

## Cary 3500 Multicell UV-Vis를 이용한 단백질 분석의 장점

극미량 정성 및 정량 측정의 생산성 및 재현성 향상



### 저자

Kevin Grant, Matt Quinn

Agilent Technologies,  
Australia

### 서론

UV-Vis 분광기를 이용한 측정은 빠르고 안정적인 시료 품질 관리 검사를 가능하게 합니다. 특정 활성도를 계산하거나 정제 후 수율을 추정하고 단백질이나 아미노산을 포함한 혼합물을 식별하는 데도 사용할 수 있습니다.

방향족 측색에 아미노산이 있는 단백질은 약 280nm에서 빛을 흡수합니다. 때문에 UV-Vis 분광기를 이용해 정량 분석을 할 수 있습니다. 흡광도 계수를 안다면 램버트비어 법칙(1)에 따라 해당 아미노산을 포함한 단백질의 농도를 측정할 수 있습니다. 단백질 시료의 양은 한정된 경우가 많으며 시료 보존을 위해서는 최저 주입량으로 시료를 측정하는 것이 중요합니다. 파장 스캔을 수행하면 잠재적 오염물에 대한 정보를 얻을 수 있습니다.

Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광기는 조정된 고정 멀티셀 홀더가 내장되어 있어, 초소형 큐벳을 이용한 재현성이 있고 신뢰성 높은 정성 및 정량 측정에 이상적인 기기입니다 (그림 1).



그림 1. Cary 3500 UV-Vis 분광기는 너비가 1.5mm 미만인 매우 세밀하게 조준된 빔(beam)을 사용합니다. 그림과 같이, 빔 크기가 작아 구경이 작은 큐벳에 사용하기 좋습니다.

본 연구에서는 Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광기를 이용한 미량 정성 및 정량 단백질 분석의 이점을 알아봅니다. 소 혈청 알부민(BSA)은 흡광도 계수가 알려져 있고 일반적으로 사용하는 단백질 표준물질로, 본 실험에서도 이를 사용하였습니다.

## 실험

### 시료

0.01M 인산염 완충액(PBS)을 pH 7.0이 되게 준비하였습니다. 10mg/mL BSA 원액을 제조한 다음, 각각 0.75mg/mL, 1.50mg/mL, 2.25mg/mL, 3.00mg/mL, 3.75mg/mL로 희석하였습니다.

구경이 2 x 2.5mm이고 광학 경로 길이가 10mm인 70µL 초소형(µL) 큐벳 6개를 측정에 사용하였습니다(그림 1). 하나는 참조 용액으로, 5개는 시료로 사용하였습니다. 재현성 있는 측정을 위해 표준 석영 큐벳(부피 3.5mL, 광학 경로 길이 10mm)을 사용하였습니다. PBS 완충액은 참조 용액으로 사용하였습니다.

### 기기 및 분석법

모든 측정에는 Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광기를 사용하였습니다. 파장 스캔은 250~350nm 범위에서 신호 평균 시간 1초, 데이터 간격 1nm로 수행하였습니다. 시스템을 사전 조정할 필요가 없었습니다.

재현성을 입증하기 위해 3.0mg/mL BSA 용액을 초소형 큐벳(70µL)으로 20회 반복 측정하였습니다. 레퍼런스 위치는 PBS 완충액이 담긴 동일한 초소형 큐벳이었습니다. 동일한 용액을 광학 경로 길이가 10mm인 표준 3.5mL 석영 큐벳으로 10회 반복 측정하였습니다. 이 경우, PBS 완충액이 담긴 동일한 큐벳을 레퍼런스로 사용하였습니다. 이 측정은 모두 278nm에서 신호 평균 시간 1초, 스펙트럼 대역폭이 2nm인 조건에서 측정하였습니다.

## 결과

### 동시 측정

Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광기에서 바탕 시료와 BSA 시료 5개를 동시에 측정하였습니다. 측정 시 초소형 큐벳(구경 2 x 2.5mm, 광학 경로 길이 10mm)을 사용하였습니다. 250~350nm에서 파장을 스캔해 시료를 정성 분석하였습니다(그림 2). 그런 다음, 이 데이터를 이용해 장비의 직선성을 평가하였습니다(다음 "마이크로셀 직선성" 섹션 참조).

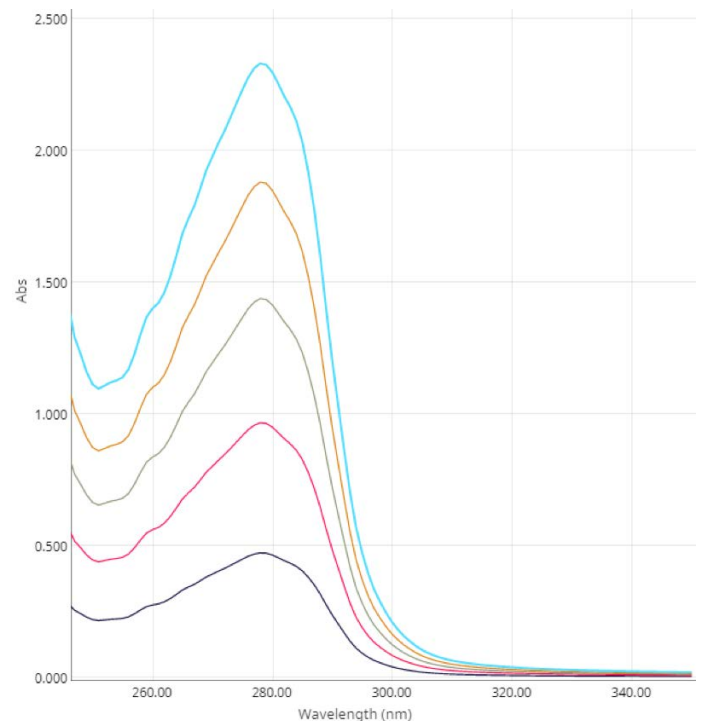


그림 2. 70µL 초소형 큐벳에서 BSA 시료 5개의 파장을 동시에 수집하였습니다.

### 단백질 순도

350nm에서의 흡광도 세기를 이용하여 단백질 시료에 있는 오염물을 정량하고 보정할 수 있습니다. 그림 2와 같이 이 실험에서 350nm에서의 시료 흡광도 세기는 0Abs이었습니다. 따라서 시료의 BSA 농도는 스펙트럼의 최대 피크 세기에 정비례하기 때문에 정확히 측정할 수 있습니다. 불순물 보정이 필요 없습니다.

### 마이크로셀 직선성

각 BSA 파장 스캔에서 최대 피크는 278nm에서 나타났습니다(그림 2). Cary UV Workstation 소프트웨어를 사용하여 278nm 피크에서의 각 시료의 흡광도 세기를 추출하고 측정 시료의 단백질 농도를 도표화 하였습니다(그림 3). 이 데이터는 Cary 3500 시스템의 직선성을 명확히 입증하였습니다(그림 3). 데이터에 따르면 직선 범위는 작은 구경의 초소형 큐벳을 사용한 경우에도 2.5Abs에 가깝게 확장되었습니다.

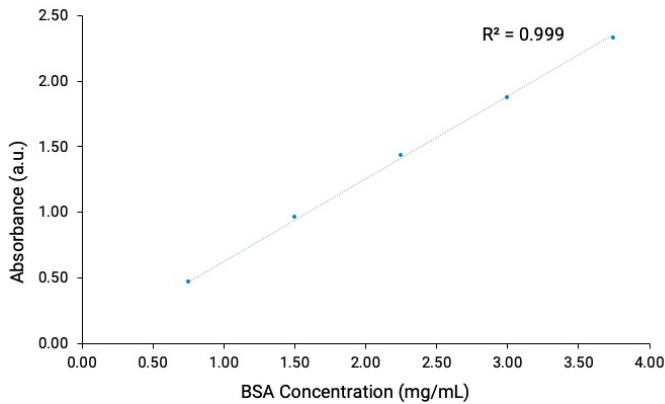


그림 3. 278nm에서의 5개 BSA 시료 흡광도와 농도로 나타낸 Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광기의 직선성

### 재현성

재현성을 입증하기 위해 2 x 2.5mm 구경의 70µL 초소형 큐벳 또는 3.5mL 표준 큐벳에서 3.0mg/mL BSA 시료를 20회 반복 측정하였습니다. 두 큐벳은 광학 경로 길이가 모두 10mm입니다. 측정의 재현성(표준 편차)은 그림 4와 같이 초소형 큐벳의 구경이 감소하더라도 변화가 없었습니다. 반복 측정값의 표준 편차는 70µL 초소형 큐벳의 경우 0.00042이고 표준 3.5mL 큐벳의 경우 0.00029이었습니다. 초소형 큐벳을 사용한 평균 측정값은 1.863Abs이고 표준 3.5mL 큐벳을 사용한 평균 측정값은 1.858Abs이었습니다. 두 값의 차이는 기기의 측정 불확도 허용 범위 내에 있었습니다.

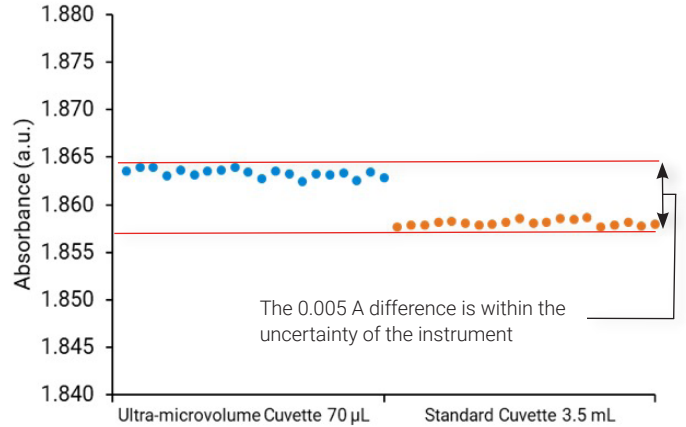


그림 4. 70µL 초소형 큐벳과 표준 3.5mL 큐벳으로 20회 반복 측정된 흡광도 비교

소형 큐벳을 사용할 경우 큐벳 설계상 큐벳 구경이 작아 광선 투과량이 감소하는 경우가 많습니다. 광선 투과량이 감소하면 흡광도 범위의 직선성과 측정 재현성이 감소합니다. Cary 3500은 초점이 고도로 집중된 빔을 사용해 시료를 통과하는 광선과 재현성을 표준 3.5mL 큐벳 수준으로 극대화합니다(그림 4).

### 투의

흡광도 계수를 알 경우 UV-Vis 스펙트럼에서 최대 흡광도 세기로 정량 측정을 수행할 수 있습니다. 본 실험의 BSA와 같은 시료의 경우 흡광도 계수가 알려져 있습니다. 흡광도 계수를 모를 경우 여러 표준물질로 작성한 검량선의 기울기를 통해 계산해야 합니다. 이런 계산에는 많은 시간이 소요되며, 실험이 끝날 때까지 측정 오류를 알아채지 못할 수 있습니다.

분석자는 분석 시퀀스에 농도를 알고 있는 시료를 포함시켜 데이터의 신뢰도를 높일 수 있습니다. 이 시료는 내부 표준물질 역할을 합니다. 이런 방식으로 측정할 경우, 시료와 표준물질이 동시에 측정되지 않아, 측정 사이에 변화하는 변수가 있을 우려가 있습니다. 이 응용 자료에서와 같이 시료 및 검량 표준물질을 동시에 측정할 경우 다른 환경 변수나 시료 전처리에 영향을 미칠 만한 편향이 크게 감소합니다(그림 2).

불안정한 시료를 한 번에 하나씩 측정하는 방식으로 측정하면 오류가 발생할 수 있습니다. 시료가 측정을 위해 대기하는 동안 흡광도가 변화할 수 있습니다. 이는 온도 변화, 용액에 닿는 빛의 영향, 용액의 화학적 변화가 원인일 수 있습니다. 이로 인해 정량 측정에서 시스템 오류가 발생할 위험이 있습니다. Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광기는 모든 큐벳 위치를 동시에 측정하기 때문에 이런 원치 않는 변수를 제거하고 결과의 신뢰도를 높입니다. 또한 측정 시간을 상당히 단축할 수 있습니다.

## 결론

Cary 3500 UV-Vis Multicell 분광기는 정량 및 정성 단백질 분석에 새로운 가능성을 제시합니다. 이 시스템은 고유한 고정 멀티셀 홀더를 내장하여 생산성 및 재현성을 높이도록 설계되었습니다. 모든 8개 큐벳 위치를 동시에 측정하기 때문에 순차적 측정 시 발생할 수 있는 원치 않는 변수를 효과적으로 제거합니다. 이러한 기능들이 결합되어 강력한 분석용 UV-Vis 시스템을 구성합니다.

## 참고문헌

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

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

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018  
한국에서 인쇄, 2018년 10월 30일  
5994-0386KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418  
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부  
고객지원센터 080-004-5090 [www.agilent.co.kr](http://www.agilent.co.kr)