



Линейность результатов изучения олигомеризации БСА методом АУС с использованием оптики поглощения и интерференции

ProteomeLab и Optima AUC

Dean Clodfelter, M.S., Chad Schwartz, Ph.D., Beckman Coulter Inc., 5350 Lakeview Parkway Dr., 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 (АУС) 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, благодаря чему обеспечивается удобство прибора для конечного пользователя с точки зрения качества данных и простоты использования. В данной работе в качестве модельной системы для оценки линейности зависимости концентрации от состояния олигомеризации использовали хорошо изученный белок — бычий сывороточный альбумин (БСА).

Введение

История применения метода АУС для характеристики молекул БСА насчитывает несколько десятилетий, и данный высокостабильный белок используется как негласно признанный образец сравнения для контроля работы инструментов и качества расходных материалов. Аналитическое ультрацентрифугирование представляет собой широко признанную методику, применяемую с 1920-х годов, при которой используется центробежная сила в сочетании с оптическими системами для измерения осаждения частиц в динамике. Изначально используемый для определения таких характеристик белков, как размер, форма, молекулярная масса и чистота, метод АУС стал широко применяться в самых разных областях, включая вирусные векторы, агрегацию, наночастицы, пептиды, липосомы, лекарственные конъюгаты, разработку и контроль рецептуры, а также термодинамические исследования. Аналитическая центрифуга по своим возможностям значительно превосходит приборы для ортогональных биофизических исследований, в которых анализ осуществляется в свободном растворе и имеет ограничения в отношении буферного раствора. Кроме того, данный метод подчиняется основным законам термодинамики, поэтому для анализа не требуются стандартные образцы.

Серия систем аналитического ультрацентрифугирования ProteomeLab производства Beckman Coulter была разработана в начале 1990-х годов и в течение последних двух с половиной десятилетий являлась основным инструментом всех анализов методом аналитического ультрацентрифугирования. В конце 2016 года была выпущена центрифуга Optima AUC, с появлением которой у многих исследователей по всему миру появилось немало идей относительно нового применения системы, способной работать при нескольких длинах волн. Изначально аналитическое ультрацентрифугирование применяли для оценки чистоты, безопасности и времени действия биологических лекарственных препаратов, однако данная технология все чаще используется в рамках контроля качества для оценки общих биологических свойств лекарственных препаратов. Это потребовало более глубокого понимания нормативных требований к валидированным методикам применительно к АУС. Согласно руководству ICH Q2 (R1) по валидации аналитических методик, валидация методики должна включать оценку линейности, предела чувствительности методики и предела количественного определения. В рамках данного исследования серийные разведения БСА в PBS анализировали на предмет линейности методики и отношения сигнал/шум, чтобы оценить возможности АУС в соответствии с руководством ICH Q2 (R1) по валидации методики.

Материалы

Бычий сывороточный альбумин (БСА) компании Sigma-Aldrich.

Аналитические ультрацентрифуги Optima AUC и ProteomeLab XL I, двухсекторная аналитическая ячейка для измерения скорости седиментации, кварцевые окошки, аналитический ротор An-50 Ti и станок для затяжки ячеек производства компании Beckman Coulter, Inc.

Методы

Подготовка образца БСА: Исходный раствор БСА готовили путем разведения порошка БСА в PBS буфере до достижения концентрации 1,5 мг/мл. Затем БСА разводили посредством серии семикратных разведений в PBS буфере. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью спектрофотометра DU730 UV/Vis с установленным ходом луча 10 мм при длине волны 280 нм.

Настройки инструмента: В качестве эталонного буферного раствора, соответствующего среде для растворения образца, использовали PBS буфер. В двухсекторные аналитические ячейки вносили по 440 мкл эталонного буферного раствора и буфера для образца. Ячейки выравнивали в аналитическом роторе An 50 Ti и выдерживали при температуре 20 °C более 1 часа. Затем образцы центрифугировали при скорости 42 000 об/мин и температуре 20 °C, сканировали в течение 6 часов при длине волны 280 нм и рэлеевской интерференции в непрерывном режиме работы. Скорость регистрации данных в системе Optima AUC была установлена на 20 секунд на ячейку для измерения поглощения с радиальным разрешением 10 мкм и на 20 секунд на ячейку для измерения интерференции. Описанный протокол применяли на системах аналитического центрифугирования компании Beckman Optima AUC и ProteomeLab XL-I с использованием одинаковых образцов, полученных в одних и тех же аналитических ячейках, встряхиваемых после каждого цикла.

Анализ данных†: Данные были получены с контроллера аналитической ультрацентрифуги и импортированы в SEDFIT 14.7 g4 (www.analyticalultracentrifugation.com). Данные анализировали с помощью подгоняемых параметров, указанных на рисунке 1. Данные экспортировали в GUSI (<http://biophysics.swmed.edu/MBR/software.html>) и строили график для $c(s)$ с минимальным ограничением значения s при 0,3 S.

Обсуждение результатов

БСА является широко известным альбумином, который образует ассоциаты мономеров, димеров, тримеров и тетрамеров. Он хорошо изучен методом AUC и часто используется для проверки работы аналитического оборудования. Этот белок также использовали для проверки работы новой аналитической системы Beckman Coulter, чтобы установить линейность аналитического сигнала. Серии концентраций вводили в обе системы и анализировали с помощью широко используемого программного обеспечения для определения коэффициента седиментации. Вычисляли интеграл полученного распределения коэффициента седиментации для определения сборки мультимера.

На рисунке 1 приведен график зависимости коэффициента седиментации БСА при концентрации 1,5 мг/мл, отслеживаемого по поглощению при длине волны 280 нм, для центрифуг ProteomeLab и Optima AUC. Как и ожидалось, при этой концентрации БСА будет образовывать более сложные комплексы с четырьмя отдельными видами мономеров до тетрамеров, что можно учитывать на обеих системах. Однако, согласно рисунку 1, система Optima AUC демонстрирует более разрешенный пик при 12,5 S по сравнению с системой ProteomeLab, что связано с чувствительностью новой системы. Поскольку ранее интенсивность света была охарактеризована как практически идентичная на обеих системах, более высокая чувствительность связана с меньшим уровнем шума в системе.

Кроме того, в ходе каждого повторного эксперимента использовали интерферометр Рэля. График коэффициента седиментации, построенный обеими оптическими системами, приведен на рисунке 2. На рисунке видно, что обе оптические системы дают одинаковый результат.

Для того чтобы лучше оценить более высокую чувствительность и точность системы Optima AUC, для каждой системы был проведен ряд анализов в рамках повторных экспериментов. На рисунке 3 сигнал мономера указан на графике относительно концентраций и проанализирован с точки зрения линейности. Коэффициент наклона графика сигнала мономера при анализе на центрифуге ProteomeLab демонстрирует тенденцию к росту по мере уменьшения концентрации, указывая на увеличение фракции мономера по мере уменьшения концентрации. Соответствующий график, полученный при использовании системы Optima AUC, лежит почти горизонтально, указывая на воспроизводимый сигнал мономера (~ 78 % мономера при всех концентрациях). Поскольку известно, что белки диссоциируют при более низких концентрациях, вызывает интерес тот факт, что доля мономера остается стабильной при указанных рабочих концентрациях и условиях эксперимента. Предполагается, что более высокое отношение сигнал/шум в системе Optima AUC по сравнению с системой ProteomeLab (и другим аналитическим оборудованием) позволяет прибору точнее выявлять виды более высокого порядка. Следует отметить, что БСА в концентрации 0,375 мг/мл вытек из ячейки и не анализировался.

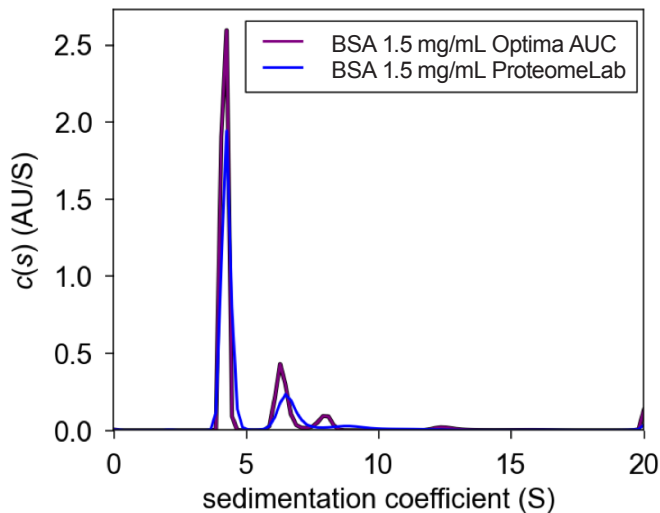


Рисунок 1. График сравнения $c(s)$ при концентрации 1,5 мг/мл между системами ProteomeLab и Optima AUC

График коэффициента седиментации БСА $c(s)$ на одной и той же ячейке разных систем. Приведенный далее график демонстрирует сходство значений коэффициента седиментации мономера БСА, но при этом наблюдается различие в видах более высокого порядка.

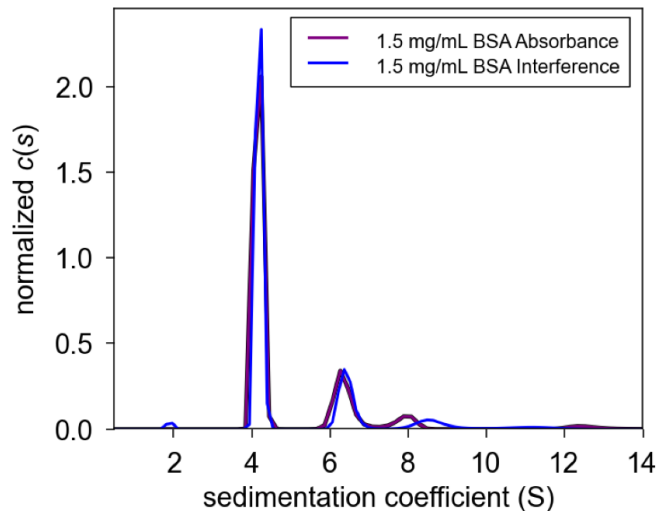


Рисунок 2. Сравнительный график интерференции и поглощения $c(s)$ при концентрации 1,5 мг/мл в системе Optima AUC

График коэффициента седиментации БСА $c(s)$ на одной и той же ячейке при использовании разных оптических систем на Optima AUC. Следующий график демонстрирует сходство результатов абсорбционной и интерференционной оптических систем на Optima AUC. Незначительные различия скорее всего связаны с погрешностью оператора при загрузке (несовместимость мениска, неправильный подбор буферного раствора, выравнивание ячейки) или с дефектом ячейки (царапины на окошке, дефект центрального элемента, остаточные примеси).

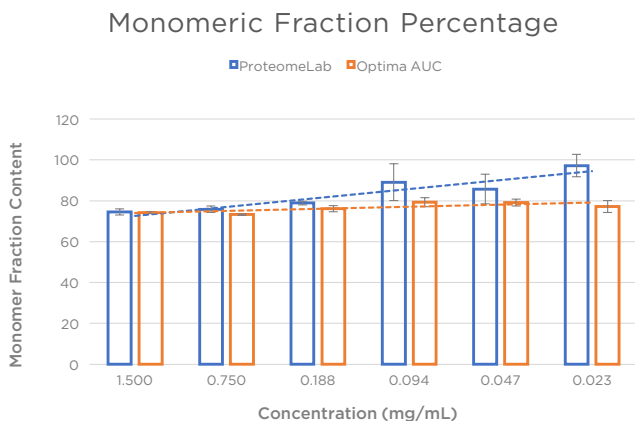


Рисунок 3. Линейность доли мономерной фракции

Процентное содержание видов мономеров при 6 концентрациях БСА.

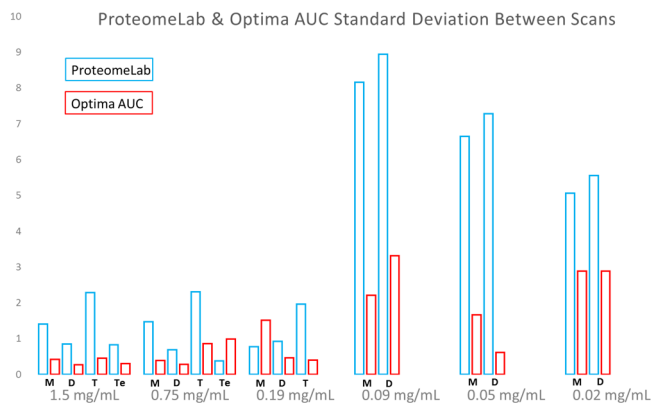


Рисунок 4. Среднеквадратическое отклонение серии разведений для каждого олигомерного состояния

Среднеквадратическое отклонение как процентное соотношение видов между параллельными анализами при каждой концентрации для стехиометрии.

Кроме того, было отмечено, что колебание сигнала было выше в системе ProteomeLab по сравнению с системой Optima AUC. Среднеквадратическое отклонение сигнала каждого олигомера в каждом повторном эксперименте представлено в виде графика на рисунке 4. В целом, среднеквадратическое отклонение сигнала значительно выше в системе ProteomeLab по сравнению с системой Optima AUC, указывая на более высокую воспроизводимость полученных результатов при использовании новой системы.

В конечном итоге, для получения более обширных данных по результатам анализа линейности сигнала, представленным на рисунке 3, для каждого мультимера был проведен отдельный анализ на обеих системах. На рисунке 5 эти значения представлены в виде графика. При низких концентрациях наблюдается существенное различие в данных по состояниям выраженной ассоциации между центрифугами Optima AUC и ProteomeLab. Выраженная доля видов низшего порядка (мономер, димер) значительно выше в системе ProteomeLab по сравнению с системой Optima AUC. Кроме того, это указывает на то, что система Optima AUC характеризуется более низкими пределами обнаружения и количественного определения по сравнению с системой ProteomeLab. Наряду с этим, на графике отчетливо видно, что при использовании системы ProteomeLab доля мономера уменьшается, а доля димера и тримера линейно увеличивается по мере увеличения концентрации. Однако мультимерный сигнал в системе Optima AUC представляет собой плоскую линию, указывая на воспроизводимость сигнала и более высокую чувствительность каждого мультимерного состояния.

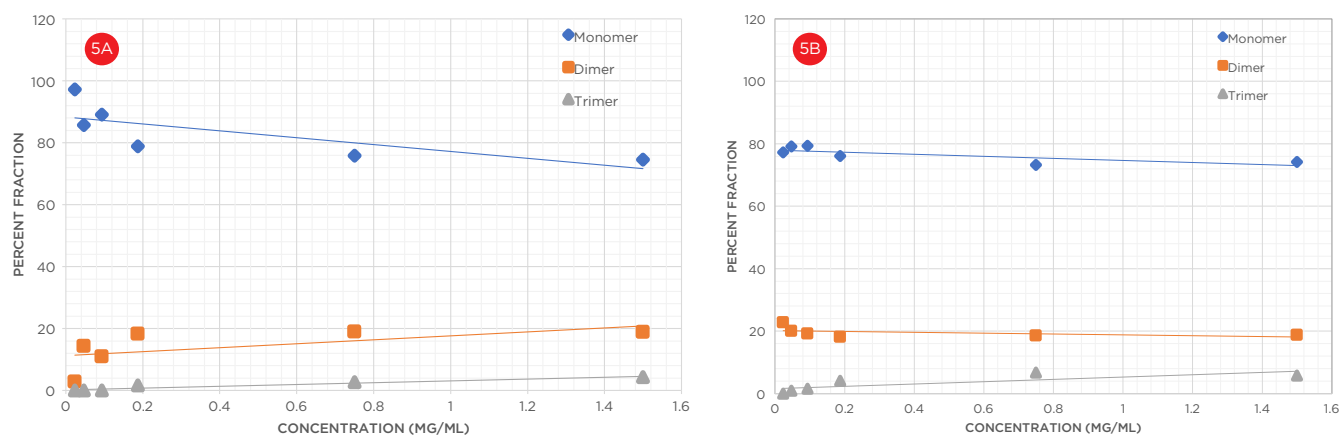


Рисунок 5. Линейность комбинированной стехиометрии

Выраженная самоассоциация БСА в серии шестикратных разведений между системами (а) ProteomeLab и (b) Optima AUC.