



Революция в аналитическом ультрацентрифугировании: новая центрифуга Optima AUC

Тип материала: рекомендации по применению
 Чад Шварц, кандидат наук (Chad Schwartz, Ph.D.), Beckman Coulter Inc.,
 Индианаполис, штат Индиана, 46268 (Indianapolis, IN 46268)



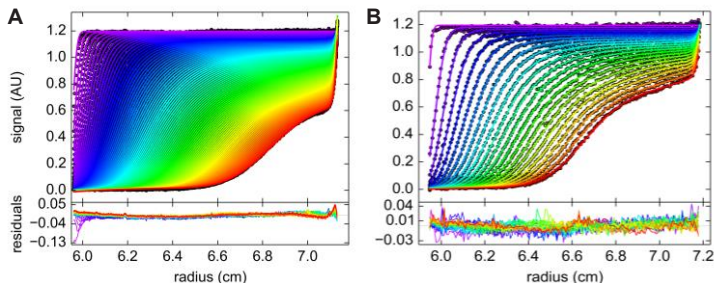
Аннотация

Аналитическая ультрацентрифуга Optima AUC – одна из последних разработок компании Beckman Coulter и благодаря своим характеристикам обладает рядом преимуществ в качестве платформы аналитического ультрацентрифугирования по сравнению с предшествующей системой ProteomeLab. Наряду с множеством усовершенствований пользовательского интерфейса на новой платформе, были существенно модернизированы оптическая, термическая и приводная системы аналитической ультрацентрифуги Optima AUC, что повысило удобство прибора для конечного пользователя с точки зрения качества данных и простоты использования. На новой системе уже были протестированы ряд различных образцов, от белков и наноматериалов до вирусных векторов и наночастиц на основе липидов, и результаты оказались удовлетворительными с точки зрения качества и воспроизводимости данных и потенциальных возможностей системы, особенно в случае выполнения экспериментов с несколькими значениями длины волны. В этой статье представлены сведения, подтверждающие преимущества нового прибора, а также данные, которые доказывают обоснованность концепции в отношении вышеуказанных практических приложений.



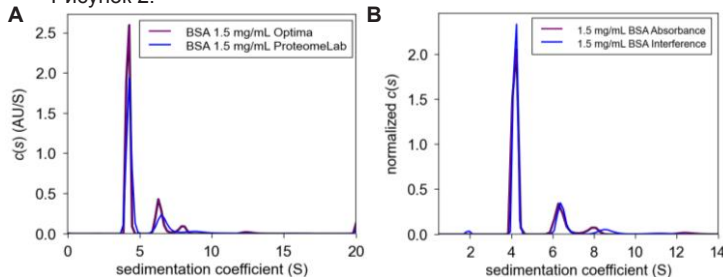
Сравнение с системой ProteomeLab. Качество, точность и воспроизводимость данных

Рисунок 1.



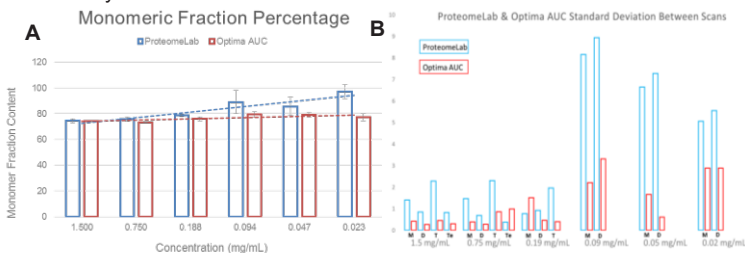
Исходные данные, полученные при седиментации БСА в течение 3 часов при скорости 42 000 об/мин и температуре 20 °C на ультрацентрифугах Optima AUC (A) и ProteomeLab (B).

Рисунок 2.



Сравнение графиков c(s) в программе SEDFIT, полученных при концентрации БСА в ФСБ 1,5 мг/мл, между ультрацентрифугами (A) и оптическими системами в ультрацентрифуге Optima AUC (B).

Рисунок 3.



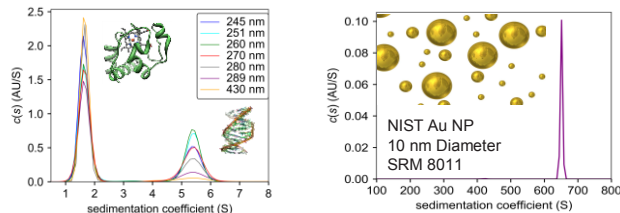
В серии семикратных разведений в 5 повторностях частицы БСА анализировали на содержание мономера (A) и среднеквадратическое отклонение (B).

Аналитические ультрацентрифуги Optima не предназначены и не используются в медицинских целях.

© Beckman Coulter, Inc. Все права защищены. Beckman Coulter, стилизованный логотип, а также марки продуктов и услуг Beckman Coulter, упомянутые здесь являются торговыми марками или зарегистрированными торговыми марками Beckman Coulter, Inc. в США и других странах.
 CENT-2866PST07.17RU

На рисунке 1 показана частота сканирования и радиальное разрешение на системе Optima AUC. При увеличенной почти в 5 раз частоте сканирования и увеличенном в 3 раза количестве радиальных точек ввода данных система Optima AUC генерирует почти в 15 раз больше данных, чем ее предшественник ProteomeLab, что обеспечивает большее число совпадений и более низкое среднеквадратическое отклонение. На рисунке 2A график c(s), полученный с помощью программного обеспечения SEDFIT, демонстрирует эквивалентность данных ультрацентрифуг ProteomeLab и Optima AUC для пика мономера БСА и более высокое разрешение между пиками димера и тримера. Небольшой сдвиг вправо линии димера БСА указывает на неспособность системы ProteomeLab различать пики более высокого порядка при концентрации 1,5 мг/мл, тогда как ультрацентрифуга Optima AUC, ввиду более высокого отношения сигнал/шум, способна различать оба пика. На рисунке 2B продемонстрирована сопоставимость систем поглощения и интерференции ультрацентрифуги Optima AUC. И наконец, анализ разведений БСА повторяли 5 раз на каждой ультрацентрифуге, после чего графики c(s) объединяли для оценки способности систем выявлять содержание частиц. В серии семикратных разведений ультрацентрифуга Optima AUC выдавала очень линейный результат по сравнению с системой ProteomeLab с точки зрения содержания частиц в каждой стехиометрии БСА (рисунок 3A). Результаты указывают на более высокую чувствительность системы Optima AUC. Кроме того, было установлено, что воспроизводимость между прогонами была улучшена на новом инструменте, поскольку среднеквадратическое отклонение между циклами при каждой стехиометрии было ниже (рисунок 3B).

Новые области применения. Обоснованность концепции



Благодаря более высокой скорости сканирования, более высокому радиальному разрешению и возможности анализа при нескольких значениях длин волн ультрацентрифуга Optima AUC открывает широкий спектр новых применений. На рисунке слева цитохром c, гемсодержащую митохондриальную оксидазу, анализировали с 60 bpds ДНК и анализировали в общей сложности при 50 отдельных значениях длин волн в одной ячейке в рамках одного анализа. С помощью деконволюционного анализа сигнала при каждой длине волны можно получить молярное соотношение или стехиометрию взаимодействующих частиц белка и компонента ДНК. На рисунке справа показана характеристика стандартного эталонного материала № 8011 Национального института по стандартизации и технологии (NIST), наночастицы золота размером 10 нм, с точки зрения коэффициента седиментации. Эталон, ранее охарактеризованный институтом NIST по размеру частиц с применением различных методов, таких как AFM, SEM, TEM, метод динамического рассеяния света и малоугловое рентгеновское рассеяние, анализировали с помощью ультрацентрифуги Optima AUC в целях определения коэффициента трения, коэффициента седиментации и эквивалентности другим методам. При использовании буферного раствора и сканировании исключительно при длине волны 517 нм система быстрого поглощения смогла произвести достаточное количество сканирований при скорости 5000 об/мин, что позволило получить точную характеристику тяжелой наночастицы.

