



Новая центрифуга Avanti J-15 повышает сохранность и максимизирует выход образцов

Джулия П. Лучано-Чади | Beckman Coulter, Inc., Индианаполис, IN 46268

Обзор

Обеспечение сохранности образцов – это конечная цель любого рабочего процесса, предназначенного для того, чтобы получить качественные образцы для последующей работы. Часто первым этапом обработки биологических и химических материалов является центрифугирование. Высокая чистота и достаточное количество образца влияют на результаты научной работы, позволяя повысить качество данных и минимизируя необходимость повтора этапов методики, что уменьшает потери времени. Новые центрифуги Avanti J-15 компании Beckman Coulter были разработаны с учетом данных потребностей пользователей. Благодаря технологии «Ultra Harmonic Technology» центрифуги Avanti J-15 идеально подходят для работы с образцами, требующими специальных режимов торможения в ходе осаждения или разделения. Центрифуги Avanti J-15 обеспечивают высокую сохранность образцов за счет уменьшения смешивания фракций при разгоне и торможении. В результате увеличивается выход материала, снижается контаминация и повышается эффективность центрифугирования.

Введение

Центрифугирование – это важный первичный этап многих биологических и химических рабочих процессов. Оно широко используется в различных процедурах, включая культивирование тканей, выделение нуклеиновых кислот, обработку крови, очистку белков, выделение вирусов, трансфекцию и фракционирование субклеточных структур. Уже 70 лет компания Beckman Coulter выпускает высококачественные центрифуги, способствующие совершению многочисленных научных открытий. Традиционно основополагающими параметрами, определяющими конструкционные особенности настольных центрифуг, являются время, температура и скорость. Компания Beckman Coulter произвела революцию на рынке, выпустив центрифуги новой конструкции. Благодаря технологии «Ultra Harmonic Technology» центрифуги серии Avanti J-15 позволяют достичь максимальной эффективности и получить максимальный выход образцов при разделении и осаждении.

При торможении образец испытывает воздействие различных сил, что может привести к смешиванию фракций. Технология «Ultra Harmonic Technology» оптимизирует разделение за счет уменьшения изменения сил, воздействующих на образец. В результате увеличивается объем образца в осадке и уменьшается количество загрязняющих компонентов и неосажденного материала в супернатанте. Эффективность разделения особенно

важна для образцов, образующих неплотный, менее вязкий и менее компактный, осадок. При работе с такими образцами требуется использовать модифицированные протоколы, в которых ротор останавливается по инерции (без торможения). Для сравнения эффективности осаждения центрифуг серии Avanti J-15 и других настольных центрифуг, представленных в данный момент на рынке, была проведена серия экспериментов по подготовке электрокомпетентных клеток *E. Coli* DH5-alpha.

Материалы

Компетентные клетки *E. Coli* DH5-alpha (артикул C2989K) производства New England BioLabs. Раствор глицерина (артикул 536407) производства Sigma-Aldrich.

Центрифуга Avanti J-15R (артикул B99517, B99516, B99515, B99514) с ротором JS-4.750 (артикул B77580) и центрифуга Allegra 14R[®] (артикул A99465) с ротором SX4750 (артикул 392806) производства Beckman Coulter.



Рисунок 1. Этап подготовки эксперимента: аликвоты образца бактериальных клеток.

Методы

E. Coli DH5-Alpha выращивали в течение ночи при 37°C и перемешивании 170 об/мин. Ночную культуру охлаждали на водяной бане при 4°C. Затем отбирали образец культуры для измерения оптической плотности (OD_{600}) с помощью спектрофотометра Beckman-Coulter DU730 UV/Vis с длиной оптического пути 10 мм. Образец разводили в соотношении 1:3.

В 50 мл коническую пробирку отбирали аликвоту клеток объемом 40 мл. В дальнейшем использовали по одному образцу для каждой центрифуги: Avanti J-15R, Allegra X-14R и центрифуги другого изготовителя (рисунок 1).

Для первоначального осаждения клеток центрифугирование в каждой центрифуге выполнялось при 3600 *g* в течение 20 минут в режиме максимального разгона и торможения. Осадки отмывали в 20 мл 10% глицерина и центрифугировали при 3600 *g* в течение 20 минут. Чтобы предотвратить потерю образца, для разгона и торможения использовался режим 4. После центрифугирования супернатант аккуратно удаляли и дважды повторяли отмывку глицерином. Затем клетки ресуспендировали в 20 мл натрий-фосфатного буфера (PBS). Аликвоты разводили 1X PBS в соотношении 1:3. Затем с помощью спектрофотометра Beckman-Coulter DU730 UV/Vis измеряли оптическую плотность при длине волны 600 нм.

Результаты и обсуждение

Чтобы показать преимущества технологии «Ultra Harmonic Technology», были приготовлены образцы одинакового объема, и центрифугирование во всех трех центрифугах выполнялось в одинаковых режимах. В таблице 1 приводятся полученные результаты. Оптическая плотность измерялась при разведении 1:3, но количество клеток пересчитывалось с учетом разведения. После завершения этапа выращивания клеток измерялась исходная оптическая плотность, при этом вычисленная концентрация клеток составила 1.35×10^9 клеток/мл. При вычислении концентрации клеток (genomics.agilent.com) использовался коэффициент экстинкции *E. Coli*, найденный на основе значения оптической плотности (OD_{600}), полученного с помощью спектрофотометра.

После трех циклов отмывки глицерином вычислялся выход клеток и выполнялось сравнение результатов для всех трех центрифуг. Результаты, показанные в таблице 1, наглядно демонстрируют преимущества технологии «Ultra Harmonic Technology», которая обеспечивает сохранность и максимальный выход образца.

Новая центрифуга Avanti J-15 показала превосходные результаты, свидетельствующие о более высокой эффективности разделения и осаждения образцов по сравнению с другими современными моделями. После нескольких отмывок глицерином было потеряно менее 2% образца. Данный результат был получен не только математически, его можно было наблюдать визуально. Образец, извлеченный из центрифуги Avanti J-15 после этапа осаждения, имел прозрачный супернатант, в отличие от образца, извлеченного из центрифуги Allegra X-14R (рисунок 2).

При использовании центрифуги другого производителя потеря образца составила почти 50%, а это может существенно затруднить дальнейшую работу. При невысоком выходе количество материала уменьшается, что приводит к необходимости повторять трудоемкое выделение. Незапланированное повторение этапов методики ведет к возрастанию затрат, использованию дополнительных ресурсов и привлечению дополнительных сотрудников.

Интересно, что центрифуга Allegra X-14R компании Beckman Coulter показала в три раза более высокую эффективность по сравнению с центрифугой другого изготовителя и обеспечила высокую сохранность образца.

Центрифуга	OD (при разведении 1:3)	Концентрация клеток (клеток/мл) (с учетом разведения)	Потеря образца
Исходная культура клеток	0.56	1.35×10^9	-
Avanti J-15R	0.55	1.33×10^9	1.6%
Allegra X-14R	0.48	1.15×10^9	14%
Центрифуга другого изготовителя	0.30	0.73×10^9	46%

Таблица 1

Различные типы образцов осаждаются по-разному и с разной эффективностью. Образцы, использованные в этой работе, дают мягкий неплотный осадок. При центрифугировании таких образцов очень вероятна потеря материала, поэтому, как правило, для них используются режимы с более длительным разгоном и торможением, чтобы предотвратить смешивание фракций и максимизировать выход образца. Материал, дающий неплотный осадок, встречается в природе (например, водоросли) или его можно создать искусственным образом. Процедура получения электрокомпетентных клеток включает определенное количество этапов отмывки с глицерином. Глицерин – это криопротектор, поддерживающий осмолярность и увеличивающий эффективность электротрансформации. Любопытно, что при отмывке глицерином также ухудшаются адгезивные свойства бактериальных клеток, поэтому для них используются более бережные режимы разгона и торможения номер 4, позволяющие уменьшить смешивание осадка с супернатантом.

Заключение

Сохранность образца и максимальный выход материала критически важны для выполнения исследований. При потере образца может потребоваться повторить эксперимент несколько раз. Недостаточное отделение контаминантов может привести к получению неточных результатов. Технология «Ultra Harmonic Technology» позволяет усовершенствовать процесс разгона и торможения и улучшить качество разделения. Новые центрифуги серии Avanti J-15 готовы решить проблемы, связанные с потерей образца, и дают возможность максимизировать выход материала.

В центрифугах серии Avanti J-15 используется технология «Ultra Harmonic Technology». Технология позволяет реализовать в настольных центрифугах важные функции разгона и торможения, которые в настоящее время уже используются в усовершенствованных ультрацентрифугах, и уменьшить таким образом смешивание фракций на этих чрезвычайно важных этапах. Данная технология вносит в стандартное настольное центрифугирование улучшение, выходящее за пределы таких базовых параметров, как время, температура и скорость. Технология «Ultra Harmonic Technology» максимизирует выход материала. При тех же настройках центрифуга другого изготовителя не позволила добиться столь же высокой сохранности образца, которую удалось получить в наших моделях. Центрифуги серии Avanti J-15 показали эффективность улучшенных режимов разгона и торможения, позволяющих повысить целостность и сохранность образца.

Avanti J-15/J-15R RUO предназначены только для научных исследований.

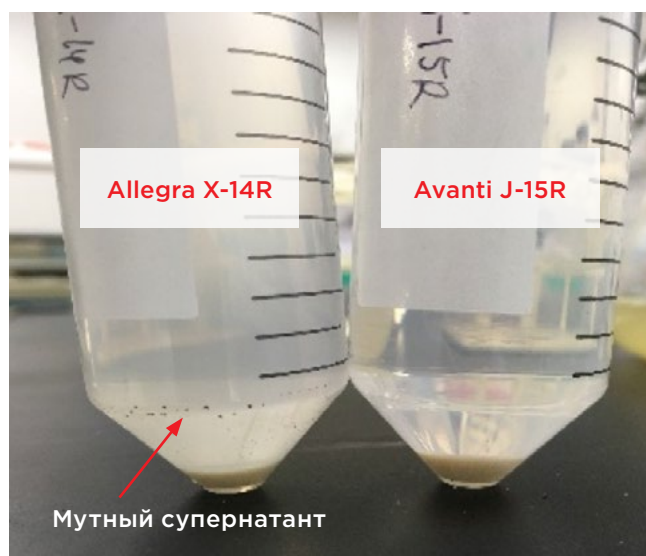


Рисунок 2: Визуальное сравнение образцов, отцентрифугированных в центрифугах Allegra X-14R и Avanti J-15R.