

Концентраторы Vivaspin® 20 и вставки для диализа от Sartorius: эффективная замена буфера в сравнении с традиционными диализными кассетами



#04

Указания по
применению

#05

#06

#07

#08

ДИА•М
современная лабораторияwww.dia-m.ru
заказ on-line

Марлина Фёллер
Университет прикладных наук,
г. Оснабрюк
Ханнес Ландманн
Sartorius Lab Instruments
Ричард МакРей
Sartorius Stedim Lab Ltd
Бен Уильямс
Sartorius Stedim Lab Ltd

1. Введение

Замена буферного раствора - важный этап при подготовке образцов биологических проб, такая процедура выполняется для подготовки образцов перед выделением целевого компонента или перед последующим длительным хранением пробы.^{1,2} Замена буфера может быть проведена с помощью диализа или диафильтрации. Диафильтрация с помощью Vivaspin® 20 и диализных вставок от Sartorius - метод замены буфера и обессоливания, хорошо зарекомендовавший себя в лабораториях, занимающихся анализом белка. Приведём несколько примеров. Данный метод был использован Ридом и др. для приготовления гибридных белков для последующей очистки с помощью аффинной хроматографии.³ Здесь GST-гибридные белки (содержащие глутатион-S-трансферазу) очищались с помощью аффинной хроматографии⁴ с матрицей на основе глутатион-агарозы, а в дальнейшем буфер заменялся на связывающий буфер (0,2 М NaHCO₃, 0,5 М NaCl, 2 М мочевины, pH 8,3) с помощью диафильтрационной вставки. Азиз и др. перед проведением кристаллизации фрагмента области белка, принимающей отклик предполагаемого белка-регулятора BPSL0128, выполнили обессоливание этого фрагмента (0,2 М NaCl, 50 мМ Трис с pH 8,0 был заменён на 10 мМ Трис с pH 8,0 с помощью диафильтрационной вставки).⁵ Товар-Херрера и др. провели обессоливание белка экспансина ScExIх 1 перед измерением активности (20 мМ NaH₂PO₄, 20 мМ имидозола, 0,5 М NaCl pH 7,4 вместо 50 мМ NaOAc, pH 5).⁶ Гуччионе и др. провели обессоливание активного сайта субъединицы метилменахинол : фумаратредуктаза (MfrA) перед анализом ферментативной активности (1,5 М NH₄SO₄, 50 мМ Трис, pH 8,0 на 50 мМ Трис, pH 8,0 соответственно).⁷

В основе процесса диализа, традиционно используемого для замены буфера в биологических образцах, лежит пассивная диффузия. Данный процесс занимает очень много времени и требует большого расхода буферного раствора.⁸ Здесь представлен другой способ, основанный на диафильтрации с помощью центрифужных концентраторов Vivaspin® 20. Вместе с диализными вставками Sartorius (DF-вставками) данные устройства представляют собой быстрый, эффективный и надёжный метод замены буфера в

образцах, содержащих белки. Постепенная градиентная замена буфера позволяет проводить мягкое обессоливание образцов, склонных к преципитации белка при высоких концентрациях солей. В результате белки остаются в растворённом состоянии. Кроме того, небольшая длительность процедуры помогает предотвратить разрушение белка от воздействия протеаз.

2. Метод

Для оценки эффективности и производительности диафильтрации по сравнению с традиционным методом диализа параллельно с устройствами Sartorius Vivaspin® 20 использовались традиционные рамки для диализа в условиях лаборатории. Процесс диализа с помощью рамок выполнялся в соответствии с инструкциями производителя, с последующей процедурой на всю ночь (O|N). Целью было уменьшить содержание минералов на 99%.

Оптимальные условия центрифугирования концентраторов Vivaspin® 20 были подобраны для замены буфера как с помощью диафильтрационной вставки, так и без неё. С этой целью использовался модельный раствор БСА и супернатант культур клеток CHO (снижение концентрации соли с 1 М до 0,01 М).

Были определены следующие оптимальные рабочие условия для уменьшения концентрации соли до > 99%:

- 4 000 в бакетном роторе
- 15 мл буфера для замены
- продолжительность центрифугирования определялась для каждого образца (концентрирование объёма образца до конечного объёма кармана с заменой буферного раствора между этапами):

	БСА	CHO
Vivaspin® 20 без диализной вставки	2 × 8 мин.	2 × 45 мин.
Vivaspin® 20 с диализной вставкой	2 × 6 мин.	2 × 45 мин.

После определения оптимальных условий обессоливания с помощью концентраторов Vivaspin® 20 было проведено сравнение этой процедуры со стандартной процедурой диализа. В результате было показано, что процесс обессоливания проходит наиболее идеальным образом с использованием диафильтрационных вставок Sartorius.



3. Результаты

3.1 Сравнение способов замены буфера с помощью концентраторов Vivaspin® 20 и с помощью диализных кассет

Процесс обессоливания был проведён с помощью концентраторов Vivaspin® 20 вместе с диафильтрационными вставками и без них. В данном эксперименте использовались два типа образцов: 2 мл модельного раствора БСА и 2 мл супернатанта культуры CHO (рисунок 1). Диаграмма на рисунке 1 отображает концентрацию соли, измерявшуюся для каждого образца в процессе замены буфера.

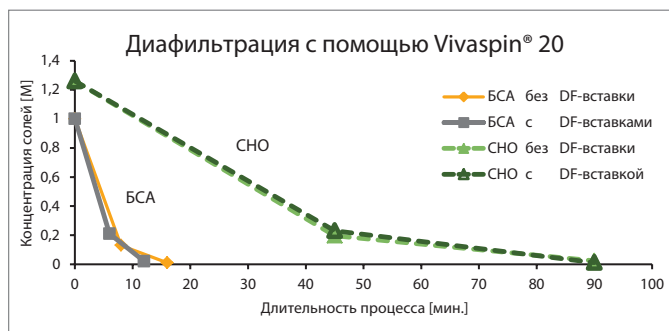


Рисунок 1. Концентрация солей во время процесса диафильтрации в концентраторах Vivaspin® 20 (30 000 кДа) с раствором БСА (1 мг/мл, растворённый в 1 М NaCl/0,25 мМ NaOAc; жёлтый цвет линии на диаграмме) и супернатанта клеточной культуры CHO (зелёная пунктирная линия), в качестве заменяющего буфера использовалась деионизированная вода

Параллельно с такими же образцами проб проводилась замена буфера с помощью традиционного способа диализа в предварительно собранной рамке для диализа. В соответствии с инструкцией производителя буфер для диализа заменялся через 2 и 4 часа, а образец был получен только после заключительного этапа диализа на протяжении ночи. Вся процедура диализа заняла примерно 24 часа. Устройства Vivaspin® 20 обеспечили требуемую концентрацию солей быстрее, чем кассеты для диализа (см. рисунки 1 и 2).

3.2 Сравнение длительности процедур

При использовании способа с концентраторами Vivaspin® для замены буферного раствора потребовалось в 140 раз меньше времени по сравнению с традиционным диализом с помощью диализных кассет (см. таблицу 1).

Таблица 1. Длительность в минутах каждого этапа сравниваемых процессов и устройств

Замена буфера	Vivaspin® 20 без DF-вставки		Vivaspin® 20 с DF-вставкой		Кассета для диализа
	БСА	CHO	БСА	CHO	
1	8 мин.	45 мин.	6 мин.	45 мин.	120 мин.
2	8 мин.	45 мин.	6 мин.	45 мин.	120 мин.
3	–	–	–	–	1200 мин. (ночь)
Итого	16 мин.	90 мин.	12 мин.	90 мин.	1440 мин. (24 ч)

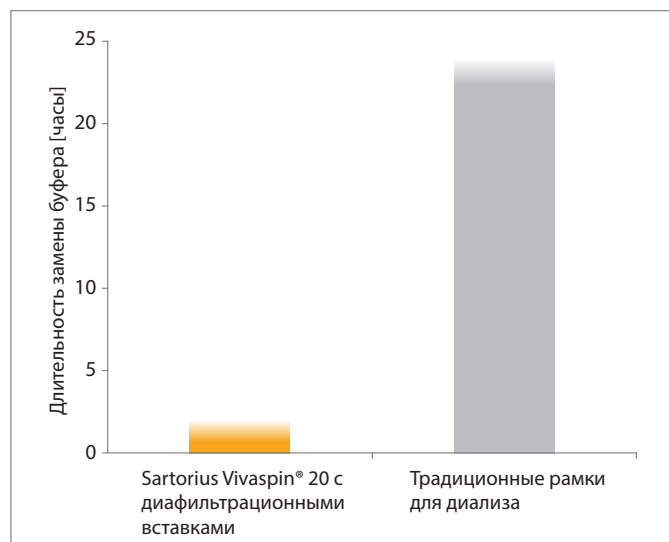


Рисунок 2. Сравнение затрат времени, необходимого для полной замены буфера

После обессоливания целостность структуры всех образцов белка была подтверждена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Концентрация солей оценивалась измерением электропроводности.

000 «Диаэм»

Москва
ул. Магаданская, д. 7, к. 3 ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ sales@dia-m.ru

www.dia-m.ru

С.-Петербург
+7 (812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Новосибирск
+7(383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Воронеж
+7 (473) 232-4412
vrn@dia-m.ru

Йошкар-Ола
+7 (927) 880-3676
nba@dia-m.ru

Красноярск
+7(923) 303-0152
krsk@dia-m.ru

Казань
+7(843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
+7 (863) 303-5500
rnd@dia-m.ru

Екатеринбург
+7 (912) 658-7606
ekb@dia-m.ru

Кемерово
+7 (923) 158-6753
kemerovo@dia-m.ru

Армения
+7 (094) 01-0173
armenia@dia-m.ru



Таблица 2. Сравнение концентрации соли и длительности процедур для БСА и супернатанта клеточной структуры CHO в устройствах Vivaspin® 20 и кассетах для диализа

	Перед диафильтрацией	В процессе диафильтрации (DF)			После диафильтрации	
		Устройство	Концентрация соли [М]	Объём замещающего буфера [мл]		Длительность ручной работы [мин.]
БСА	Vivaspin® 20 без диафильтрационных вставок	1,00	35	45	16	0,01 (0,9%)
	Vivaspin® 20 с диафильтрационными вставками	1,00	30	45	12	0,01 (1,6%)
	Кассеты для диализа	1,00	1500	60	1440	0,00 (0,0%)
Супернатант культуры клеток CHO	Vivaspin® 20 без диафильтрационных вставок	1,26	35	45	90	0,02 (1,83%)
	Vivaspin® 20 с диафильтрационными вставками	1,26	30	45	90	0,01 (0,95%)
	Кассеты для диализа	1,26	1500	60	1440	0,00 (0%)

Выводы

Диафильтрация с помощью концентраторов Vivaspin® 20 позволяет осуществлять быструю замену буфера. При использовании их вместе с диализными (диафильтрационными) вставками от Sartorius возможна постепенная градиентная замена буфера. Замена буферного раствора таким мягким способом обеспечивает уменьшение концентрации соли перед концентрированием пробы до конечного объёма кармана. Таким образом, белки, склонные к преципитации при повышенном содержании солей, будут с большей долей вероятности оставаться в растворённом состоянии. Кроме того, диафильтрационные вставки помогают сократить длительность процесса и позволяют более эффективным образом снизить концентрацию солей (см. рисунок 1). Продолжительность центрифугирования необходимо оптимизировать для каждого образца пробы измерением содержания солей после каждого этапа диафильтрации. Для сокращения концентрации соли на 99% и достижения концентратом конечного объёма кармана перед заменой буферного раствора достаточно два цикла центрифугирования.

Способ работы с использованием диафильтрационных вставок в концентраторах Vivaspin® 20 превосходит традиционные методы диализа по скорости и простоте использования и экономичнее по объёму затраченного буферного раствора. Процесс диализа с использованием диализных кассет занимает значительно больше времени и требует продолжительного ручного труда по сравнению с методом диафильтрации. Так как замена буфера с помощью Vivaspin® 20 происходит значительно быстрее, целевые белки в большей степени защищены от действия протеаз. Диализ приводит к разбавлению образца во время замены буфера, и для достижения требуемой конечной концентрации необходим заключительный этап концентрирования. Использование концентраторов Vivaspin® 20 с диафильтрационными вставками эффективно предотвращает разбавление образцов проб, позволяя проводить одновременно его обессоливание и концентрирование.

Диафильтрация с помощью устройств Vivaspin® 20 позволяет быстро получать образцы высокой степени концентрации в практически любом буферном растворе.

Список использованной литературы

- Cartwright I. J. & Higgins, J. A. "Direct Evidence for a Two-step Assembly of ApoB48-containing Lipoproteins in the Lumen of the Smooth Endoplasmic Reticulum of Rabbit Enterocytes" *J. Biol. Chem.* 276, 48048–57 (2001).
- Große, C. *et al.* "Transcriptional Organization of the *czc* Heavy-Metal Homeostasis Determinant from *Alcaligenes eutrophus*" *J. Bacteriol.* 181, 2385–2393 (1999).
- Read, A.J., Gauci, C.G., Lightowers M.W. Purification of polyclonal anti-conformational antibodies for use in affinity selection from random peptide phage display libraries: A study using the hydatid vaccine EG95 *J. Chromatog. B*, 877, 1516–1522 (2009).
- Smith, D.B., Johnson, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31–40 (1988).
- Aziz A.G.A., *et al.* Crystallization and preliminary X-ray analysis of the receiver domain of a putative response regulator, BPSL0128, from *Burkholderia pseudomallei*. *Acta Cryst.* F68, 917–922 (2012).
- Tovar-Herrera *et al.* A Novel Expansin Protein from the White-Rot Fungus *Schizophyllum commune*. *PLoS ONE* 10, e0122296 (2015).
- Guccione, E. *et al.* Reduction of fumarate, mesaconate and crotonate by Mfr, a novel oxygen-regulated periplasmic reductase in *Campylobacter jejuni* *Environmental Microbiol.* 12, 576–591 (2009).
- Blatt, W.F.; Robinson, S.M.; Bixler, H.J. "Membrane Ultrafiltration: The Diafiltration Technique and Its Application to Microsolute Exchange and Binding Phenomena". *Analytical Biochemistry*. Elsevier. pp. 151–173 Oct (1968).