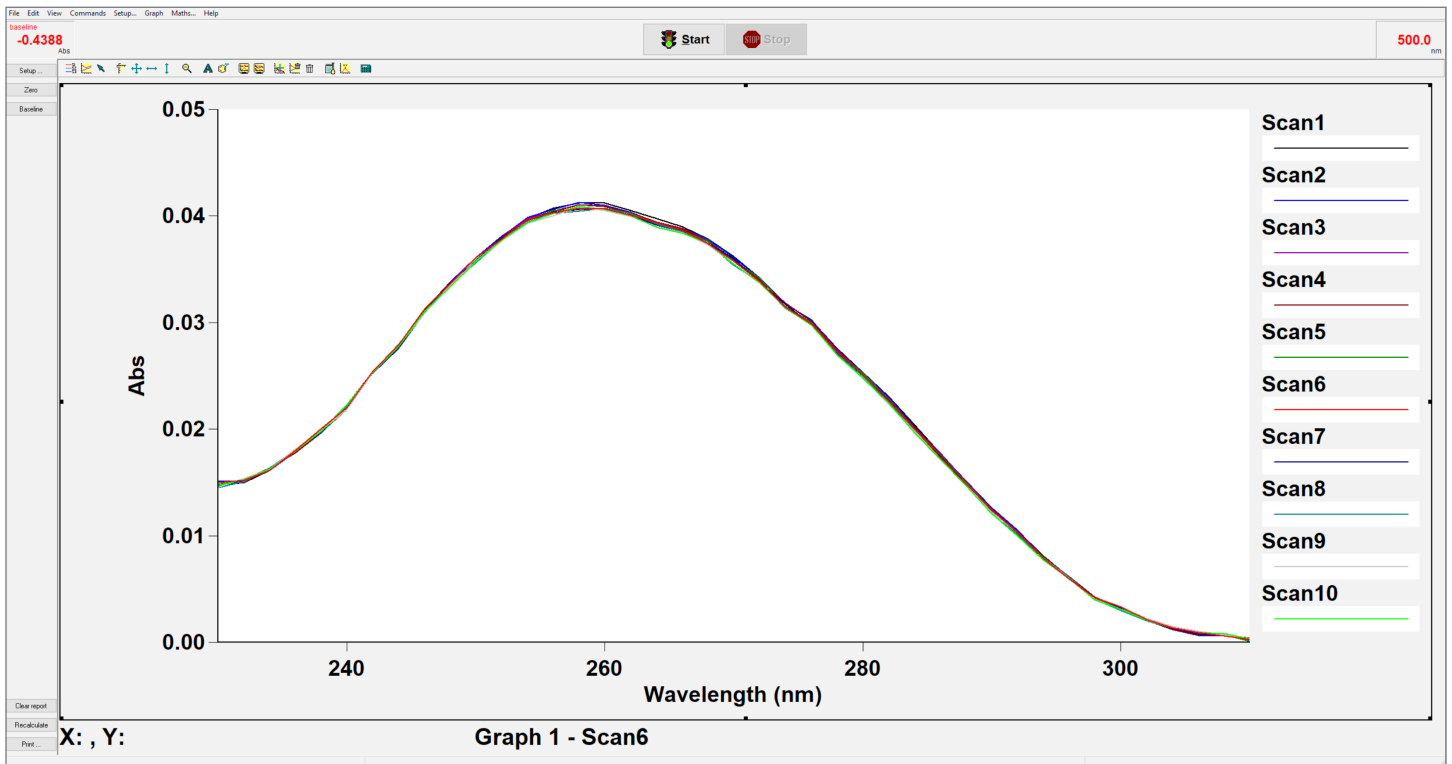


그림 5. 1.0mm 경로 길이 캡이 장착된 TrayCell 2.0 Ultra-Microvolume Cell이 장착된 Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 얻은 청어 정자 DNA(20ng/ μ L, 260nm에서 0.04Abs)의 10회 반복 파장 스캔.

광도 직선성

청어 정자 DNA와 BSA 단백질의 정량적 및 정성적 측정은 TrayCell 2.0이 장착된 Cary 60 UV-Vis를 사용하여 수행했습니다. 1.0mm 경로 길이 캡은 3~5μL 범위의 시료 부피를 측정할 수 있도록 설계되어 일상적인 작업 농도의 DNA, RNA 및 단백질에 이상적입니다.

청어 정자 DNA에 대한 광도 직선성 측정

농도 범위가 5~1,500ng/μL인 청어 정자 DNA 시료에 대하여 260nm에서 단일 파장 흡광도 측정을 수행했습니다. 그림 6에서 볼 수 있듯이, 1.0mm 경로 길이 캡이 장착된 TrayCell 2.0을 사용하여 최대 2.4Abs의 우수한 광도 직선성을 얻을 수 있었습니다. 2.4Abs에서 청어 정자 DNA의 해당 농도는 1,500ng/μL였습니다. 1.0mm 경로 길이 캡을 사용하여 5ng/μL(0.008Abs, 등가 Abs 0.08)의 매우 낮은 농도의 DNA 시료에 대해 우수한 광도 직선성이 관찰되었습니다(그림 6, 삽도).

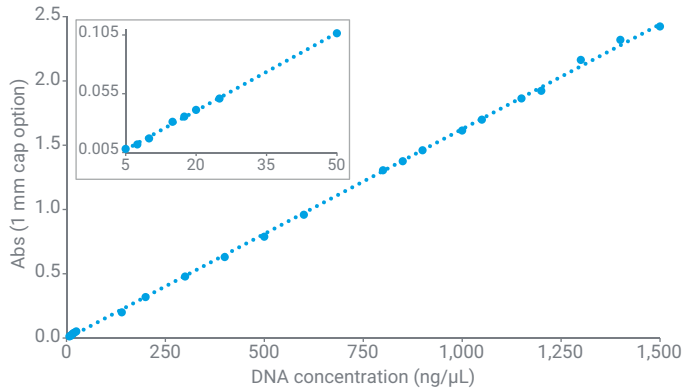


그림 6. 최대 1,500ng/μL의 청어 정자 DNA 시료에 대한 광도 직선성. 삽도는 5~50ng/μL 사이의 저농도 시료에 대한 결과를 보여줍니다.

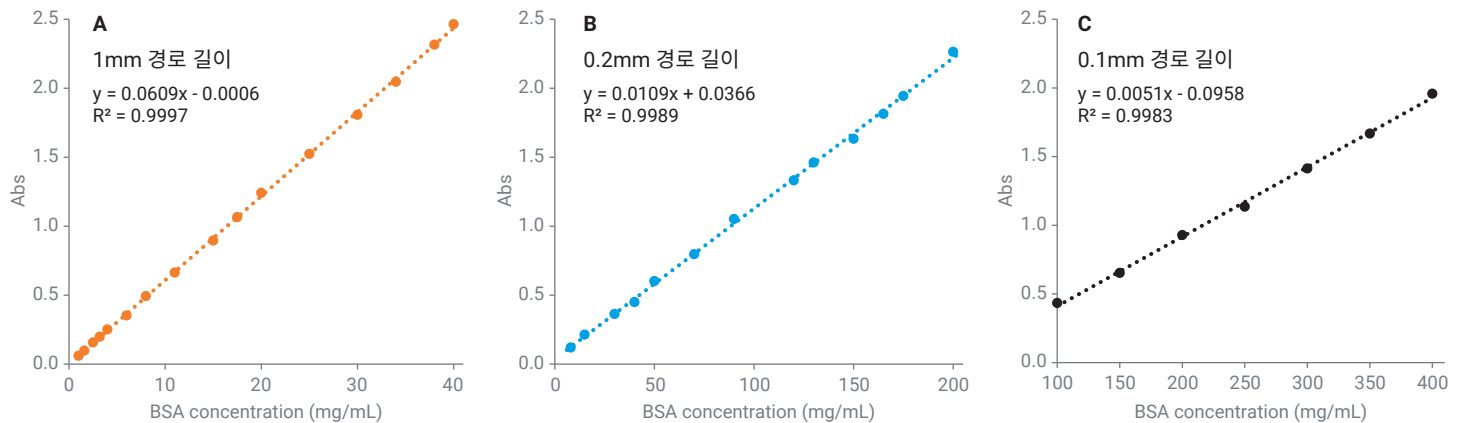


그림 7. 1.0mm 경로 길이 캡을 사용한 최대 40mg/mL(A), 0.2mm 경로 길이 캡을 사용한 최대 200mg/mL(B), 0.1mm 경로 길이 캡을 사용한 최대 400mg/mL(C)의 BSA 농도에 대한 광도 직선성 측정.

BSA 단백질에 대한 광도 직선성 측정

BSA 단백질에 대한 단일 파장 흡수 측정은 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 280nm(1~400mg/mL 농도 범위)에서 수집했습니다. 청어 정자 DNA 시료와 마찬가지로 1.0mm 경로 길이 캡을 사용하여 최대 2.4Abs의 우수한 광도 직선성을 얻었습니다(그림 7A). 2.4Abs에서 해당 BSA 단백질의 농도는 40mg/mL였습니다. 그러나 고농도 BSA 단백질 시료는 TrayCell 2.0 캡을 더 짧은 경로 길이 옵션으로 교체하는 것만으로 정확하게 분석할 수 있었습니다. 0.2mm 경로 길이 캡을 사용하여 최대 200mg/mL의 BSA 단백질 농도를 분석했습니다(그림 7B). 200mg/mL BSA 단백질에 대한 해당 흡광도는 2.3으로, 표준 10mm 큐벳의 경우 115Abs에 해당합니다. TrayCell 2.0에서 사용할 수 있는 가장 짧은 경로 길이 캡인 0.1mm 경로 길이 캡을 사용하여 최대 400mg/mL의 농도를 측정했습니다(그림 7C).

이러한 결과는 시간이 많이 걸리고 오류가 발생하기 쉬운 희석 과정 없이 TrayCell 2.0이 장착된 Cary 60 UV-Vis를 사용하여 최대 400mg/mL의 BSA 단백질 시료를 쉽게 직접 측정할 수 있음을 보여줍니다(표 1).

표 1. 1.0, 0.2, 0.1mm 경로 길이를 사용한 BSA 단백질의 등가 흡광도 비교.

	TrayCell 2.0 Ultra-Microvolume Cell		
	1.0	0.2	0.1
경로 길이(mm)	1.0	0.2	0.1
측정된 최고 농도(mg/mL)	40	200	400
측정된 흡광도	2.4	2.3	2.0
10mm 표준 큐벳에 해당하는 Abs	24	115	200

참고: 등가 Abs는 10mm 경로 길이에 대해 계산된 흡광도 값입니다. 최대 400mg/mL까지 측정할 수 있다는 것의 장점은 고농도 단백질 용액을 희석할 필요 없이 직접 측정할 수 있다는 것입니다.

빠르고 쉬운 데이터 수집 및 분석을 위한 Cary WinUV 농도 모듈

Cary WinUV 소프트웨어에는 데이터 수집, 분석, 저장 및 표시를 위한 강력한 기능과 간단한 분석법이 포함되어 있으며 복잡성을 줄입니다. 또한 정성 파장 스캔 또는 판독, 농도 분석, 효소 동역학 등 다양한 응용 분야를 다루도록 설계된 다양한 모듈이 포함되어 있습니다.

이 연구에서는 **스캔** 모듈을 사용하여 전체 파장 스캔을 수행했으며, 광도 직선성 측정은 **농도** 모듈을 사용하여 단일 파장 흡광도 측정으로 수행했습니다. **농도** 모듈에서 생성된 기기 설정 및 관련 결과 보고를 입증하기 위해 0.1mm 경로 길이 캡을 사용하여 BSA 단백질 시료에 대한 광도 직선성 측정을 수행했습니다. (동일한 결과가 그림 7C에 나와 있습니다). 그림 8에 설명된 대로 몇 가지 간단한 단계만 거치면 Cary WinUV 소프트웨어를 빠르고 쉽게 설정할 수 있습니다.

- 1) **농도** 모듈을 열고 **설정** 탭을 클릭하여 기기 설정 창을 엽니다.
- 2) **Cary** 탭의 **파장** 옵션에서 단일 파장 측정을 위한 파장을 입력합니다(BSA 단백질의 경우 280nm 입력).
- 3) **반복** 또는 **시료/표준물질 평균화**를 사용하여 각 표준물질에 필요한 반복 횟수를 입력합니다. 이 예에서는 각 BSA 표준 용액에 대해 세 번의 연속 측정 평균으로 데이터를 수집했습니다.
- 4) **표준** 섹션에서 표준 시료의 농도를 오름차순으로 입력하고 **피팅 유형**을 선택합니다. 이 예에서는 **피팅 유형**이 최소 R² (**Min R²**)가 0.9500인 **직선**으로 선택되었습니다.
- 5) 소프트웨어와 기기 모두 분석할 준비가 되었습니다. **시작** 버튼을 클릭하여 분석을 시작하고 표준물질/시료 로딩 지침에 따라 분석을 계속 진행합니다.

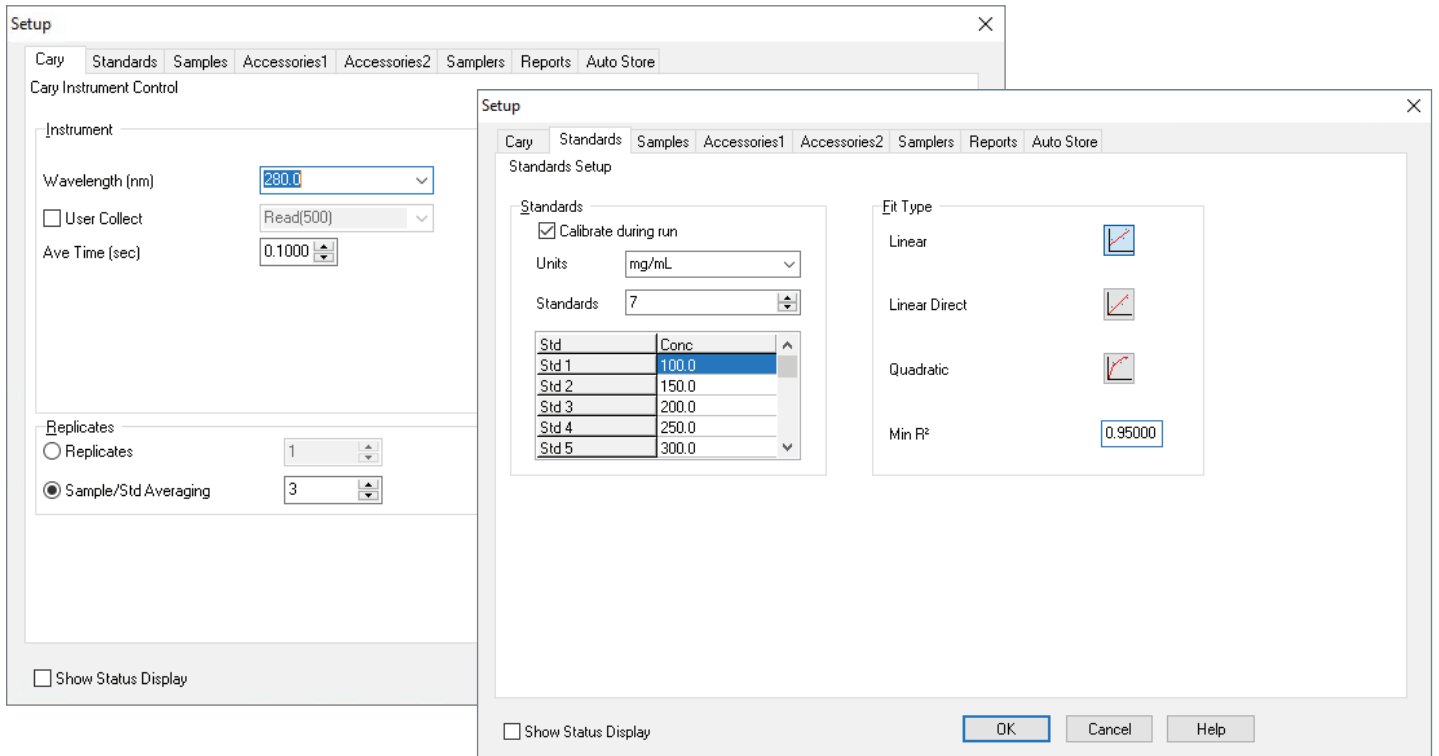


그림 8. Agilent Cary WinUV 소프트웨어의 농도 모듈을 사용하는 데이터 수집 및 분석을 위한 기기 설정.

데이터 수집 후 해당 농도 대 흡광도 그래프(검량선)가 소프트웨어에 의해 자동으로 생성되므로(그림 9) 시간이 많이 소요되는 데이터 처리 절차가 줄어듭니다. 검량선은 **농도** 모듈에 저장됩니다. 미지 시료를 분석할 때 소프트웨어는 자동으로 검량선을 사용하여 시료 농도를 계산하고 보고합니다.

TrayCell 2.0 Ultra-Microvolume Cell의 세척

그림 10은 TrayCell 2.0에서 시료를 세척하고 로드하는 데 필요한 간단한 단계를 간략하게 설명합니다. 보풀이 없는 면봉이나 보풀이 없는 실험용 천으로 시료 창과 캡을 깨끗이 닦은 다음 피펫으로 다음 시료를 로드합니다. 이러한 절차는 기존 큐벳에서 흔히 발생하는 시간 소모적인 세척 단계를 없애고 시료 교차 오염의 위험을 줄입니다.

완전히 유연한 솔루션

TrayCell 2.0에서 사용할 수 있는 다른 캡 옵션으로는 측정할 수 없는 극도로 희석된 시료의 경우 표준 10mm 경로 길이 큐벳을 권장합니다. 표준 10mm 경로 길이 큐벳은 40µL~3.0mL의 다양한 부피로 제공됩니다.

보다 광범위한 측정을 수행하기 위해 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계에는 긴 경로 길이의 셀, 자동화된 멀티셀 교환기, 온도가 제어된 큐벳 홀더를 장착할 수 있습니다. 측정 범위에는 정량, 시료 자동화 또는 동역학 프로세스 분석이 포함됩니다. 구성 요소를 쉽게 교체할 수 있어 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계는 일상적인 생물학적 UV-Vis 측정에 널리 사용되는 기기입니다.

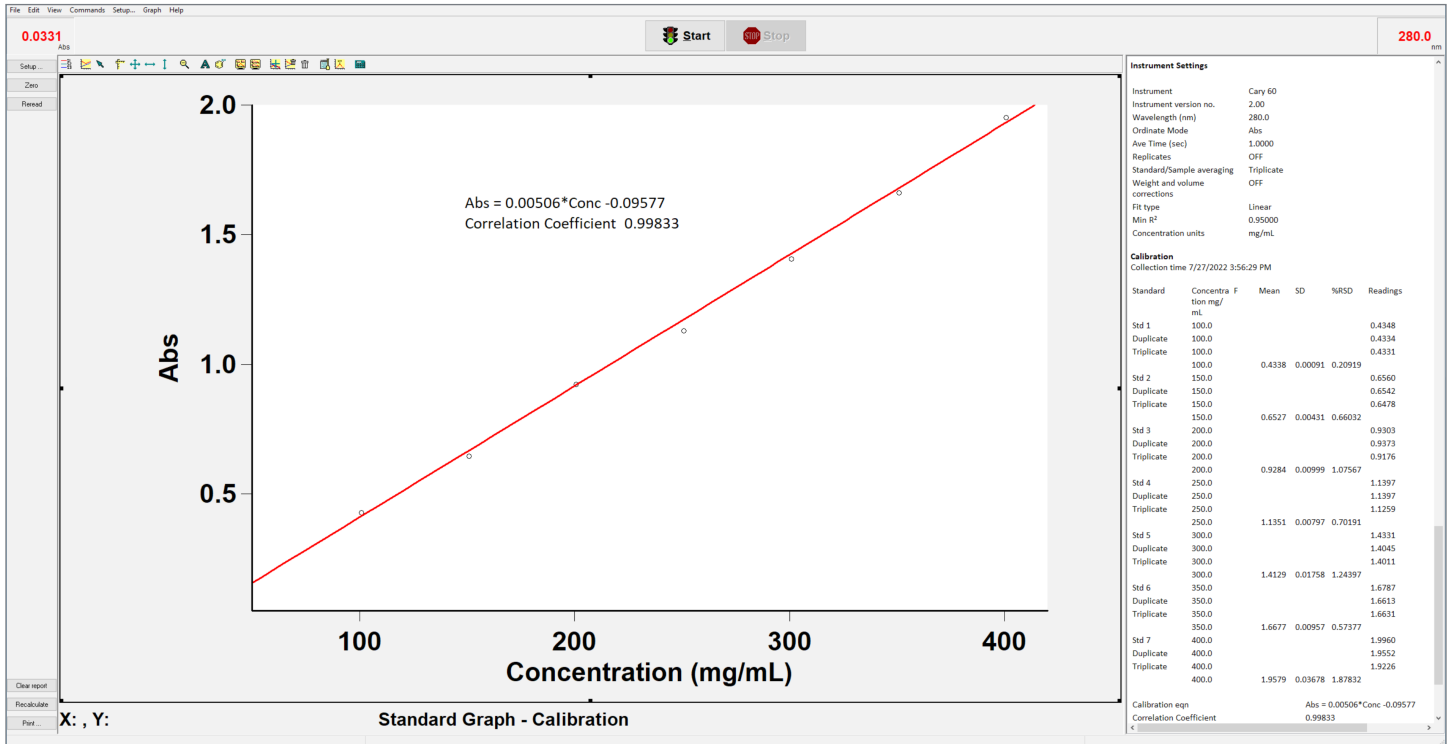


그림 9. 0.1mm 경로 길이 캡이 장착된 TrayCell 2.0을 사용하여 BSA 단백질에 대해 Cary WinUV 소프트웨어로 자동으로 생성된 검량선 및 농도 분석 보고서. 동일한 그래프가 그림 7C에 나와 있습니다.

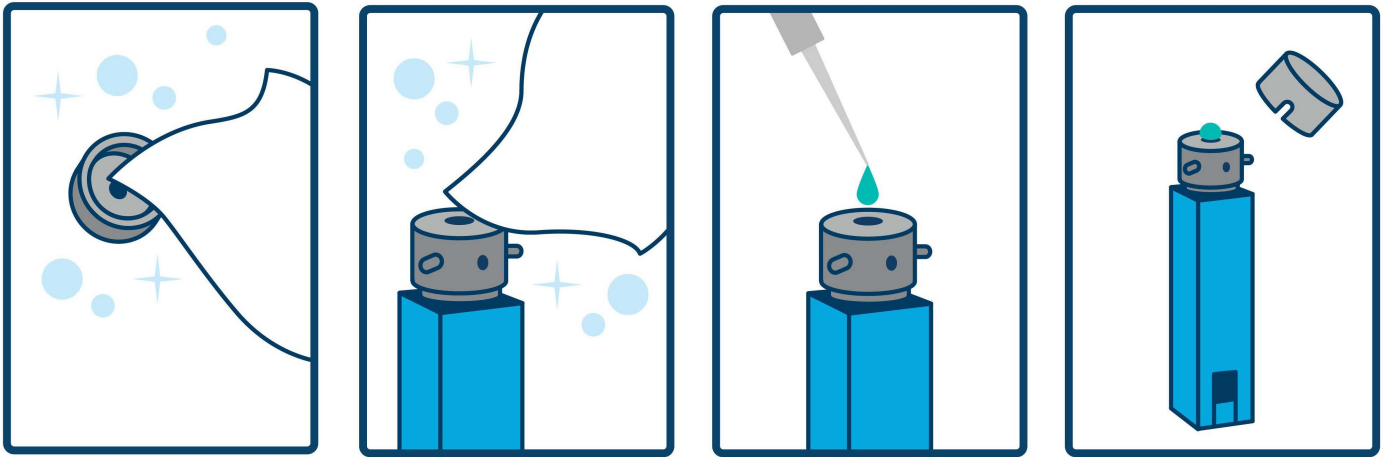


그림 10. TrayCell 2.0의 시료 세척 및 로드 개요도.

결론

TrayCell 2.0 Ultra-Microvolume Cell이 장착된 Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계는 핵산 및 단백질과 같은 초미량 시료를 측정하기 위한 편리하고 사용하기 쉬운 플랫폼을 제공합니다. 20ng/μL 청어 정자 DNA 시료의 반복적인 정성 파장 스캔을 통해 초미량 시료 분석에 대한 Cary 60 UV-Vis의 감도와 재현성을 입증했습니다. TrayCell 2.0에 4개의 서로 다른 캡(경로 길이)을 사용하면 분석법의 분석 범위가 확장되어 지루하고 오류가 발생하기 쉬운 희석을 수행할 필요가 줄어듭니다. 청어 정자 DNA 및 BSA 단백질 시료의 직선 광도 범위는 각각 5~1,500ng/μL 및 1~400mg/mL 범위에서 관찰되었습니다. 간소화된 워크플로, 다용도성 및 광도 성능을 통해 TrayCell 2.0이 장착된 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계는 희석되지 않은 핵산과 단백질의 정확한 측정에 적합합니다.

추가 정보

- Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계
- Agilent Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계
- UV-Vis 분광법 학습 도구
- UV-Vis 및 UV-Vis-NIR 기기 선택 가이드
- UV-Vis 분광 광도계 응용 개요
- UV-Vis 분광기 FAQ

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

DE21781667

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
2022년 12월 20일 한국에서 발행
5994-5455KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com