

使用紫外-可见光谱法对超微量样品进行浓度分析

使用 Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计和 TrayCell 2.0 进行简单、准确且无损的浓度分析



作者

Geethika Weragoda,
Wesam Alwan 和
Fabian Zieschang
安捷伦科技有限公司

摘要

使用配备 TrayCell 2.0 超微量比色池的 Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计分析了蛋白质和核酸样品。无损测量微量样品有利于样品保存、样品处理，并且无需执行繁琐且容易出错的稀释操作。使用 TrayCell 2.0 既快捷又简单，可帮助用户改进工作流程。

前言

现代化实验室越来越多地在寻求无需稀释即可分析 DNA、RNA 和蛋白质等样品的准确、精确且易于使用的方法。

Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计配备 TrayCell 2.0 超微量比色池，该比色池带有合适光程的盖子，为直接测量超微量样品提供了一个方便且易于使用的平台。可以分别使用短光程和长光程盖子分析高浓度和低浓度样品，确保宽动态范围。该方法是一种无损分析方法，可以回收珍贵的样品，并且 TrayCell 2.0 易于清洁，提高了该技术的可用性。

Cary 60 紫外-可见分光光度计（图 1）专为重复的常规应用以及更高级的应用而设计。这款双光束仪器配备强大、高度聚焦的脉冲氙灯。这种灯可大幅提高穿过样品的光通量，确保高质量的光度测量结果。因此，Cary 60 紫外-可见分光光度计是准确且可重现地测量少量样品的理想之选。脉冲氙灯仅在采集数据时照射样品，保护敏感样品免受光降解并降低功耗。此外，Cary 60 紫外-可见分光光度计不受室光干扰带来的失真影响。Cary 60 紫外-可见分光光度计的室光免疫性能支持在开放的样品室中操作，易于使用，并且降低了由于处理错误而导致数据质量降低的风险。与因仪器限制而可能产生不准确或不可重复结果的现有方法相比，高性能 Cary 60 紫外-可见分光光度计可提供更优质的数据。



图 1. Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计

迈向更可持续发展的实验室

Cary 60 紫外-可见分光光度计的环境影响已经过独立审计，并获得了由 My Green Lab 认证的 **ACT（归责性、一致性和透明度）** 标签。该标签提供了有关 Cary 60 紫外-可见分光光度计在其整个生命周期中对环境造成的影响的信息（图 2）。

Cary 60 紫外-可见分光光度计改善了实验室对环境的影响，而不会影响分析效率或科学进步。



图 2. ACT 标签提供了关于产品及其包装的生产、使用和处置对环境造成影响的信息

在典型的吸光度测量中，TrayCell 2.0 超微量比色池（货号 G6871C）置于 Cary 60 紫外-可见分光光度计的标准样品池支架中。TrayCell 2.0 可以配备可更换盖，提供四种不同的光程：2.0 mm（货号 G6871-68005）、1.0 mm（货号 G6871-68004）、0.2 mm（货号 G6871-68003）和 0.1 mm（货号 G6871-68002），具有宽动态范围。将超微量样品（0.7–10 μL ，取决于光程）吸取至 TrayCell 2.0 的测量窗，然后将具有选定光程的相应盖子置于上方。来自 Cary 60 紫外-可见分光光度计的高度聚焦光束经过 TrayCell 2.0 中的光纤直接穿过样品（图 3）。然后，光束被盖子中的反射镜反射回到分光光度计检测器中，重新穿过样品，如图 4 所示。

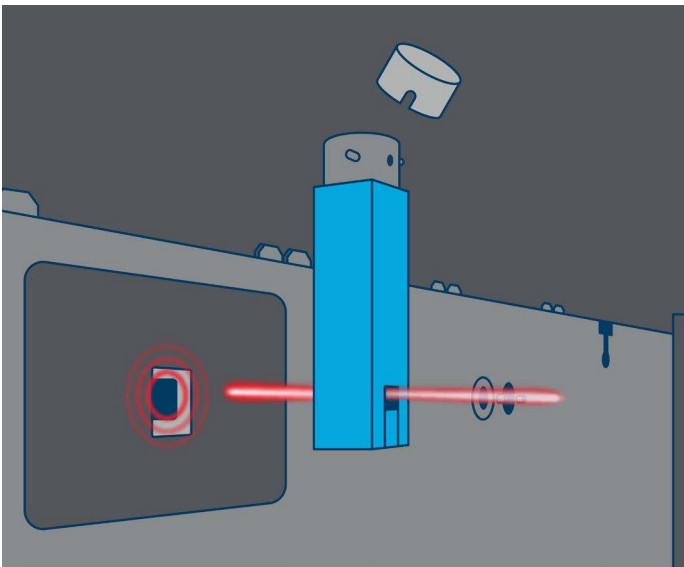


图 3. 配备 TrayCell 2.0 超微量比色池的 Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计直接测量超微量样品的示意图。展示了 Cary 60 紫外-可见分光光度计的高度聚焦光束穿过 TrayCell 2.0

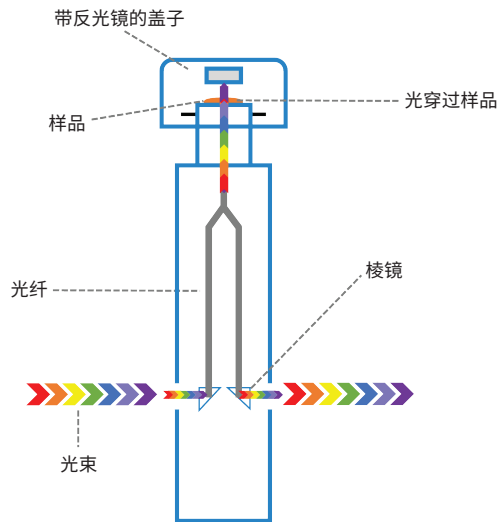


图 4. TrayCell 2.0 超微量比色池的光学设计

在将下一个样品置于 TrayCell 2.0 的测量窗之前，需要清洁窗片以及盖子内的反射镜。在清洁窗片期间，无需从样品池支架上取下 TrayCell 2.0。窗片与盖子内的反射镜之间准确的间距可确保准确的光程，并在每次测量中保持不变。

在本研究中，使用配备 TrayCell 2.0 超微量比色池的 Cary 60 紫外-可见分光光度计测量超微量蛋白质和 DNA 样品。使用 TrayCell 2.0 的不同光程盖选件，以减少稀释，并扩展样品的可测量浓度范围。使用牛血清白蛋白 (BSA) 和鲑鱼精子 DNA 样品，展示了配备 TrayCell 2.0 的 Cary 60 紫外-可见分光光度计的光度测量性能。

仪器和材料

- Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计
- TrayCell 2.0 超微量比色池
- BSA 蛋白：将已知量的 BSA 蛋白（Sigma-Aldrich, CAS 9048-46-8）溶解于 PBS 缓冲液（磷酸盐缓冲液）中，配制 400 mg/mL 储备液。连续稀释储备液，配制一组不同浓度的样品
- 鲑鱼精子 DNA：将已知量的鲑鱼精子 DNA（Sigma-Aldrich, CAS 438545-06-3）溶解于 PBS 缓冲液中，配制 5 mg/mL 储备液。连续稀释储备液，配制一组不同浓度的样品

使用移液器将超微量 (3 μL) 样品置于测量窗上，并使用 Agilent Cary WinUV 软件 5.1.3.1042 版进行数据采集。

结果与讨论

低浓度下的光度测量重现性

为了评估配备 TrayCell 2.0 的 Cary 60 紫外-可见分光光度计的可用吸光度范围，对高浓度和低浓度样品进行了测量。对于样品量有限的低浓度测量，TrayCell 2.0 是理想之选，因为它只需要超微量样品即可进行测量。此外，Cary 60 紫外-可见分光光度计足够灵敏，可以测量低浓度样品，而许多分光光度计的灵敏度不支持测量浓度低于 25 ng/ μL 的样品。分光光度计在低浓度下的性能至关重要，因此需要执行波长扫描以确保观察到典型的样品曲线。使用配备 TrayCell 2.0（带 1.0 mm 盖子）的 Cary 60 紫外-可见分光光度计对 20 ng/ μL 鲑鱼精子 DNA 样品进行十次重复波长扫描。该样品的吸光度为 0.04，相当于标准 10 mm 比色池中的 0.4 Abs。如图 5 所示，Cary 60 紫外-可见分光光度计可进行高度可重现的波长扫描，这对于超微量分析十分重要。

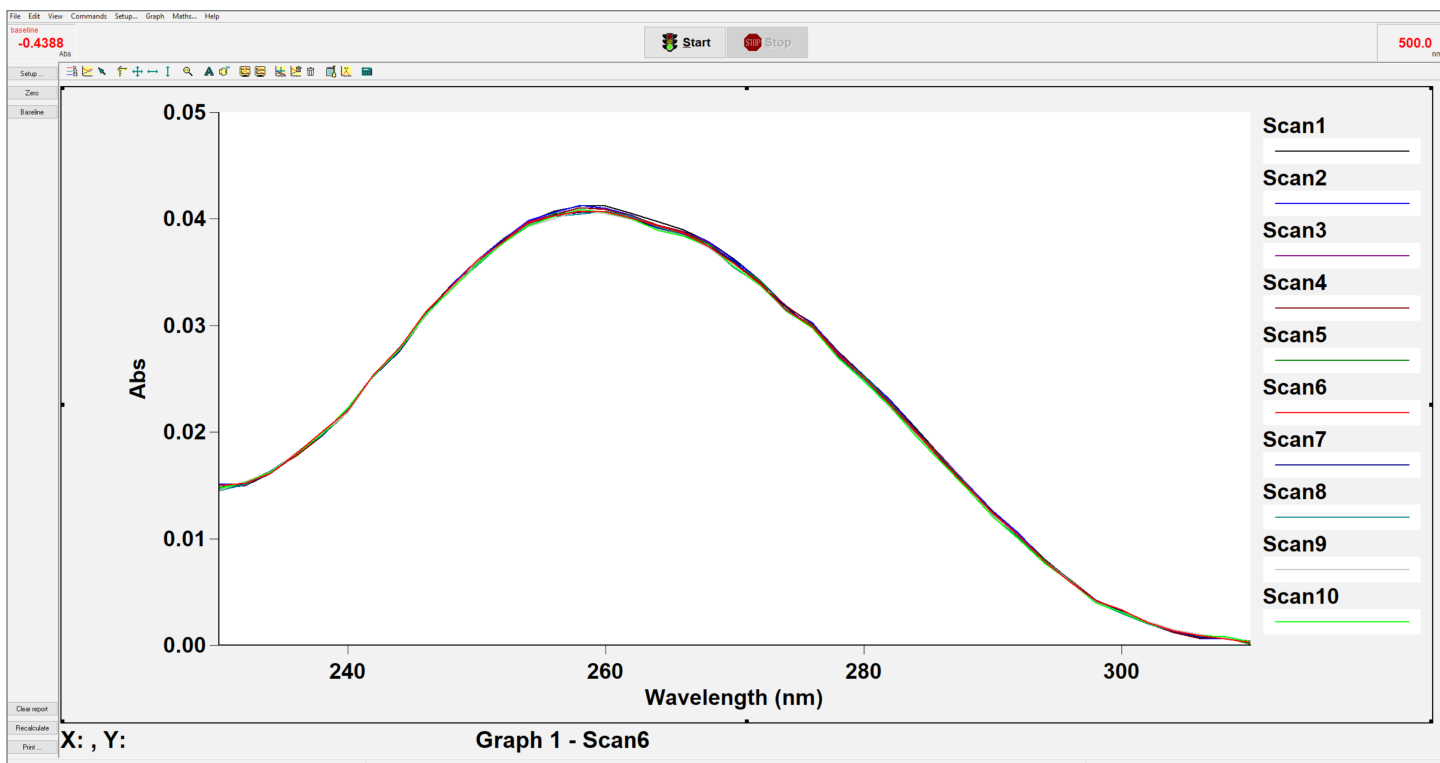


图 5. 使用配备 TrayCell 2.0 超微量比色池（带 1.0 mm 光程盖）的 Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计对鲑鱼精子 DNA（20 ng/ μL ，0.04 Abs，260 nm）进行十次重复波长扫描

光度测量线性

使用配备 TrayCell 2.0 的 Cary 60 紫外-可见分光光度计对鲱鱼精子 DNA 和 BSA 蛋白质进行定量和定性测量。1.0 mm 光程盖设计用于测量 3–5 μL 范围内的样品量，非常适合常规工作浓度的 DNA、RNA 和蛋白质。

鲱鱼精子 DNA 的光度线性测量

对 5–1500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 浓度范围内的鲱鱼精子 DNA 样品进行单波长吸收测量，波长为 260 nm。如图 6 所示，使用带 1.0 mm 光程盖的 TrayCell 2.0 在高达 2.4 Abs 的范围内获得了出色的光度测量线性。在 2.4 Abs 时，相应的鲱鱼精子 DNA 浓度为 1500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。对于极低浓度的 DNA 样品，使用 1.0 mm 光程盖在低至 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的浓度下获得了出色的光度线性 (0.008 Abs，当量吸光度为 0.08 Abs) (图 6，插图)。

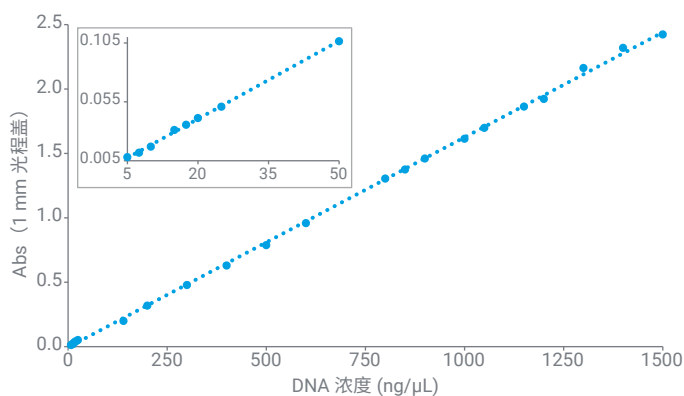


图 6. 鲱鱼精子 DNA 样品的光度线性范围高达 1500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。插图显示了 5–50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 低浓度范围内的样品结果

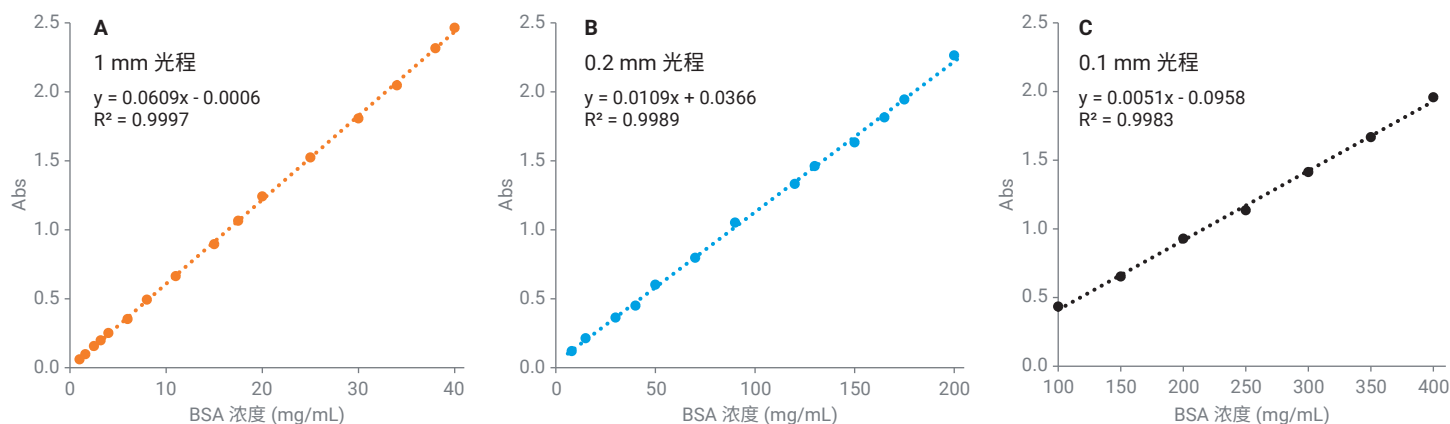


图 7. BSA 的光度线性测量结果，(A) 使用 1.0 mm 光程盖，高达 40 mg/mL ；(B) 使用 0.2 mm 光程盖，高达 200 mg/mL ；(C) 使用 0.1 mm 光程盖，高达 400 mg/mL

BSA 蛋白质的光度线性测量

使用 Cary 60 紫外-可见分光光度计在 280 nm (1–400 mg/mL 浓度范围) 处采集 BSA 蛋白质的单波长吸收测量值。与鲱鱼精子 DNA 样品一样，使用 1.0 mm 光程盖在高达 2.4 Abs 的范围内获得了出色光度线性 (图 7A)。在 2.4 Abs 时，相应的 BSA 蛋白质浓度为 40 mg/mL 。但只需将 TrayCell 2.0 的盖子更换为光程更短的盖子，即可准确分析高浓度 BSA 蛋白质样品。使用 0.2 mm 光程盖分析了浓度高达 200 mg/mL 的 BSA 蛋白 (图 7B)。200 mg/mL BSA 蛋白的相应吸光度为 2.3，相当于标准 10 mm 比色池的 115 Abs。0.1 mm 光程盖是可在 TrayCell 2.0 中使用的最短光程盖，可用于测量高达 400 mg/mL 的浓度 (图 7C)。

以上结果表明，使用配备 TrayCell 2.0 的 Cary 60 紫外-可见分光光度计，可以轻松、直接地测量浓度高达 400 mg/mL 的 BSA 蛋白样品，无需进行耗时且容易出错的稀释 (表 1)。

表 1. 使用 1.0、0.2 和 0.1 mm 光程时 BSA 蛋白的当量吸光度比较

	TrayCell 2.0 超微量比色池		
光程 (mm)	1.0	0.2	0.1
测量的最高浓度 (mg/mL)	40	200	400
实测吸光度	2.4	2.3	2.0
10 mm 标准比色池当量 Abs	24	115	200

注：当量 Abs 是针对 10 mm 光程计算的吸光度值。能够测量高达 400 mg/mL 浓度的优点在于，可以直接测量高浓度的蛋白质溶液，无需稀释。

Cary WinUV 浓度模块可快速轻松地进行数据采集和分析

Cary WinUV 软件包括用于数据采集、分析、存储和显示的强大功能和简化方法，同时可降低操作复杂性。它还包括不同的模块，旨在覆盖一系列应用，包括定性波长扫描或检测、浓度分析、酶动力学等。

在本研究中，使用 **Scan**（扫描）模块执行全波长扫描，而光度线性测量则是使用 **Concentration**（浓度）模块进行单波长吸光度测量。为了演示仪器设置和 **Concentration**（浓度）模块生成的相关结果报告，使用 0.1 mm 光程盖对 BSA 蛋白质样品进行光度线性测量（相同结果如图 7C 所示）。如下所述以及如图 8 所示，只需几个简单的步骤即可快速轻松地设置 Cary WinUV 软件：

- 1) 打开 **Concentration**（浓度）模块并单击 **Setup**（设置）选项卡，打开仪器设置窗口
- 2) 在 **Cary** 选项卡中，在 **Wavelength**（波长）选项中输入单波长测量的波长（对于 BSA 蛋白质，输入 280 nm）
- 3) 使用 **Replicates**（重复）或 **Sample/Std Averaging**（样品/标样平均值）输入每个标样所需的重复次数。在此示例中，采集每个 BSA 标准溶液三次连续测量的平均值数据
- 4) 在 **Standards**（标样）部分，按升序输入标样浓度并选择 **Fit type**（拟合类型）。在此示例中，将 **Fit type**（拟合类型）选择 **Linear**（线性），最小 R^2 (**Min R²**) 为 0.9500
- 5) 现在软件和仪器均准备就绪，可用于分析。单击 **Start**（开始）按钮开始分析，只需按照标样/样品加载说明继续分析即可

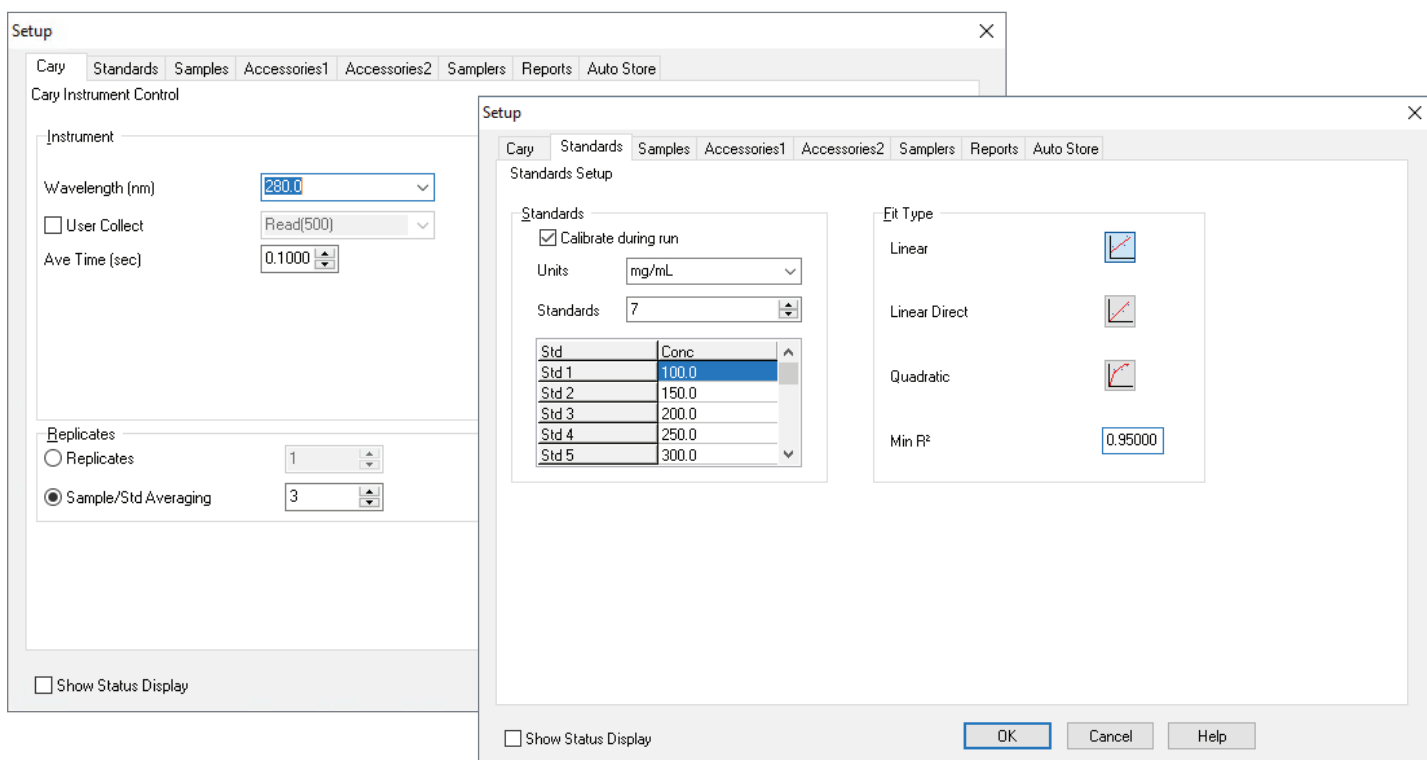


图 8. 使用 Agilent Cary WinUV 软件中的 **Concentration**（浓度）模块进行数据采集和分析的仪器设置

采集数据后，软件将自动生成相应的浓度与吸光度图（校准曲线）（图 9），减少了耗时的数据处理程序。校准曲线保存在 **Concentration**（浓度）模块中。分析未知样品时，软件会自动使用校准曲线来计算并报告样品浓度。

TrayCell 2.0 超微量比色池的清洁

图 10 概述了清洁 TrayCell 2.0 以及加载样品所需的简单步骤。用无尘棉签或无纺布将样品窗片和盖子擦拭干净，然后用移液管移取下一个样品。采用这些程序，避免了使用传统比色池时常见的耗时的清洁步骤，并降低了样品交叉污染风险。

完全灵活的解决方案

对于稀释程度极高无法使用 TrayCell 2.0 提供的各种光程盖进行测量的样品，建议使用标准 10 mm 光程比色池。标准 10 mm 光程比色池有多种容量可供选择，从 40 μ L 到 3.0 mL。

为了扩展测量范围，Cary 60 紫外-可见分光光度计可配备长光程比色池、自动化多池更换装置以及温控比色池支架，适用于定量、样品自动化或分析动力学过程等多种测量。这些组件易于更换，因此 Cary 60 紫外-可见分光光度计可广泛应用于常规生物紫外-可见光测量。

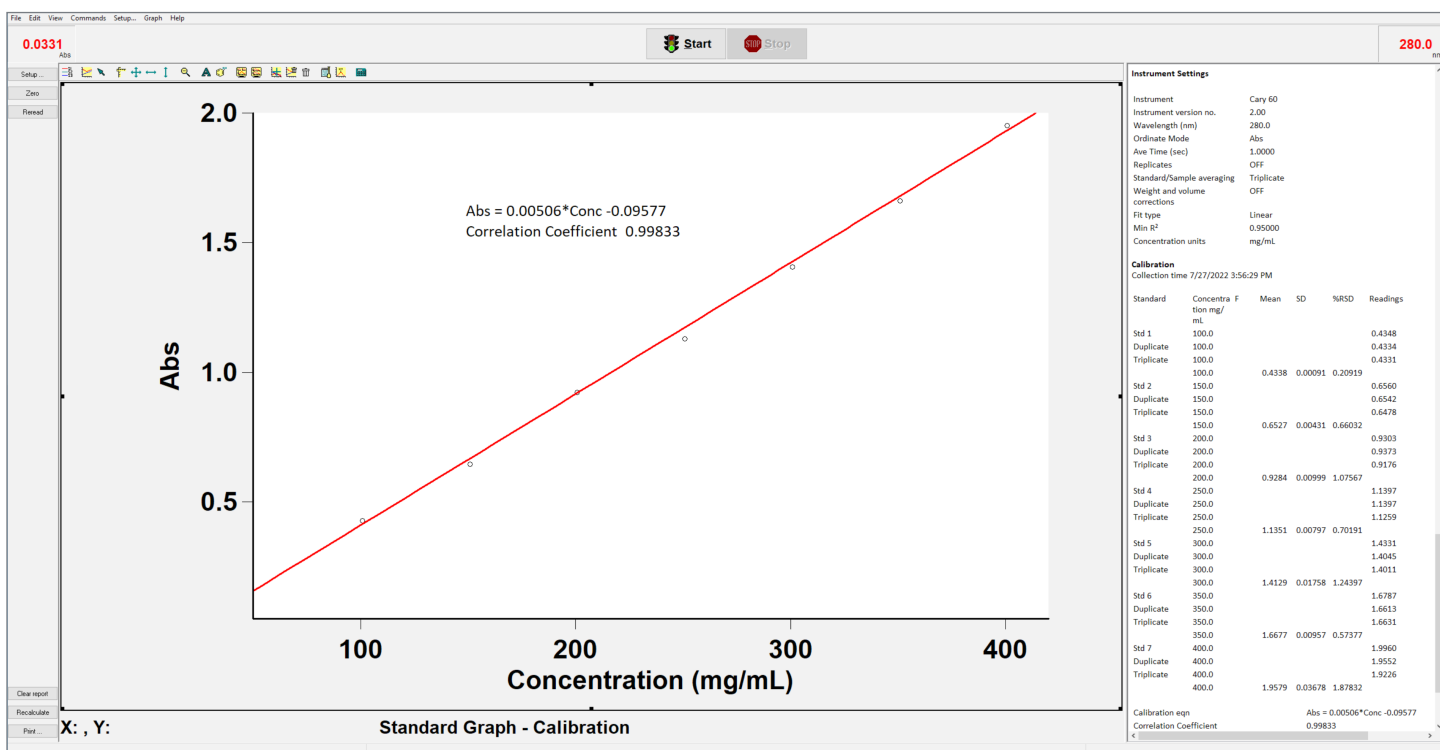


图 9. 使用带 0.1 mm 光程盖的 TrayCell 2.0 测量 BSA 蛋白质时，Agilent Cary WinUV 软件自动生成的校准曲线和浓度分析报告。相同的图如图 7C 所示

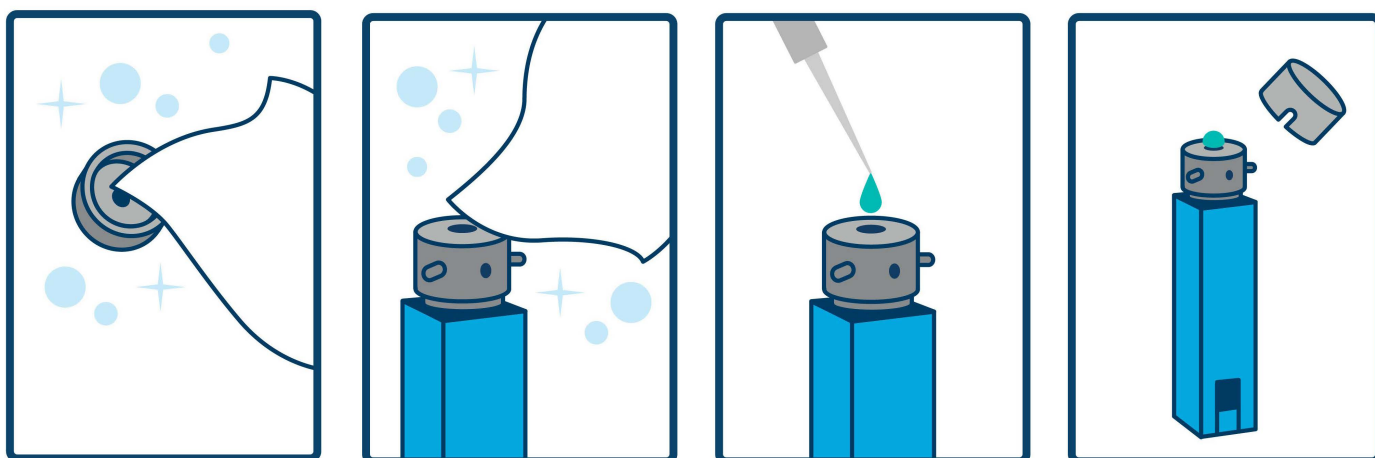


图 10. 清洁 TrayCell 2.0 和加载样品的示意图

结论

配备 TrayCell 2.0 超微量比色池的 Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计为测量核酸和蛋白质等超微量样品提供了一个方便且易于使用的平台。对 20 ng/μL 鲑鱼精子 DNA 样品进行重复性波长扫描，证明了 Cary 60 紫外-可见分光光度计对超微量样品分析具有优异的灵敏度和重现性。TrayCell 2.0 采用四种不同的盖子（四种不同的光程），扩展了该方法的分析范围，无需执行繁琐且容易出错的稀释。结果观察到鲑鱼精子 DNA 和 BSA 蛋白样品的线性光度范围分别为 5–1500 ng/μL 和 1–400 mg/mL。配备 TrayCell 2.0 的 Cary 60 紫外-可见分光光度计简化了工作流程，具有多功能性和出色的光度测量性能，是准确测量未经稀释的核酸和蛋白质的理想之选。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

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

DE21781667

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2022
2022 年 12 月 20 日，中国出版
5994-5455ZHCN

更多信息

- Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计
- Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计
- 紫外-可见光谱学习工具
- UV-Vis 和 UV-Vis-NIR 仪器选择指南
- 紫外-可见分光光度计应用概述
- UV-Vis 光谱常见问题解答