



Определение молекулярной массы и размера молекулы белка с применением системы Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution с расширенным детектированием по светорассеянию

Методические указания

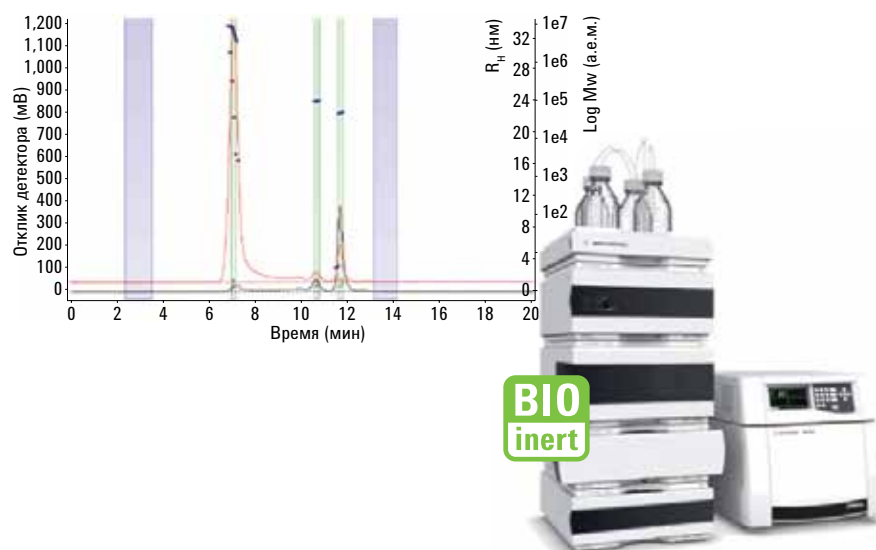
Биотерапия и биоаналоги

Автор

Соня Шнайдер (Sonja Schneider)
Agilent Technologies, Inc.
Вальдброн, Германия

Аннотация

В данных методических указаниях представлено определение молекулярной массы и размера молекулы белка с линейным количественным анализом с применением системы Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution. Были точно определены молекулярные массы и размеры молекул белков от цитохрома С (11 000 а.е.м.) до тироглобулина (670 000 а.е.м.), независимо от количества вводимой пробы. Применение детектора по светорассеянию обеспечивает более высокочувствительное определение агрегации по сравнению с УФ-детектированием.



Agilent Technologies

Введение

В хроматографии белка часто применяется эксклюзионная хроматография (SEC) для определения молекулярной массы (Mw) белков. Для более детального описания различия между пробами может также быть определен размер молекулы.

Размер молекулы может быть описан с помощью радиуса инерции (R_g) или гидродинамического радиуса (R_h). R_g — математически определяемое значение, описывающее полный разброс молекул, рассчитывается как среднеквадратичное расстояние от каждого атома белка до его центра тяжести. R_h также называют радиусом Стокса. R_h описывает феноменологические свойства молекулы как радиус гипотетической твердой сферы, которая рассеивает таким же образом, как и растворенное анализируемое вещество. Практический аспект R_h делает его более полезным измерением, особенно для биомолекул.

Традиционно в эксклюзионной хроматографии применяют калибровку колонки в сочетании с концентрационным детектором, таким как рефрактометр или УФ-детектор. Ограничение этого метода выявляется при анализе проб с конформационными изменениями (денатурация или посттрансляционные модификации, приводящие к различной укладке белка). Кроме того, неспецифическое взаимодействие проб с колонкой (клейкие пробы) может приводить к неточным значениям Mw или размера молекулы.

Детектирование статического светорассеяния (LS) обеспечивает прямое определение Mw независимо от взаимодействий с колонкой или количества вводимой пробы. Кроме того, с LS-детектированием под углом 90° увеличена чувствительность к обнаружению агрегатов белка по сравнению с УФ-детектированием при 280 нм. При динамическом светорассеянии (DLS) R_h измеряется напрямую без необходимости калибровки колонки. В системе Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution совмещены статическое и динамическое детектирование по светорассеянию и УФ-детектирование с полностью инертным (безметаллическим) путем потока.

Данные методические указания представляют определение молекулярных масс и размеров молекул (R_h) независимо от количества вводимой пробы с LS под углом 90° для проб белка с массами в пределах от 11 000 до 670 000 а.е.м. Линейный и высокочувствительный количественный анализ был обеспечен с применением диодно-матричного детектора (DAD), установленного в системе 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution.

Экспериментальная часть

Система Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution состоит из следующих модулей:

- Биоинертный четырехканальный насос Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary Pump (G5611A)
- Высокоэффективный биоинертный автосамплер Agilent 1260 Infinity High Performance Bio-inert Autosampler (G5667A)
- Термостат автосамплера Agilent 1290 Infinity (G1330B) для охлаждения проб
- Термостат колоночного отделения Agilent 1290 Infinity (G1316C) с биоинертным теплообменником для растворителей
- Диодно-матричный детектор Agilent 1260 Infinity DAD VL (G1315D) со стандартной биоинертной проточной кюветой 10 мм
- Биоинертная мультidetекторная система Agilent 1260 Infinity (G7805A) с двухугловым статическим и динамическим детектированием по светорассеянию (G7809A)

Колонка

Agilent Bio SEC-3, 300Å,
7,8 × 300 мм 3 мкм (№ по кат. 5190-2511)

Поточный фильтр перед LS-детектором (№ по кат. G7808-64001) с мембранами фильтра 0,2 мкм (Supor-200 13 мм, № по кат. 60298, Pall Life Sciences, Порт-Вашингтон, штат Нью-Йорк, США).

Программное обеспечение

ПО Agilent Bio-SEC версия A.01.01
Build 4.30989

Растворители и пробы

Все применяемые растворители имели класс чистоты «для ВЭЖХ». Свежая вода высшей степени чистоты была получена в интегральной системе Milli-Q, оборудованной мембранным point-of-use картриджем с размером пор 0,22 мкм (Millipak). Фосфатно-буферные солевые таблетки (PBS) и стандартные белки были приобретены в Sigma-Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури, США. Стандарт для гель-фильтрации был приобретен в Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, штат Калифорния, США.

Приготовленный буфер PBS был трижды отфильтрован с применением мембранного фильтра с размером пор 0,2 мкм. Пробы были дополнительно отфильтрованы с применением шприцевого фильтра Agilent Captiva premium с мембраной из регенерированной целлюлозы 4-мм с размером пор 0,2 мкм (№ по кат. 5190-5106).

Серии разбавления проб белка были получены с применением системы Agilent 7696A Sample Prep WorkBench.

Табл. 1. Хроматографические условия

| Хроматографические условия | |
|--|--|
| Подвижная фаза | PBS, pH 7,4 |
| Скорость потока | 0,75 мл/мин |
| Время анализа | 20 минут |
| Объем ввода пробы | В зависимости от методики, от 5 до 100 мкл |
| Термостатирование автосамплера | 5 °С |
| Температура термостата колоночного отделения | 30 °С |
| Диодно-матричный детектор | 280/4 нм Ref.: Откл. |
| Ширина пика | > 0,05 минуты (время отклика 1,0 секунды) (5 Гц) |
| LS-детектор (детектор по светорассеянию) | 30 °С, 5 Гц |
| Операционные параметры DLS | |
| Время работы коррелятора | 5 секунд |
| Быстрота действия коррелятора | 10 мкс |
| R ² | 0,80 |
| Вязкость растворителя | 0,0079 П (вязкость воды при 30 °С) |
| Показатель преломления растворителя | 1,333 (показатель преломления воды) |

Результаты и обсуждение

Молекулярные массы и размер молекул (измеренный как R_h) были определены для пяти различных белков, от цитохрома С ($M_w \sim 11\,000$ а.е.м.) до тироглобулина ($\sim 670\,000$ а.е.м.). На рис. 1 представлен анализ овальбумина с LS-детектированием под углом 90° . Пик 3 представляет собой мономерный пик овальбумина с M_w 47 928 а.е.м. под углом 90° в статическом LS-анализе (красная линия сигнала). Пик 1 (мультиагрегат со средней M_w 5 744 499 а.е.м.) и пик 2 (димер, 97 531 а.е.м.) соответствуют агрегатам мономера овальбумина. Черная линия сигнала соответствует УФ-сигналу DAD при 280 нм. Сравнение сигнала статического светорассеяния под углом 90° и УФ-сигнала при 280 нм показало значительно более высокую чувствительность к агрегатам в случае 90° LS-сигнала по сравнению с УФ. Фиолетовые точки на пиках 1 и 3 соответствуют значениям R_h : 23 нм для пика 1 и 3 нм для мономерного овальбумина (пик 3).

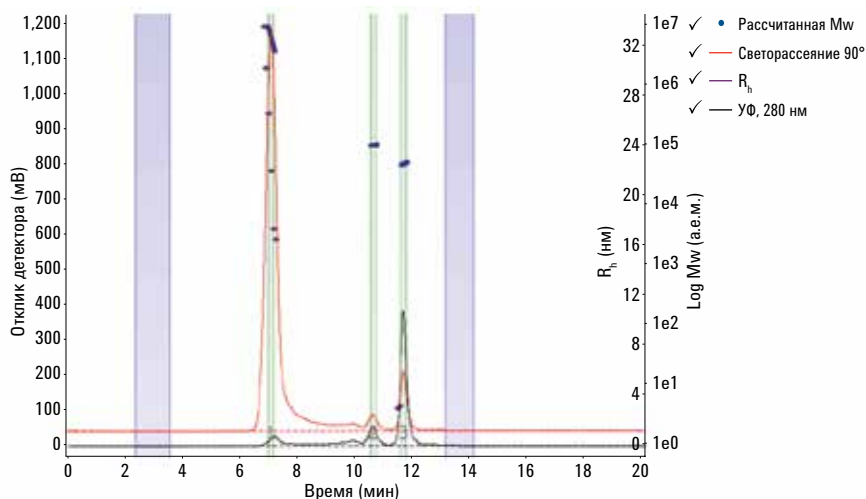


Рис. 1. Определение M_w и размера молекулы овальбумина. Мономер (пик 3) соответствует M_w 47 928 (синие точки) и R_h (фиолетовые точки) 3 нм. 90° LS-сигнал выделен красным цветом.

Mw пика мономерного овальбумина была определена с различными количествами вводимой пробы в пределах от 2 до 960 мкг белка на колонке. При вводимом количестве 2 мкг на колонке соотношение «сигнал — шум» (S/N) составило 7,5. В табл. 2 и на рис. 2 представлено определение Mw при общем количестве пробы на колонке от 2 до 960 мкг. Mw колеблется от 46 079 до 47 975 а.е.м. со средним значением Mw, равным 47 198 а.е.м. с ОСО 2 %.

В табл. 3 представлен краткий обзор определения Mw с соответствующими значениями относительного стандартного отклонения (RSD) для пяти различных белков от цитохрома С до тироглобулина. Вводили различные количества каждого белка и определяли Mw. Значения RSD рассчитаны для нескольких вводов и получены из определений Mw с различными количествами вводимой пробы, см. табл. 3 (вводы). Диапазон вводов был подобран для каждого белка в зависимости от чувствительности статического детектирования по светорассеянию под углом 90°. Чувствительность LS-детектора увеличивалась с увеличением размера белка. За исключением тироглобулина, все определенные значения Mw соответствуют литературным значениям. Для тироглобулина значение завышено (702 000 вместо 670 000 а.е.м.) вследствие недостаточного разделения мономера тироглобулина и его агрегатов (рис. 3). Чем лучше разрешение на хроматограмме, тем более точно была определена Mw, как видно в случае овальбумина (рис. 1).

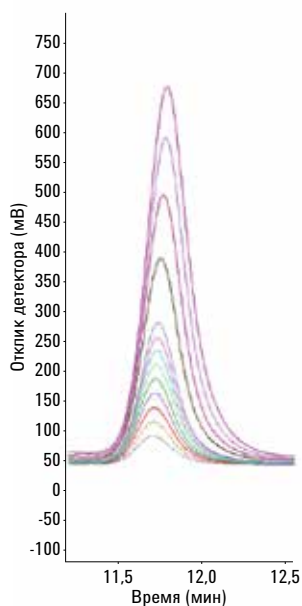


Рис. 2. Наложение 17 вводов различных количеств пробы в диапазоне от 2 до 960 мкг овальбумина на колонке

Табл. 2. Определение Mw для различного введенного количества моноклонального антитела

| Объем ввода пробы, мкл | Количество на колонку (мкг) | Mw (а.е.м.) | R _h (нм) |
|------------------------|-----------------------------|-------------|---------------------|
| 0,25 | 2 | 46 079 | |
| 0,5 | 4 | 45 162 | |
| 1 | 8 | 44 763 | |
| 0,5 | 12 | 47 399 | |
| 1 | 24 | 46 795 | |
| 2 | 48 | 47 603 | |
| 4 | 96 | 47 385 | 3,13 |
| 5 | 120 | 47 420 | 2,76 |
| 6 | 144 | 47 651 | 2,77 |
| 7 | 168 | 47 928 | 2,81 |
| 8 | 192 | 47 716 | 2,71 |
| 9 | 216 | 47 811 | 2,8 |
| 10 | 240 | 47 975 | 2,98 |
| 15 | 360 | 47 588 | 2,96 |
| 20 | 480 | 47 881 | 2,97 |
| 25 | 720 | 47 665 | 3,03 |
| 30 | 960 | 47 540 | 2,99 |

Табл. 3. Определение Mw пяти различных белков в пределах от 11 000 до 670 000 а.е.м. в сравнении с литературными значениями

| | Опубликованная Mw (UniProt) в а.е.м. | Экспериментально найденная Mw при 90° в а.е.м. | ОСО в % | Определяемый диапазон (мкг на колонку) |
|--------------|--------------------------------------|--|---------|--|
| Цитохром С | 11 749 | 11 674 | 2,5 | 180—750 |
| Лизоцим | 16 239 | 16 272 | 0,7 | 15—600 |
| Овальбумин | 44 000 | 47 198 | 2 | 2-960 |
| IgG | 150 000 | 151 944 | 1,9 | 1—120 |
| Тироглобулин | 670 000 | 702 652 | 2,9 | 3—76 |

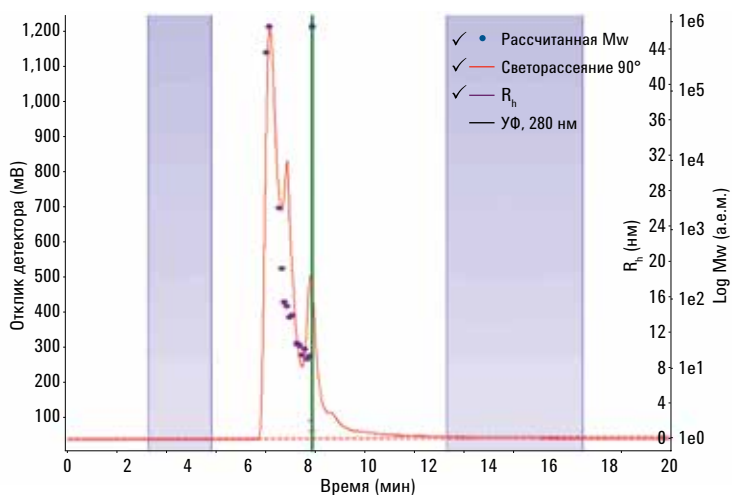


Рис. 3. Анализ тироглобулина под углом 90° статическим (красная дорожка сигнала) и динамическим детектированием по светорассеянию (фиолетовые точки). Вследствие больших количеств агрегатов, приводящих к плохой разрешающей способности в стандартной пробе, точное определение Mw затруднено для мономерного пика тироглобулина (пик 1).

В табл. 4 представлен краткий обзор определений размера молекулы как R_H с соответствующими RSD для пяти стандартных белков. Вводили различные количества каждого белка и определяли R_H . Значения RSD рассчитаны для нескольких вводов и получены из определений R_H с различными количествами вводимой пробы (табл. 4) (вводы). Диапазон вводов был подобран для каждого белка в зависимости от чувствительности DLS-детектора. Чувствительность LS-детектора увеличивалась с увеличением размера белка. Все определенные значения R_H близки к значениям, опубликованным в литературе. Вследствие ограниченной чувствительности к белкам меньших размеров, значения ОСО, уменьшающиеся с уменьшением размера молекулы, увеличиваются от цитохрома С к тироглобулину.

В дополнение к оценке детектирования по светорассеянию для анализа белка была также оценена линейность DAD для овальбумина и тироглобулина. Оба белка были разбавлены в сериях разбавления 1:2, от 10 до 39 мкг/мл. Для данного диапазона была достигнута превосходная линейность с коэффициентом детерминации (R^2) = 0,9994 для овальбумина и $R^2 = 0,9999$ для тироглобулина (рис. 4).

Табл. 4. Определение размера молекулы, измеренного как гидродинамический радиус для пяти различных белков в пределах от 11 000 до 670 000 а.е.м. в сравнении с литературными значениями

| | Опубликованный R_H в нм | Экспериментально найденный R_H с DLS в нм | ОСО в % | Определяемый диапазон (мкг на колонку) |
|--------------|---------------------------|---|---------|--|
| Цитохром С | 1,7 | 2,2 | 13 | 180—750 |
| Лизоцим | 1,9 | 2 | 8 | 270—600 |
| Овальбумин | 2,8 | 2,9 | 5 | 96—960 |
| IgG | 5,1 | 5 | 7 | 40—120 |
| Тироглобулин | 8,6 | 8,4 | 6 | 25—76 |

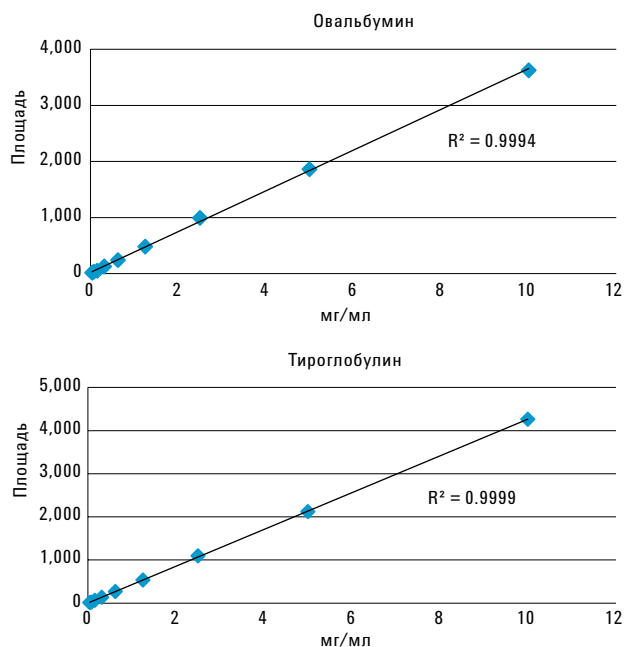


Рис. 4. Линейность отклика DAD, продемонстрированная для овальбумина и тироглобулина

Выводы

Данные методические указания представляют систему Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution для определения молекулярной массы и размера молекулы белка с применением эксклюзионной хроматографии. Здесь применяется мультidetекторная система Agilent 1260 Infinity Bio-inert Multi-Detector Suite с двухугловым статическим и динамическим детектированием по светорассеянию вместе с системой Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC System.

Были проанализированы пять различных стандартных белков для определения их Mw и размера молекул (RH), от цитохрома C (Mw ~11 000 а.е.м.) до тироглобулина (~670 000 а.е.м.). Mw была определена с применением статического LS-детектора при 90°, тогда как гидродинамический радиус был определен с применением DLS-детектирования. Mw и размеры молекул стандартных белков были определены с различными количествами вводимой пробы. Результаты показали хорошее совпадение со значениями, найденными в литературе, при условии что наблюдалось

достаточное разрешение измеряемого пика. Чувствительность статического и динамического детектирования по светорассеянию увеличивается с увеличением Mw и размера молекул белков. Сравнение 90° статического LS-сигнала и УФ-сигнала при 280 нм показало значительно более высокую чувствительность к агрегатам в случае детектирования по светорассеянию под углом 90° по сравнению с УФ. Кроме того, высоколинейное и чувствительное детектирование DAD обеспечивает детализированный анализ агрегации белка.

www.agilent.com/chem

Информация может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2014
Напечатано в США 1 марта 2014 г.
5991-3955RU



Agilent Technologies