

Avantages du spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 multicuve pour l'analyse des protéines

Améliorations de la productivité et de la reproductibilité pour les mesures qualitatives et quantitatives à très faibles volumes



Auteurs

Kevin Grant et Matt Quinn

Agilent Technologies,
Australie

Introduction

Les mesures effectuées avec un spectrophotomètre UV-Vis permettent de vérifier la qualité d'un échantillon de façon rapide et fiable. Elles peuvent également être utilisées pour calculer l'activité spécifique ou estimer le rendement d'une purification et pour identifier les fractions contenant des protéines ou des acides aminés.

Les protéines comportant des acides aminés avec des chaînes latérales aromatiques absorbent la lumière à environ 280 nm. Cela permet leur analyse quantitative avec un spectrophotomètre UV-Vis. D'après la loi de Beer-Lambert (1), la concentration des protéines contenant ces acides aminés peut être déterminée si le coefficient d'absorption est connu. La quantité des échantillons protéiques étant souvent limitée, il est important de pouvoir effectuer ces mesures avec un volume minimal. La réalisation d'un balayage de longueur d'onde peut fournir des informations sur des contaminants potentiels.

Avec son support multicuve intégré et perpétuellement aligné, le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 multicuve est parfaitement adapté à la réalisation de façon fiable et reproductible des mesures qualitatives et quantitatives avec des cuves ultramicrovolumes (figure 1).



Figure 1. Le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 possède un faisceau hautement collimaté d'une largeur inférieure à 1,5 mm. La faible taille du faisceau convient parfaitement aux cuves ayant une petite ouverture, comme celle qui est présentée ici.

Cette étude démontre les avantages du spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 multicuve pour l'analyse des protéines qualitative et quantitative à faible volume. La sérumalbumine bovine (BSA), dont l'usage comme étalon protéique est répandu et dont le coefficient d'absorption est connu, a été utilisée pour cette analyse.

Données expérimentales

Échantillons

Un tampon phosphate salin (PBS) à 0,01 M a été préparé avec un pH de 7,0. Une solution mère de BSA à 10 mg/mL a été préparée, puis diluée à 0,75, 1,50, 2,25, 3,00 et 3,75 mg/mL.

Six cuves ultramicrovolumes de 70 μ L, avec une ouverture de 2 x 2,5 mm et un trajet optique de 10 mm, ont été utilisées pour les mesures (figure 1). Une cuve contenait la référence et les cinq autres contenaient les échantillons. Une cuve de quartz standard de 3,5 mL et de 10 mm de trajet optique a été utilisée pour les mesures de reproductibilité. Le tampon PBS a été utilisé comme solution de référence.

Instrumentation et méthode

Toutes les mesures ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 multicuve. Un balayage en longueur d'onde a été effectué entre 250 et 350 nm, avec un temps d'intégration du signal de 1 seconde et un intervalle de mesure de 1 nm. Le système n'a requis aucun

préalignement.

Pour démontrer la reproductibilité, les mesures de la solution de BSA à 3,0 mg/mL ont été répétées 20 fois à l'aide d'une cuve ultramicrovolume (70 μ L), en utilisant une cuve ultramicrovolume identique contenant du tampon PBS dans la position de la référence. Les mesures ont également été répétées 10 fois avec la même solution et une cuve de quartz standard de 3,5 mL et de 10 mm de trajet optique. Dans ce cas, une cuve identique contenant du tampon PBS a été utilisée comme référence. Ces mesures ont toutes été effectuées à 278 nm avec un temps d'intégration du signal de 1 seconde et une bande passante spectrale de 2 nm.

Résultats

Mesures simultanées

Le blanc et les cinq échantillons de BSA ont été mesurés simultanément dans le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 multicuve à l'aide de cuves ultramicrovolumes (2 x 2,5 mm d'ouverture et 10 mm de trajet optique). Un balayage en longueur d'onde a été réalisé de 250 à 350 nm pour permettre une analyse qualitative des échantillons (figure 2). Ces données ont ensuite été utilisées pour évaluer la linéarité de l'instrument (voir la section « Linéarité dans les microcuves » ci-après).

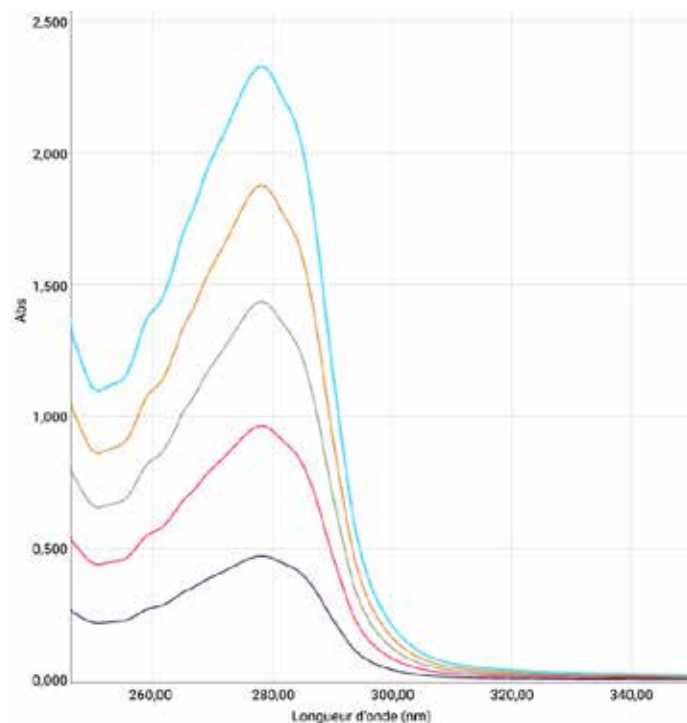


Figure 2. Balayages de longueur d'onde de cinq échantillons de BSA collectés simultanément dans des cuves ultramicrovolumes de 70 μ L.

Pureté des protéines

L'intensité de l'absorbance à 350 nm peut être utilisée pour quantifier et remédier à la présence de tout contaminant dans un échantillon protéique. Comme le montre la figure 2, l'absorbance à 350 nm est nulle pour les échantillons examinés dans cette étude. La concentration en BSA de ces échantillons peut donc être déterminée avec précision puisqu'elle est directement proportionnelle à l'intensité au maximum du pic sur le spectre. Puisqu'il n'y a pas d'impuretés, aucune correction n'est nécessaire.

Linéarité dans les microcuves

Le maximum du pic pour chaque balayage de longueur d'onde de la BSA est situé à 278 nm (figure 2). L'intensité de l'absorbance du pic à 278 nm a été extraite à l'aide du logiciel Cary UV Workstation et représentée en fonction de la concentration en protéine pour chacun des échantillons mesurés (figure 3). Ces données démontrent clairement la linéarité du Cary 3500 (figure 3). Elles montrent que la plage linéaire s'étend pratiquement jusqu'à une absorption de 2,5 u.a., même avec des cuves ultramicrovolumes d'ouverture réduite.

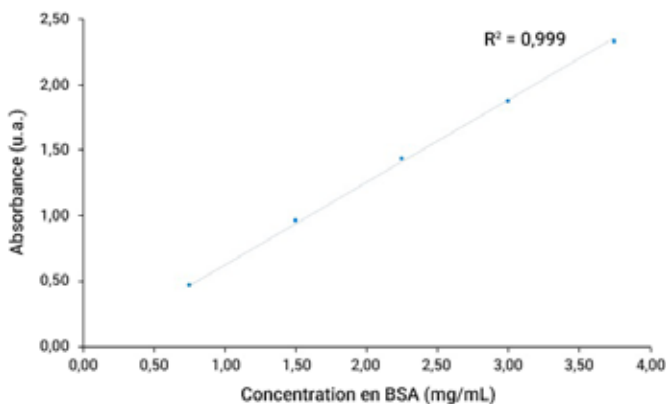


Figure 3. Le tracé de l'absorbance à 278 nm en fonction de la concentration des cinq échantillons de BSA démontre la linéarité du spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 multicuve.

Reproductibilité

Pour démontrer la reproductibilité, les mesures de l'échantillon de 3,0 mg/mL de BSA ont été répétées 20 fois, soit dans une cuve ultramicrovolume de 70 μ L et de 2 x 2,5 mm d'aperture, soit dans une cuve standard de 3,5 mL. Le trajet optique des deux types de cuves était de 10 mm. La reproductibilité (l'écart-type) des mesures n'a pas été affectée par la taille réduite l'ouverture de la fenêtre de la cuve ultramicrovolume, comme le montre la figure 4. L'écart-type pour les mesures répétées était de 0,00042 avec la cuve ultramicrovolume de 70 μ L et de 0,00029 avec la cuve standard de 3,5 mL.

La moyenne des mesures correspondait à une absorption de 1,863 u.a. avec la cuve ultramicrovolume, tandis qu'elle était de 1,858 u.a. avec la cuve standard de 3,5 mL. La différence entre ces deux valeurs était comprise dans la plage d'incertitude des mesures de l'instrument.

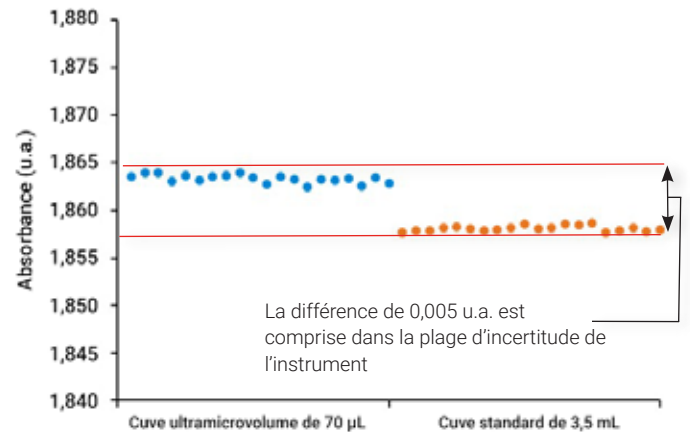


Figure 4. Absorbance des 20 mesures répétées avec une cuve ultramicrovolume de 70 μ L par rapport à une cuve standard de 3,5 mL.

L'utilisation de cuves à faible volume comporte un risque de réduction du flux lumineux, car ces cuves ont souvent des fenêtres avec une ouverture de petite taille. La réduction du flux lumineux contribue à la diminution de la plage linéaire d'absorbance et de la reproductibilité des mesures. Le faisceau du Cary 3500 est hautement focalisé et assure un flux lumineux maximal à travers l'échantillon qui permet d'obtenir une reproductibilité aussi bonne qu'avec une cuve standard de 3,5 mL (figure 4).

Discussion

Des mesures quantitatives peuvent être effectuées à partir de l'intensité maximale des pics d'absorbance d'un spectre UV-Vis si le coefficient d'absorption est connu. Ce coefficient d'absorption est connu pour les échantillons comme la BSA mesurée dans cette étude. Lorsque le coefficient d'absorption n'est pas connu, il doit être calculé à partir de la pente de la courbe d'étalonnage générée en mesurant plusieurs étalons. Ce processus peut s'avérer chronophage et entraîner des erreurs de mesure qui ne sont pas détectées avant la fin de l'expérience.

Certains analystes choisissent d'améliorer la fiabilité de leurs données en incluant des échantillons de concentration connue dans la séquence des analyses. Ces échantillons jouent le rôle de contrôle interne. Le problème avec ce type de mesure est que les échantillons et les étalons ne sont pas mesurés en même temps et donc que des variables peuvent subir des modifications entre les mesures. En mesurant les

échantillons et les étalons au même moment, comme illustré dans cette note d'application (figure 2), les autres variables environnementales ou les biais dans la préparation des échantillons peuvent être grandement réduits.

Pour les échantillons instables, la méthode consistant à effectuer une mesure à la fois est susceptible d'introduire des erreurs. Pendant que les échantillons restent sur la paillasse avant d'être mesurés, leur absorbance peut varier. Cette variation peut être due à des changements de température, à l'effet de la lumière ambiante sur la solution ou à des changements chimiques dans la solution. Cela peut introduire des erreurs systémiques dans les mesures de quantification. En permettant les mesures simultanées à toutes les positions de cuves, le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 multicuve supprime ces variables indésirables et améliore la fiabilité des résultats générés. Il offre aussi un gain de temps considérable dans la réalisation des mesures.

Conclusions

Le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 multicuve offre de nouvelles possibilités pour l'analyse quantitative et qualitative des protéines. Cet instrument a été conçu pour assurer productivité et reproductibilité, grâce à son support multicuve immobile intégré. En permettant d'effectuer simultanément les mesures aux huit positions de cuves, il réduit efficacement les variables indésirables pouvant affecter des mesures successives. L'ensemble de ces fonctionnalités en fait un système UV-Vis analytique très performant.

Références

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

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Imprimé aux États-Unis, le 30 octobre 2018
5994-0386FR