

タンパク質分析における Cary 3500 マルチセル UV-Vis の利点

極低容量の定性および定量測定の実産性と再現性が向上

著者

Kevin Grant and Matt Quinn
Agilent Technologies,
Australia



はじめに

UV-Vis 分光光度計を用いた測定は、サンプルの高速かつ信頼性の高い品質管理チェックを実現します。また、比活性度の計算や精製後の収率の推定、タンパク質やアミノ酸を含むフラクションの同定に使用できます。

芳香族の側鎖を持つアミノ酸を含むタンパク質は、約 280 nm の光を吸収します。これにより、UV-Vis 分光光度計を用いた定量分析が可能になります。ランベルト・ベールの法則 (1) に従って、吸光係数が既知の場合、これらのアミノ酸を含むタンパク質の濃度を求めることができます。多くの場合、タンパク質のサンプル量は限られているため、最小量で測定できることがサンプルハンドリングでは重要です。波長スキャンを実行することで、潜在的な汚染物質に関する情報が得られます。

Cary 3500 マルチセル UV-Vis は、パーマネントアライメントされたマルチセルホルダが搭載されており、ウルトラマイクロボリュームキュベットによる再現性と信頼性に優れた定性および定量測定に最適です (図 1)。



図 1. Cary 3500 UV-Vis は幅 1.5 mm 未満の高集光ビームを利用できます。ビームサイズが小さいため、この図のような開口部が小さいキューベットにも最適です。

今回の研究では、低容量タンパク質の定性および定量分析におけるCary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計の利点を実証します。吸光係数が既知のタンパク質標準として一般的に使用されているウシ血清アルブミン (BSA) を、今回の分析に用いました。

実験方法

サンプル

0.01 M のリン酸緩衝液 (PBS) を pH 7.0 に調製して準備しました。10 mg/mL の BSA 原液を準備し、0.75、1.50、2.25、3.00、3.75 mg/mL に希釈しました。

測定開口部が 2 x 2.5 mm で光路長が 10 mm の70 μ L ウルトラマイクロボリュームキューベットを 6 つ使用して測定しました (図 1)。1 つはリファレンス用として使用し、5 つはサンプル用として使用しました。標準の 3.5 mL、光路長 10 mm の石英製キューベットを再現性測定に使用しました。PBS 緩衝液をリファレンス溶液として使用しました。

機器とメソッド

すべての測定に、Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計を使用しました。1 秒の信号平均化時間および 1 nm のデータ間隔で 250 ~ 350 nm 範囲の波長スキャンを実行しました。システムのプリアライメントは不要でした。

再現性を実証するために、3.0 mg/mL BSA 溶液をウルトラマイクロボリュームキューベット (70 μ L) で 20 回の繰り返し測定を行いました。このとき同時に、リファレンスポジションでは同一のウルトラマイクロボリュームキューベットで PBS 緩衝液を測定しました。標準の 3.5 mL、光路長 10 mm の石英製キューベットを用いて、同一溶液を 10 回繰り返し測定する実験を、別に 1 セット実行しました。リファレンスとして、同一キューベットで PBS 緩衝液を測定しました。これらの測定はすべて、信号平均化時間 1 秒、スペクトルバンド幅 2 nm で 278 nm の測光を行いました。

結果

同時測定

ブランクおよび 5 個の BSA サンプルを Cary 3500 マルチセル UV-Vis で同時に測定しました。ウルトラマイクロボリュームキューベット (開口部が 2 x 2.5 mm で光路長が 10 mm) を使用しました。定性的なサンプル分析が可能になるよう、波長スキャンは 250 ~ 350 nm で実行しました (図 2)。さらに、このデータを使用して、機器の直線性を評価しました (後述のマイクロセルの直線性を参照)。

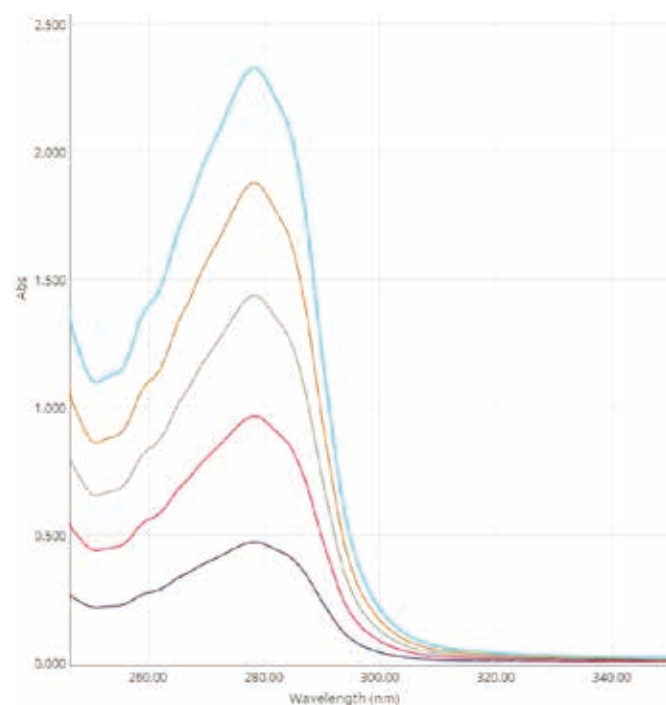


図 2. 70 μ L ウルトラマイクロボリュームキューベット中の 5 つの BSA サンプルで同時に収集された波長スキャン

タンパク質の純度

350 nm の吸光度を使用することで、タンパク質サンプル中の汚染物質の存在を定量し、補正できます。図 2 から分かるように、今回測定したサンプル中の 350 nm での吸光度は 0 Abs です。このため、これらのサンプル中の BSA 濃度はスペクトルのピーク最大値の強度に直接比例するものとして正確に求めることができます。不純物の補正は必要ありません。

マイクロセルの直線性

各 BSA の波長スキャン結果より、最大吸収波長が 278 nm であることがわかります (図 2)。Cary UV ワークステーションソフトウェアを使用して、278 nm ピークでの吸収強度をサンプルごとに抽出し、測定対象の各サンプル中のタンパク質濃度に対してプロットしました (図 3)。このデータは Cary 3500 システムの直線性を明確に示しています (図 3)。開口部の小さいウルトラマイクロポリウムキュベットを使用した場合でも、直線範囲は 2.5 Abs 近くまで延びていることが、このデータによって示されています。

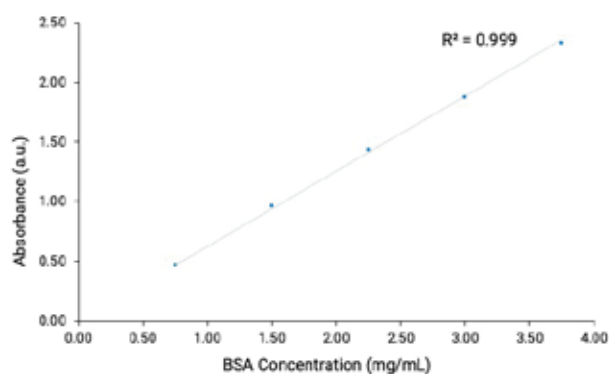


図 3. 278 nm での吸光度と 5 個の BSA サンプルの濃度をプロットすることにより示された Cary 3500 マルチセル UV-Vis の直線性

再現性

再現性を実証するために、開口部 2 x 2.5 mm の 70 μ L のウルトラマイクロポリウムキュベットと、3.5 mL 標準キュベットの両方で、3.0 mg/mL BSA サンプルの測定を 20 回繰り返しました。どちらのキュベットも光路長は 10 mm でした。測定の再現性 (標準偏差) は、図 4 に示すように、開口部のサイズが小さいウルトラマイクロポリウムキュベットでも影響を受けませんでした。繰り返し測定の標準偏差は、70 μ L ウルトラマイクロポリウムキュベットでは 0.00042、標準 3.5 mL キュベットでは 0.00029 でした。ウルトラマイクロポリウムキュベットを使用した場合の測定値の平均は 1.863 Abs でした。標準 3.5 mL キュベットを使用した場合の測定値の平均は 1.858 Abs でした。この 2 種類のキュベットの差は、機器が持つ測定値のばらつきの範囲内に収まりました。

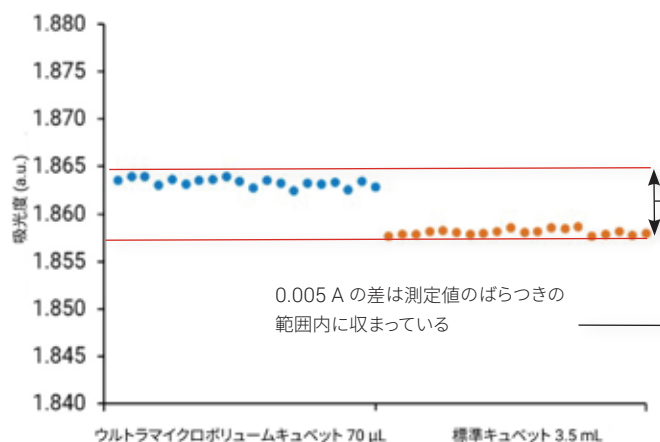


図 4. 70 μ L ウルトラマイクロポリウムキュベットと標準 3.5 mL キュベットでの吸光度の 20 回繰り返し測定の比較

低容量キュベットを使用する場合のリスクは、光スループットの減少です。その原因は、キュベットデザインの共通部分であるキュベットの開口窓がより小さいためです。光スループットの減少は、吸光度の直線範囲の縮小および測定の再現性の低下を招きます。Cary 3500 は集束度の高いビームを特徴とし、最大限の光をサンプルに通過させ、標準 3.5 mL キュベットと同様の再現性を確保します (図 4)。

考察

吸光係数が既知の場合、UV-Vis スペクトルでの最大吸光強度を用いて定量測定が行えます。今回測定した BSA のようなサンプルでは、この吸光係数は既知のものです。吸光係数が未知の場合、複数の標準を測定して作成された検量線の傾きから計算する必要があります。これは時間がかかるプロセスであり、実験の終了まで認識されることのない測定誤差を招くことがあります。

分析者は、データの信頼性を向上させるために、分析シーケンス内に濃度が既知のサンプルを含めることもできます。これらのサンプルは内部コントロールとして機能します。この種の測定で考慮すべきことは、サンプルと標準が同時に測定されないことです。このため、測定間でサンプルが変化する可能性があります。本アプリケーションノートに示すように、サンプルとキャリブレーション標準を 1 箇所と同時に測定することによって (図 2)、他の環境変動やサンプル前処理に影響を与える偏りを大幅に低減することができます。

不安定なサンプルを測定する場合、1 サンプルごとに行う測定では誤差が生じる可能性があります。サンプルをベンチに配置し測定の順番がくるのを待機している間に、吸光度がシフトすることがあります。温度変化、溶液の光曝露の影響、溶液中の化学的变化がシフトの原因と考えられます。これにより、定量測定において全体的な誤差が生じる可能性があります。Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計ではすべてのキュベットポジションを同時に測定することによって、これらの不要な可変性要素を排除し、導き出される結果の信頼性を向上させます。また、測定時間も大幅に短縮します。

結論

Cary 3500 UV-Vis マルチセル分光光度計は、タンパク質の定量および定性分析の新たな可能性を生み出します。高い生産性と再現性を実現できるように設計されており、可動部のない独自のマルチセルホルダが搭載されています。8 個のキュベットポジションすべてを同時に測定することによって、その後の測定中に生じる可能性のある不要な可変性要素を効果的に減らすことができます。これらの機能により、優れた分析用 UV-Vis システムを実現しています。

参考文献

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

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2018
Printed in Japan, October 30, 2018
5994-0386JAJP