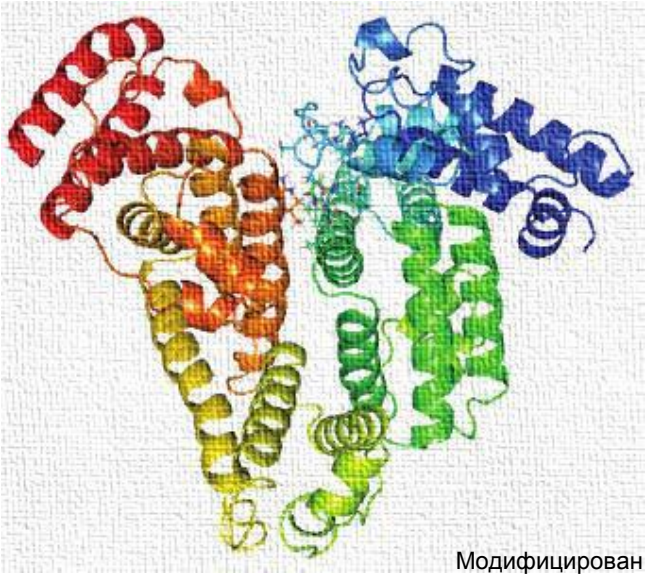
Димеризация Бычьего Сывороточного Альбумина в Измерениях Размера Частиц и Молекулярной Массы

Ключевые слова: DLS, SLS, Litesizer™, белки, олигомеризация, денатурация, буфер

Методы пробоподготовки значительно влияют на сворачивание и олигомеризацию белков в растворе. В отчёте мы сравнили бычий сыворочный альбумин (BSA), растворенный в дистиллированной воде (BSA-H2O), с BSA растворенным изотоническим буферным сульфидом свинца (BSA-PBS). Результаты, полученные с помощью анализатора частиц Litesizer 500 показывают, что BSA-H2O подвергся денатурации и/или агрегации, в то время как BSA-PBS в основном состоял из искомых димеров. Измерения молекулярной массы BSA-H2O привели к ошибочным результатам из-за смешанной природы образца, а измерения BSA-PBS отображают ожидаемые значения молекулярной массы димерного BSA. Это подтверждает, что Litesizer 500 - полезный прибор для оптимизации пробоподготовки и контроля качества белков.



Модифицированная форма (3)

1 Введение

Бычий сывороточный альбумин (BSA) представляет собой небольшой, стабильный и в меру инертный белок. В лабораториях он обычно используется в качестве эталона концентрации белка, как ингибитор во многих иммуноанализах или в качестве добавки к культуре клеток. BSA – самый распространенный сывороточный белок в бычьей крови. Благодаря промышленности скотоводства, он относительно дешевый и легкодоступный.
Согласно справочникам, BSA имеет номинальный размер частиц 7,1 нм и молекулярную массу 66,5 кДа (1). В состоянии напряженности бычий сывороточный альбумин проявляет склонность к димеризации, при которой димеры BSA имеют молекулярную массу 132 кДа (2).

Натрий-фосфатный буферный раствор (PBS) представляет собой водный раствор соли, который изотоничен клеткам млекопитающих и стабилизирует нейтральный pH (обычно pH 7,4). Этот буферный раствор широко используется для растворения белков, образования суспензии клеток или в качестве транспортного раствора для биологических образцов.
Чтобы подчеркнуть влияние пробоподготовки на структуру растворенного белка, мы растворили очищенный BSA в дистиллированной воде и в PBS. Затем мы измерили и сравнили размер частиц, молекулярную массу двух растворов BSA с помощью анализатора частиц Litesizer ™.

2 Настройки эксперимента

Для эксперимента были подготовлены два различных базовых раствора BSA.
Образец 1 состоял из BSA (≥ 96%, полученного фракционированием холодного этанола, Sigma-Aldrich, Vienna), растворенного в дистиллированной воде с фильтром 0,2 мкм.
Образец 2 состоял из такого же BSA, растворенного в PBS (0,01 M, pH 7,4, Sigma-Aldrich).

Для каждого образца было заготовлено по четыре разных концентрации (8, 4, 2 и 1 мг/мл). Измерения проводились на анализаторе частиц Litesizer ™ 500 в кварцевых кюветах и при температуре 25 °C.
Для определения размера частиц использовали образцы 8 мг/мл.
Такие параметры, как: количество прогонов, угол измерения, а также положение фильтра и фокуса автоматически настраивались прибором.

Измерения молекулярной массы проводились в режиме бокового рассеяния с отношением dn/dc 0,185 мл/г. Чтобы построить график Дебая необходимы четыре различные концентрации BSA. В качестве эталона использовался толуол.
Все измерения повторялись трижды.

3 Анализ результатов

3.1 Результаты измерения Размера Частиц

Для расчёта гидродинамического диаметра взвешенных частиц Litesizer использует технологию динамического рассеяния света (DLS). Как показано на рисунке 1, BSA, растворенный в воде, показал бимодальное распределение частиц по размерам, так как на графике распределения интенсивности выражены два четких пика. Ожидаемый размер мономера BSA составлял 7 нм. Однако, первый максимум соответствовал среднему диаметру частиц <3 нм, а второй пик составил около 22 нм, что сильно превышало ожидаемый размер димера BSA. Таким образом, оказалось, что в этом образце не наблюдаются ни мономеры, ни димеры BSA. Это означает, что в некоторой степени произошла денатурация и/или агрегация.

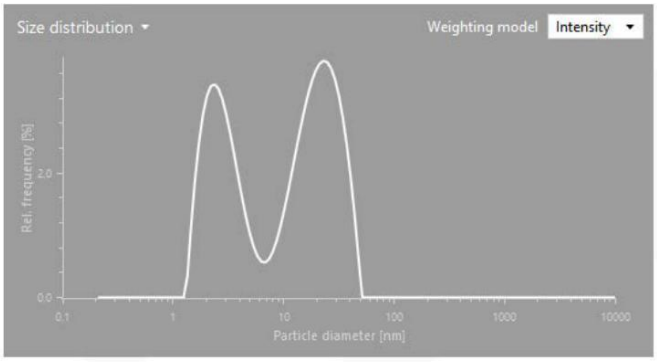


Рисунок 1 – Распределение размера частиц BSA, растворенного в дист. воде, в зависимости от интенсивности

Напротив, результаты DLS для образца BSA, растворенного в PBS, показали явное мономодальное распределение по размеру (Рисунок 2). В итоге средний размер частиц 12,4 нм (см. Таблицу 1) показал, что раствор BSA+PBS состоял преимущественно из димеров BSA.

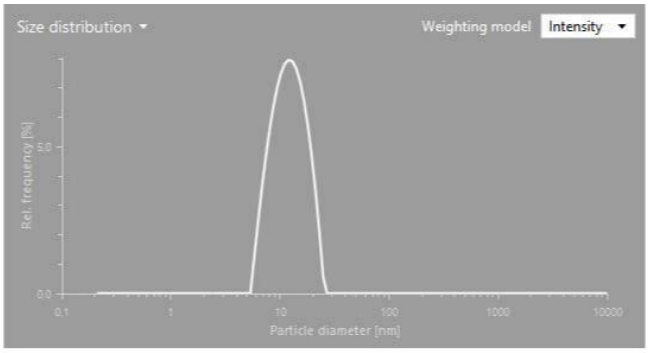


Рисунок 2 –Распределение размера частиц BSA, растворенного в PBS в зависимости от интенсивности

3.2 Результаты измерения Молекулярной Массы

Значения молекулярной массы, полученные методом статического светорассеяния (SLS), получены не из данных интенсивности рассеяния каждого отдельного размера частиц в образце, а из интенсивности рассеяния общего распределения по размеру. Следовательно, метод SLS полезен только при работе с мономодальными образцами.
Вычисления молекулярной массы образца BSA, растворенного в H2O показали средний результат 56,8 кДа (рис. 3, Таблица 1). Хотя это значение соответствует ожидаемой молекулярной массе мономерного BSA, результаты DLS показывают, что образец является бимодальным (см. Раздел 3.1). Поэтому результат молекулярной массы представляет собой «среднее» значение размеров двух частиц в образце, а не мономеров BSA, следовательно, должен считаться ошибочным.

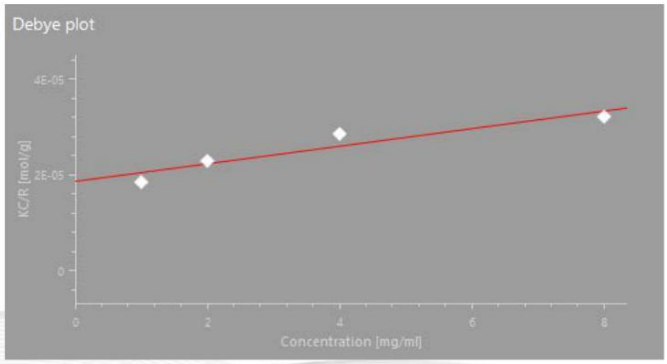


Рисунок 3 –График Дебая BSA, растворенного в дистилированной водее

Результаты DLS показывают, что BSA, растворенный в PBS - мономодален, а значит результаты молекулярной массы достоверные. Как показано на Рисунке 4 и в Таблице 1, образец имеет среднюю молекулярную массу 141 кДа, что соответствует ожидаемому теоретическому значению 132 кДа. Это подтвердило наблюдение о том, что BSA действительно очень сильно димеризовался при растворении в PBS.

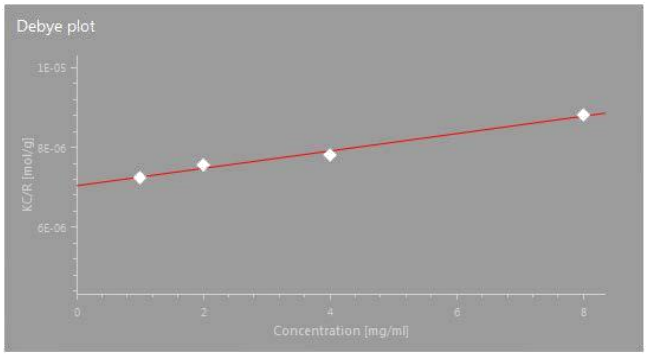


Рисунок 4 – График Дебая BSA, растворенного в PBS

Раствоpитель	Пик интенсивности [нм]	Индекс полидисперсности [%]	Молекулярная масса [кДа]
H_2O	22.50	29.1	59.1
H_2O	22.84	27.6	57.7
H_2O	21.97	23.4	53.6
PBS	12.65	15	144
PBS	11.60	20.7	139
PBS	13.09	22.4	142

Таблица 1 – Сравнение результатов измерений размера частиц и молекулярной массы BSA, растворенного в воде, и BSA, растворенного в PBS

4 Заключение

Результаты динамического светорассеяния BSA, растворенного в дистиллированной воде отобразили бимодальное распределение размеров, в котором невозможно распознать ни мономерные, ни димерные частицы BSA. Это показало, что разбавление BSA в гипотоническом растворителе с нестабильным pH, привело к денатурации молекул BSA и агрегации мономеров. Из-за комплексной природы образца измерения молекулярной массы э показывают ошибочные результаты.
И напротив, BSA, растворенный в изотоническом, pH-нейтральном буферном растворе PBS, показал мономодальное распределение со средним размером частиц димеров BSA. Факт спонтанного объединения в димеры BSA, растворенного в PBS, был дополнительно закреплен измерениями молекулярной массы, показав результаты близкие к ожидаемым значениям.

В этом отчёте мы подчеркиваем важность пробоподготовки, используемой для разбавления белков. Эти методы оказывают значительное влияние на сворачивание и олигомеризацию белков.
В нашем случае, производитель BSA заявил, что протеин может разбавляться водой, но результаты доказали, что это привело к денатурации и/или агрегации белка. Суспензия с PBS была предпочтительней, так как мы смогли обнаружить нативный димерный белок как методом DLS, так и SLS.
Анализатор частиц Litesizer ™ 500 позволяет пользователю измерять размер частиц и молекулярную массу протеиновых образцов, а также получать информацию о третичной и четвертичной структуре растворенного белка.

5 Литература

1. **Squire, Phil G, Moser, Peter und O'Konski, Chester T (1968).** Hydrodynamic properties of bovine serum albumin monomer and dimer. *Biochemistry* 7(12):4261-4272.
2. **Brahma, Amrita, Mandal, Chlabinath und Bhattacharyya, Debasish (2005).** Characterization of a dimeric unfolding intermediate of bovine serum albumin under mildly acidic condition. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 2:159-169.
3. **Chinnathambi, Shanmugavel, et al. (2015).** Effect of Moderate UVC Irradiation on Bovine Serum Albumin and Complex with Antimetabolite 5-Fluorouracil: Fluorescence Spectroscopic and Molecular Modelling Studies. *International Journal of Spectroscopy* 2015:1-12.

Измерения: Carina Burgstaller
Текст: Carina Burgstaller & Nathalie Etchart

Контакт Anton Paar GmbH Tel: +43 316 257 7073
pc-application@anton-paar.com
www.anton-paar.com

Эксклюзивный дилер в России:
ООО "АВРОРА"
paar@avrora-lab.com
www.paar.ru
+7(495)-258-83-05/-06/-07