

## Vorteile des Cary 3500 Multizellen-UV-Vis für die Proteinanalytik

Verbesserung der Produktivität und  
Reproduzierbarkeit für qualitative und quantitative  
Messungen sehr kleiner Volumina



### Autoren

Kevin Grant und Matt Quinn  
Agilent Technologies,  
Australien

### Einführung

Messungen mit UV-Vis-Spektralphotometern ermöglichen eine schnelle und zuverlässige Qualitätskontrolle von Proben. Sie können auch dazu verwendet werden, spezifische Aktivitäten zu berechnen, die Ausbeute nach der Aufreinigung abzuschätzen oder Fraktionen, die Proteine oder Aminosäuren enthalten, zu identifizieren.

Proteine, die Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten enthalten, absorbieren Licht bei ungefähr 280 nm. Daher kann eine quantitative Analyse mit einem UV-Vis-Spektralphotometer erfolgen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (1) kann die Konzentration von Proteinen, die diese Aminosäuren enthalten, ermittelt werden, wenn der Extinktionskoeffizient bekannt ist. Die Menge einer Proteinprobe ist häufig begrenzt und deshalb ist es wichtig, dass diese Messungen bei minimalen Volumina durchgeführt werden können, um sparsam mit der Probe umzugehen. Die Aufnahme eines UV-Spektrums kann Informationen über mögliche Verunreinigungen liefern.

Das Cary 3500 Multizellen-UV-Vis verfügt über eine integrierte, dauerhaft ausgerichtete Multizellen-Halterung: ein ideales System für reproduzierbare und zuverlässige qualitative und quantitative Messungen mit Küvetten mit Ultra-Mikrovolumen (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Das Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer hat einen stark gebündelten Strahl, dessen Breite weniger als 1,5 mm beträgt. Aufgrund seiner kleinen Größe ist der Strahl optimal für Küvetten mit kleiner Apertur, wie sie hier gezeigt wird, geeignet.

Diese Untersuchung zeigt die Vorteile des Cary 3500 Multizellen-UV-Vis-Spektralphotometers für qualitative und quantitative Proteinanalysen in kleinen Volumina. Bovines Serumalbumin (BSA) wird häufig als Proteinstandard mit bekanntem Extinktionskoeffizienten verwendet; es wurde auch für diese Analysen verwendet.

## Experimentelles

### Proben

Eine 0,01 M Phosphatpufferlösung (PBS) wurde mit pH 7,0 hergestellt. Es wurde eine BSA-Stammlösung mit 10 mg/ml hergestellt, die dann auf 0,75, 1,50, 2,25, 3,00 und 3,75 mg/ml verdünnt wurde.

Sechs 70- $\mu\text{l}$ -Küvetten mit Ultra-Mikrovolumen, einer Apertur von 2 x 2,5 mm und einer optischen Schichtdicke von 10 mm (Abbildung 1) wurden für die Messungen verwendet. Eine Kuvette wurde für die Referenz verwendet, fünf für die Proben. Für Reproduzierbarkeitsmessungen wurde eine Standard-Quarzkuvette (3,5 ml) mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Die Phosphatpufferlösung wurde als Referenzlösung verwendet.

### Geräte und Methode

Für alle Messungen wurde ein Cary 3500 Multizellen-UV-Vis-Spektralphotometer verwendet. Es wurde ein UV-Spektrum

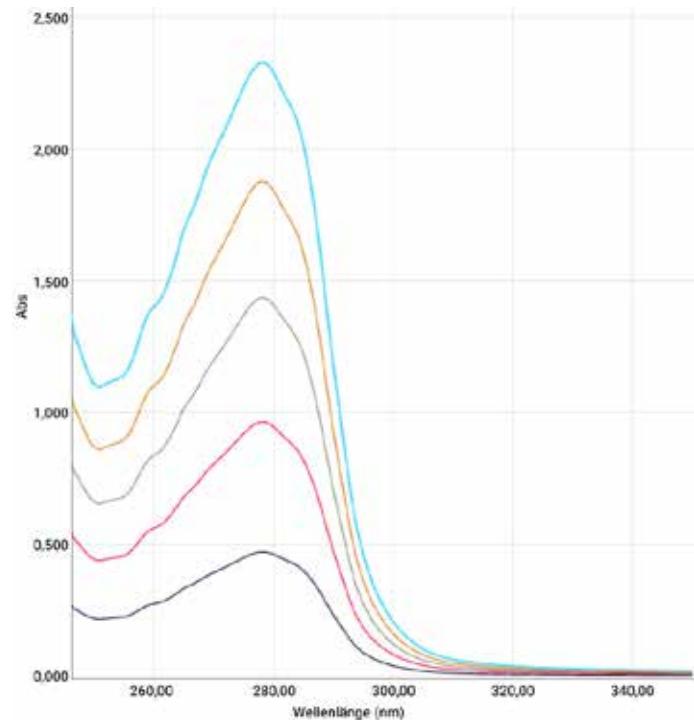
von 250 bis 350 nm mit einer Signalmittelungszeit von 1 Sekunde und einem Datenintervall von 1 nm aufgenommen. Es war keine Vorjustierung des Systems erforderlich.

Um die Reproduzierbarkeit zu zeigen, wurden 20 Wiederholungsmessungen der BSA-Lösung mit 3,0 mg/ml mit der Kuvette mit Ultra Mikrovolumen (70  $\mu\text{l}$ ) sowie mit einer identischen Kuvette mit Ultra-Mikrovolumen, die die Phosphatpufferlösung enthielt und sich in der Referenzposition befand, durchgeführt. Weiterhin wurde ein Satz von 10 Wiederholungsmessungen derselben Lösung in einer Standard-Quarzkuvette (3,5 ml) mit einer optischen Schichtdicke von 10 mm durchgeführt. Auch in diesem Fall wurde eine identische Kuvette mit Phosphatpufferlösung als Referenz verwendet. Diese Messungen wurden alle bei 278 nm mit einer Signalmittelungszeit von 1 Sekunde und einer spektralen Bandbreite von 2 nm durchgeführt.

## Ergebnisse

### Gleichzeitige Messungen

Die Blindprobe und fünf BSA-Proben wurden gleichzeitig im Cary 3500 Multizellen-UV-Vis-Spektralphotometer gemessen. Küvetten mit Ultra-Mikrovolumen (2 x 2,5 mm Apertur und 10 mm Schichtdicke) wurden verwendet. Zur qualitativen Analyse wurde ein UV-Spektrum von 250 bis 350 nm aufgenommen (Abbildung 2). Diese Daten wurden verwendet, um die Linearität des Geräts zu bewerten (siehe Abschnitt Linearität in Mikrozellen, im Folgenden).



**Abbildung 2:** Gleichzeitig aufgenommene UV-Spektren von fünf BSA-Proben in Küvetten mit Ultra-Mikrovolumen von 70  $\mu\text{l}$ .

## Proteinreinheit

Die Intensität der Extinktion bei 350 nm kann zur Quantifizierung und Korrektur für möglicherweise in einer Proteinprobe vorhandene Verunreinigungen verwendet werden. Wie in Abbildung 2 gezeigt, beträgt die Extinktion bei 350 nm der hier untersuchten Proben 0 a.u. Daher kann die Konzentration von BSA in diesen Proben mit der direkten Proportionalität zur Intensität des Peakmaximums im Spektrum genau ermittelt werden. Es ist keine Korrektur aufgrund von Verunreinigungen erforderlich.

## Linearität in Mikrozellen

Das Peakmaximum jedes UV-Spektrums der BSA-Lösungen lag bei 278 nm (Abbildung 2). Die Extinktionsintensität des Peaks bei 278 nm wurde für jede Probe mithilfe der Cary UV Workstation-Software ermittelt und gegen die Proteinkonzentration jeder gemessenen Probe aufgetragen (Abbildung 3). Diese Daten zeigen eindeutig die Linearität des Cary 3500 UV-Vis-Systems (Abbildung 3). Die Daten zeigen, dass der lineare Bereich fast bis zu einer Extinktion von 2,5 a.u. reicht, auch wenn Küvetten mit kleiner Apertur und Ultra-Mikrovolumen verwendet werden.

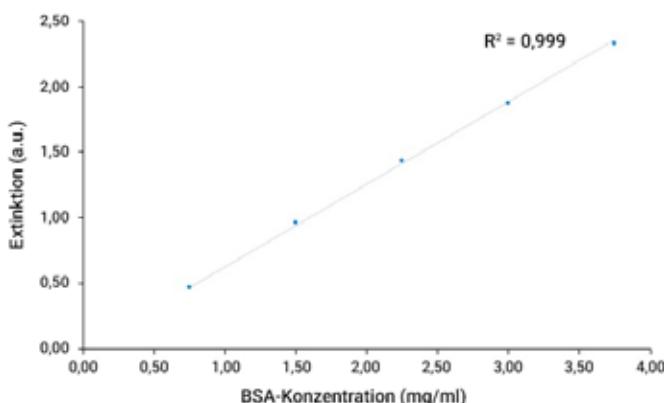


Abbildung 3: Linearität des Cary 3500 Multizellen-UV-Vis-Spektralphotometers, gezeigt durch Auftragen der Extinktion bei 278 nm gegen die Konzentration der fünf BSA-Proben.

## Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit zu zeigen, wurden 20 Wiederholungsmessungen der BSA-Probe mit 3,0 mg/ml in der Küvette mit einem Ultra-Mikrovolumen von 70 µl und einer Apertur von 2 x 2,5 mm sowie in einer Standardküvette mit 3,5 ml durchgeführt. Beide Küvetten hatten eine optische Schichtdicke von 10 mm. Die Reproduzierbarkeit (Standardabweichung) der Messungen wurde durch die reduzierte Größe der Apertur der Küvette mit Ultra-Mikrovolumen nicht beeinträchtigt, wie in Abbildung 4 gezeigt.

Die Standardabweichung der Wiederholungsmessungen lag für die Küvette mit einem Ultra-Mikrovolumen von 70 µl bei 0,00042 und für die Standardküvette mit 3,5ml bei 0,00029. Der durchschnittliche Wert der Messungen lag bei der Küvette mit Ultra-Mikrovolumen bei 1,863 a.u. Bei der Standardküvette mit 3,5 ml lag der durchschnittliche Wert der Messungen bei 1,858 a.u. Die Differenz der beiden Messreihen lag innerhalb der Messunsicherheit des Geräts.

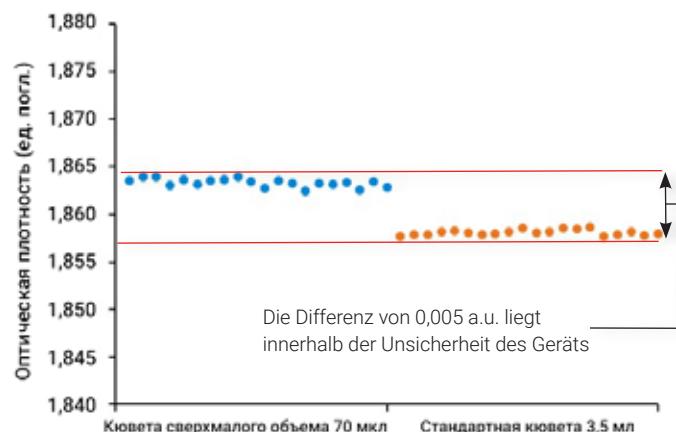


Abbildung 4: Extinktion von 20 Wiederholungsmessungen mit einer Küvette mit einem Ultra-Mikrovolumen von 70 µl im Vergleich mit einer Standardküvette mit 3,5 ml.

Die Gefahr bei der Verwendung von Küvetten mit geringem Volumen besteht in einem reduzierten Lichtdurchsatz aufgrund der kleineren Apertur der Küvette, die im Allgemeinen Teil des Küvettendesigns ist. Ein reduzierter Lichtdurchsatz kann sowohl zu einem kleineren linearen Extinktionsbereich als auch zu einer geringeren Reproduzierbarkeit der Messungen führen. Das Cary 3500 stellt mit seinem stark fokussierten Strahl ein Maximum an Lichtdurchsatz durch die Probe und eine Reproduzierbarkeit wie bei einer Standardküvette mit 3,5 ml sicher (Abbildung 4).

## Diskussion

Quantitative Messungen können mithilfe der Intensität des Extinktionsmaximums eines UV-Vis-Spektrums durchgeführt werden, wenn der Extinktionskoeffizient bekannt ist. Für Proben wie dem hier gemessenen BSA ist der Extinktionskoeffizient bekannt. Ist der Extinktionskoeffizient nicht bekannt, muss er aus der Steigung der Kalibrierungskurve, die durch die Messung mehrerer Standards erstellt wird, berechnet werden. Dieses Verfahren kann sehr zeitaufwändig sein und zu Messfehlern führen, die unter Umständen erst am Ende des Experiments erkennbar sind.

Um das Vertrauen in die Daten zu verbessern, können Proben mit bekannten Konzentrationen in eine Messreihe aufgenommen werden. Diese Proben dienen dann als interne Kontrollen. Der Nachteil dieser Messart ist, dass die Proben und Standards nicht gleichzeitig gemessen werden, sodass sich Variablen zwischen den Messungen geändert haben könnten. Durch die gleichzeitige Messung von Proben und Kalibrierungsstandards, wie in dieser Application Note gezeigt (Abbildung 2), können Umgebungsgrößen oder andere die Probenvorbereitung beeinflussende Umstände erheblich reduziert werden.

Bei der Messung von Proben, die möglicherweise instabil sind, führen die aufeinanderfolgenden Messungen potentiell Fehler ein. Während der Wartezeit der Proben bis zur jeweiligen Messung kann sich die Extinktion ändern. Die Änderungen können von Temperaturschwankungen, Lichteinstrahlung oder chemischen Veränderungen in der Lösung verursacht werden. Dies kann zu systematischen Fehlern in quantitativen Messungen führen. Durch die gleichzeitige Messung aller Küvettenpositionen vermeidet das Cary 3500 Multizellen-UV-Vis-Spektralphotometer diese unerwünschten Variablen und steigert das Vertrauen in die erzeugten Ergebnisse. Darüber hinaus wird viel Messzeit eingespart.

## Schlussfolgerungen

Das Cary 3500 UV-Vis-Multizellen-Spektralphotometer eröffnet neue Möglichkeiten für die qualitative und quantitative Proteinanalytik. Das System stellt mit der einzigartigen fest integrierten und unbeweglichen Multizellen-Halterung Produktivität und Reproduzierbarkeit sicher. Durch die gleichzeitige Messung aller acht Küvettenpositionen reduziert es den Einfluss unerwünschter Größen, der durch aufeinanderfolgende Messungen entstehen könnte. Insgesamt bieten diese Merkmale ein leistungsstarkes analytisches UV-Vis System.

## Literatur

1. Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fasman, D.G., Hrsg. (1992), CRC Press, Boston, USA.

[www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis](http://www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis)

Änderungen vorbehalten.