

Ventajas del sistema UV-Vis Cary 3500 Multicell para el análisis de proteínas

Mejoras en productividad y reproducibilidad para
medidas cualitativas y cuantitativas de volúmenes
muy bajos



Autores

Kevin Grant y Matt Quinn

Agilent Technologies,
Australia

Introducción

Las medidas realizadas con un espectrofotómetro UV-Vis proporcionan un control de calidad rápido y fiable de la muestra. También pueden utilizarse para calcular la actividad específica o estimar el rendimiento después de la purificación, así como para identificar fracciones que contienen proteínas o aminoácidos.

Las proteínas que contienen aminoácidos con cadenas laterales aromáticas absorben la luz aproximadamente a 280 nm. Esto permite el análisis cuantitativo con un espectrofotómetro UV-Vis. De acuerdo con la ley de Beer-Lambert (1), la concentración de proteínas que contienen estos aminoácidos puede determinarse cuando se conoce el coeficiente de absorción. Con frecuencia, las muestras de proteínas son limitadas, y es importante poder realizar estas medidas con un volumen ínfimo para la conservación de la muestra. Llevar a cabo un barrido de longitud de onda puede proporcionar información sobre los posibles contaminantes.

El UV-Vis Cary 3500 Multicell tiene un soporte multicelda integrado y permanentemente alineado, ideal para realizar medidas cualitativas y cuantitativas reproducibles y fiables con cubetas de ultramicrovolumen (Figura 1).



Figura 1. El UV-Vis Cary 3500 tiene un haz altamente colimado, con un ancho de menos de 1,5 mm. El pequeño tamaño del haz lo hace idóneo para su uso con cubetas de pequeña apertura, como la que se muestra aquí.

Este estudio demuestra los beneficios del espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multicell para el análisis cualitativo y cuantitativo de proteínas de bajo volumen. La albúmina sérica bovina (BSA) es un patrón proteico de uso común con un coeficiente de absorción conocido y se ha utilizado para este análisis.

Experimento

Muestras

Se preparó una disolución tampón fosfato (PBS) 0,01 M con un pH de 7,0. Se preparó una solución madre de BSA de 10 mg/ml y luego se diluyó a 0,75, 1,50, 2,25, 3,00 y 3,75 mg/ml.

Para las medidas se utilizaron seis cubetas de ultramicrovolumen de 70 μ l con una apertura de 2 x 2,5 mm y una longitud del camino óptico de 10 mm (Figura 1). Se utilizó una como referencia y cinco como muestras. Para las medidas de reproducibilidad se utilizó una cubeta de cuarzo estándar de 3,5 ml y 10 mm de longitud del camino. Como solución de referencia se utilizó el tampón PBS.

Instrumentación y método

Para todas las medidas se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multicell. Se realizó un barrido de longitud de onda de 250 a 350 nm con un tiempo de promediado de la señal de 1 segundo y un intervalo de datos de 1 nm. No fue necesaria la alineación previa del sistema.

Para demostrar la reproducibilidad, se realizaron 20 medidas repetidas de la solución de BSA de 3,0 mg/ml, utilizando una cubeta de ultramicrovolumen (70 μ l), con una cubeta idéntica de ultramicrovolumen que contenía tampón PBS en la posición de referencia. También se realizó otro conjunto de 10 medidas repetidas de la misma solución, utilizando una cubeta de cuarzo estándar de 3,5 ml y 10 mm de longitud del camino óptico. En este caso, se utilizó como referencia una cubeta idéntica que contenía un tampón PBS. Todas estas medidas se realizaron a 278 nm con un tiempo de promediación de la señal de 1 segundo y un ancho de banda espectral de 2 nm.

Resultados

Medidas simultáneas

Las muestras en blanco y las cinco de BSA se midieron simultáneamente en el UV-Vis Cary 3500 Multicell. Se utilizaron cubetas de ultramicrovolumen (2 x 2,5 mm de apertura con una longitud del camino óptico de 10 mm). Se realizó un barrido de longitud de onda de 250 a 350 nm para permitir el análisis cualitativo de la muestra (Figura 2). Estos datos se utilizaron para evaluar la linealidad del instrumento (ver la sección Linealidad en microceldas, a continuación).

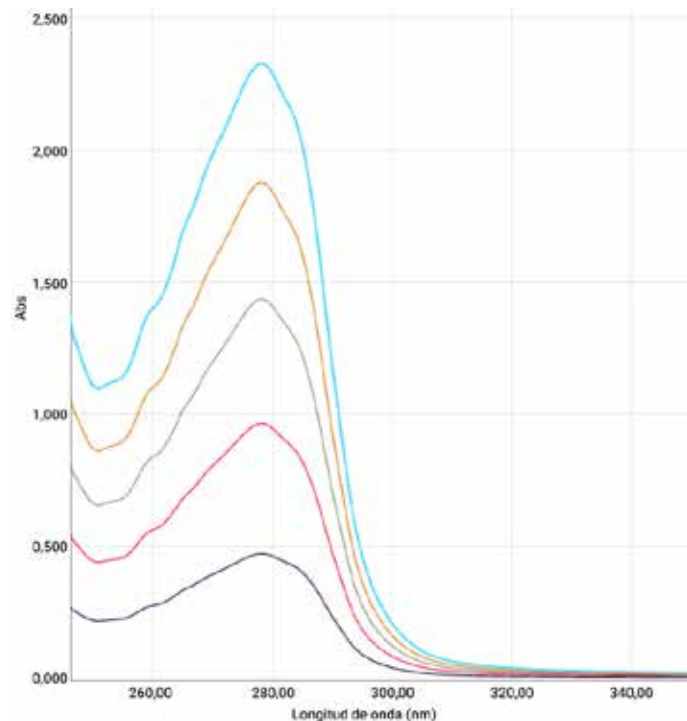


Figura 2. Recogida simultánea de barridos de longitud de onda de cinco muestras de BSA en cubetas de ultramicrovolumen de 70 μ l.

Pureza de las proteínas

La intensidad de absorbancia a 350 nm puede utilizarse para cuantificar y corregir la presencia de cualquier contaminante en una muestra de proteína. Como puede verse en la Figura 2, la absorbancia a 350 nm en las muestras examinadas aquí es 0 Abs. Por lo tanto, la concentración de BSA en estas muestras puede determinarse con precisión como directamente proporcional a la intensidad del pico máximo en el espectro. No se requiere corrección de impurezas.

Linealidad en microceldas

El pico máximo visible en cada barrido de longitud de onda BSA se encuentra a 278 nm (Figura 2). Se extrajo la intensidad de absorbancia en el pico de 278 nm para cada una de las muestras, utilizando el software Cary UV workstation, y se representó en un gráfico frente a la concentración de proteínas en cada una de las muestras medidas (Figura 3). Estos datos demuestran claramente la linealidad del sistema Cary 3500 (Figura 3). Los datos muestran que el rango lineal se extiende hasta casi 2,5 Abs aunque se utilice con las cubetas de ultramicrovolumen de pequeña apertura.

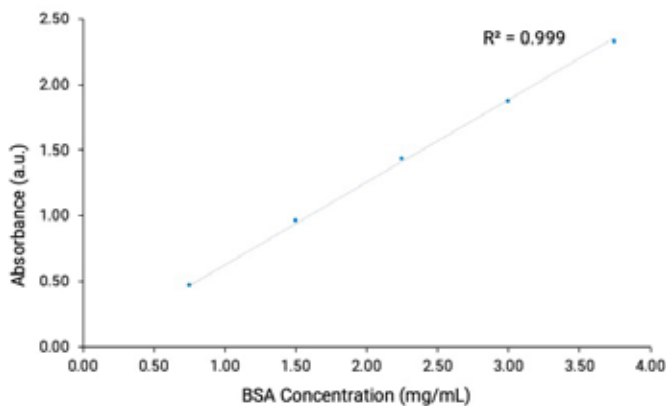


Figura 3. La linealidad del UV-Vis Cary 3500 Multicell se ha demostrado al trazar la absorbancia a 278 nm y la concentración de cinco muestras de BSA.

Reproducibilidad

Para demostrar la reproducibilidad, se realizaron 20 medidas repetidas de la muestra de BSA de 3,0 mg/ml en una cubeta de 70 μ l, 2 x 2,5 mm de apertura y ultramicrovolumen, o en una cubeta estándar de 3,5 ml. Ambas cubetas tenían una longitud del camino óptico de 10 mm. La reproducibilidad (desviación estándar) de las medidas no se vio afectada por el tamaño reducido de la ventana de apertura de la cubeta de ultramicrovolumen, como se muestra en la Figura 4. La desviación estándar de las medidas repetidas es de 0,00042 para la cubeta de ultramicrovolumen de 70 μ l y de 0,00029 para la cubeta estándar de 3,5 ml. El promedio de las medidas

realizadas con la cubeta de ultramicrovolumen fue de 1,863 Abs. El promedio de las medidas realizadas con la cubeta estándar de 3,5 ml fue de 1,858 Abs. La diferencia entre las dos estaba dentro de la incertidumbre de medida del instrumento.

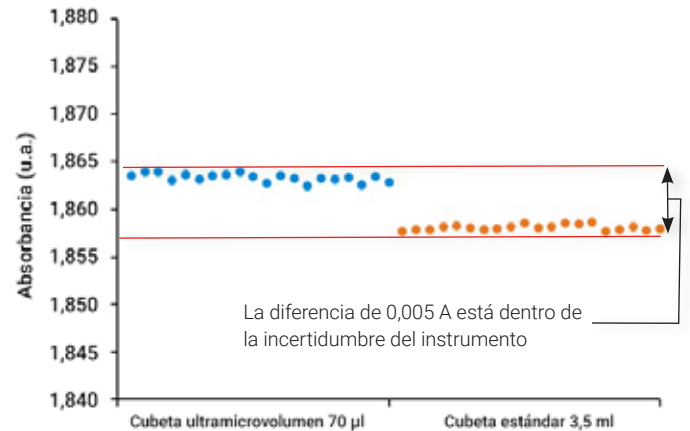


Figura 4. La absorbancia de 20 medidas repetidas para una cubeta de ultramicrovolumen de 70 μ l, comparada con una cubeta estándar de 3,5 ml.

El riesgo de utilizar cubetas de bajo volumen es la reducción del flujo de luz, debido a que la ventana de la cubeta de apertura es más pequeña, lo que normalmente forma parte del diseño de la cubeta. La reducción del flujo de luz contribuye tanto a la disminución del rango lineal de absorbancia como a la disminución de la reproducibilidad de la medida. El Cary 3500 tiene un haz altamente enfocado que asegura la máxima luminosidad a través de la muestra y una reproducibilidad tan buena como una cubeta estándar de 3,5 ml (Figura 4).

Discusión

Las medidas cuantitativas pueden realizarse por medio de la intensidad de los máximos de absorbancia en un espectro UV-Vis si se conoce el coeficiente de absorción. Para muestras como la BSA medida aquí, este coeficiente de absorción es conocido. Cuando se desconoce el coeficiente de absorción, se debe calcular a partir de la pendiente de una curva de calibración creada mediante la medida de múltiples patrones. Este proceso puede llevar mucho tiempo y dar lugar a errores de medida que podrían no identificarse hasta el final del experimento.

Los analistas pueden optar por mejorar la confianza en sus datos al incluir muestras con concentraciones conocidas dentro de una secuencia analítica. Estas muestras actúan como controles internos. El problema con este tipo de medidas es que las muestras y los patrones no se miden al mismo tiempo, por lo que las variables pueden haber cambiado entre las medidas. Mediante la medida de muestras y patrones de calibración en un único punto en

el tiempo, como se demuestra en esta nota (Figura 2), se pueden reducir en gran medida otras variables ambientales o sesgos que podrían influir en la preparación de la muestra.

Cuando se miden muestras que pueden ser inestables, el método de uno a la vez puede presentar errores. Cuando las muestras se encuentran en el banco, esperando su turno para la medida, su absorbancia puede cambiar. Este cambio puede deberse a variaciones en la temperatura, al efecto de la luz sobre la solución o a cambios químicos en la solución. Esto puede ocasionar errores sistémicos en la medida de cuantificación. Al medir todas las posiciones de las cubetas de forma simultánea, el espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multicell elimina estas variables no deseadas y aumenta la confianza en los resultados que se generan. También ahorra mucho tiempo de medida.

Conclusiones

El espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multicell ofrece nuevas posibilidades para el análisis cuantitativo y cualitativo de proteínas. El sistema está diseñado para ser productivo y reproducible, gracias a su exclusivo soporte multicelda integrado e inamovible. Al medir las ocho posiciones de cubetas de forma simultánea, reduce eficazmente cualquier variable no deseada que pueda surgir durante las medidas posteriores. En conjunto, estas características conforman un potente sistema analítico UV-Vis.

Referencias

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

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Impreso en EE. UU., 30 de octubre de 2018
5994-0386ES