

Измерение Дзета-потенциала белковых образцов с высокой электропроводностью

Ключевые слова: Анализатор частиц Litesizer 500, Univette, ELS, электрофоретическое рассеяние света, cmPALS, лизоцим, белковый метод

Белки чаще всего перерастворяются в растворах, которые буферизуются и/или изотоничны для жидкостей организма. Однако измерение дзета-потенциала с помощью ELS на таких высокоэлектропроводных растворителях может привести к чрезмерному нагреву, что спровоцирует разложение образца, и повредит электрод. В этом руководстве мы использовали прочную и многоразовую кювету Univette вместе с анализатором частиц Litesizer™ 500 для измерения дзета-потенциала модельного лизоцима белка, растворенного в изотоническом буфере. Благодаря запатентованной технологии cmPALS и режиму протеина, функция программного обеспечения, которая вводит короткие перерывы в измерении, чтобы позволить образцу остыть, мы смогли получить высоко повторяемые измерения дзета-потенциала без причинения ущерба электроду.



1 Введение

Для анализа суспензий часто необходимо измерить дзета-потенциал, который зависит от отталкиваний между частицами. Многие материалы могут быть растворены или диспергированы в дистиллированной воде, некоторые частицы следует диспергировать в растворителях с высокой проводимостью, чтобы сохранить структуру и предотвратить разрушение. Это особенно характерно для биологических образцов, таких как белки, биомедицинских полимеров и клеток, которые должны быть растворены в буферном и/или изотоническом растворе.

Дзета-потенциал измеряется методом электрофоретического рассеяния света (ELS), что подразумевает воздействие электрического поля на образец. Общим побочным эффектом этого метода измерения является так называемый Джоулев нагрев,

где электрический ток проходит через проводник (в данном случае образец) и выделяет тепло. Чем выше электропроводность образца, тем больше тепла будет образовываться, что может привести к разрушению образца и повреждению электрода. Эта проблема особенно актуальна для биологических образцов, которые имеют двойной недостаток в том, что им необходим высококонцентрированный растворитель и они очень чувствительны к тепловой деградации (1).

Поэтому для таких образцов важно, чтобы ток применялся в течение кратчайшего времени, и чтобы его величина была как можно ниже. В анализаторе частиц Litesizer™ 500 от Anton Paar запатентованная технология cmPALS обеспечивает стабильные и чувствительные измерения дзета-потенциала при низких напряжениях, а также в течении короткого времени измерения, что снижает напряжение на чувствительный образец (2) (3). Кроме того, пользователь может активировать программную функцию, называемую «Режим протеина», которая вводит короткие паузы во время измерений дзета-потенциала, что позволяет образцу остыть.

Univette - многоразовая кювета, предназначенная для измерения дзета-потенциала в органических растворителях или в растворителях с высокой проводимостью. Кювета достаточно прочная, чтобы выдерживать такие условия без повреждения электрода (4).

В настоящем исследовании мы демонстрируем совместные возможности анализатора частиц Litesizer™ 500 и Univette, используя "Режим протеина" Kalliope™ для измерения дзета-потенциала эталонного лизоцима белка в высококонцентрированных растворителях.

2 Эксперимент

Были приготовлены два различных раствора лизоцима из куриного яичного белка (Sigma-Aldrich):

- 0,1 мг / мл, растворенного в смеси 1: 1 10 мМ буфера BisTris (Carl Roth) и 50 мМ NaCl (J.T. Baker)
- 1,0 мг/мл, растворенного физиологическом растворе буферного фосфата (PBS, Sigma-Aldrich)

Образец объемом 900 мкл перенесли в кварцевую кювету, в которую погружалась Univette. Время установления равновесия было установлено на 2 минуты для первого измерения и по 30 секунд для последующих. Три независимых образца были испытаны для каждого раствора, на каждом образце было выполнено по 4 повторения (в общей сложности 12 измерений). В таблице показаны суммированные входные параметры измерений.

Концентрация образца	0.1 мг/мл	1 мг/мл
Растворитель	1:1 смес 10 мМ BisTris & 50 мМ NaCl (BisTris/NaCl)	Phosphate - buffered saline (PBS)
Напряжение	5 В	3 В
Число прогонов	20	20
Повторений	4	4
Режим «белка»	да	да

Таблица 1: Настройки эксперимента

В программном обеспечении Kalliope был активирован «Режим белка», чтобы дать возможность образцу остыть между измерениями, тем самым уменьшая влияние нагрева Джоуля.

3 Анализ полученных результатов

Средняя электропроводность образца 0,1 мг/мл, приготовленного в BisTris/NaCl, который измеряется автоматически при каждом измерении дзета-потенциала, составляла 6 мСм/см (таблица 2). Средний дзета-потенциал для этого раствора составил 12 мВ, как показано в таблице 2 и на рисунке 1. Относительное стандартное отклонение было ниже 5% для 12 измерений.

Образец №.	Ср. Дзета потенциал [мВ]	Отн. Станд. Отклонение [%]	Электропроводность [мСм/см]
1	12.3	3.64	6.069
2	12.1	6.09	6.039
3	12.0	4.38	6.024
1 - 3	12.1	4.57	6.044

Таблица 2: Результаты дзета-потенциала для 3 образцов лизоцима 0,1 мг/мл, растворенного в BisTris/NaCl. Каждое значение - среднее из 4 измерений

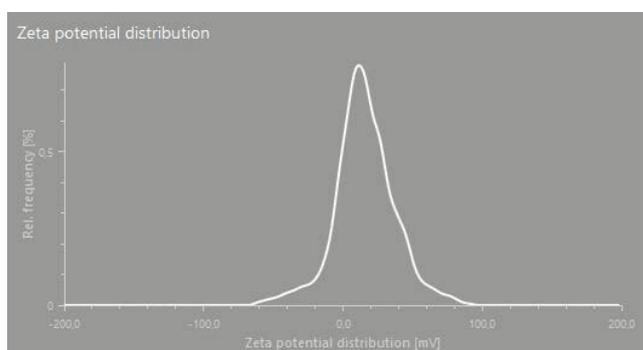


Рисунок 1: Пример распределения дзета-потенциала для лизоцима 0,1 мг/мл BisTris/NaCl

Раствор 1 мг/мл, приготовленный в PBS, дал значение дзета-потенциала 9 мВ, как показано в таблице 3 и отображено на рисунке 2. Однако средняя электропроводность этого раствора была значительно выше, чем у BisTris/NaCl (29,4 мСм/см против 6 мСм/см).

Несмотря на высокую проводимость, относительное стандартное отклонение между измерениями было удовлетворительным, составляя в среднем 7,2% (Таблица 3). Это значительно ниже максимально допустимой повторяемости 10%, установленной стандартом ISO (5), и предполагалось, что ELS не приводит к значительному разрушению образца.

Внешний вид палладиевых электродов Univette после 12 измерений также показал, что не обнаружено никаких видимых повреждений.

Образец №]	Ср. Дзета потенциал [мВ]	Отн. Станд. Отклонение [%]	Электропроводность [мС/см]
1	9.5	5.8	30.78
2	8.8	4.4	28.92
3	8.8	9.44	28.50
1 - 3	9.0	7.19	29.40

Таблица 3: Результаты дзета-потенциала для 3 образцов лизоцима 1 мг/мл, растворенного в PBS. Каждое значение - среднее из 4 измерений

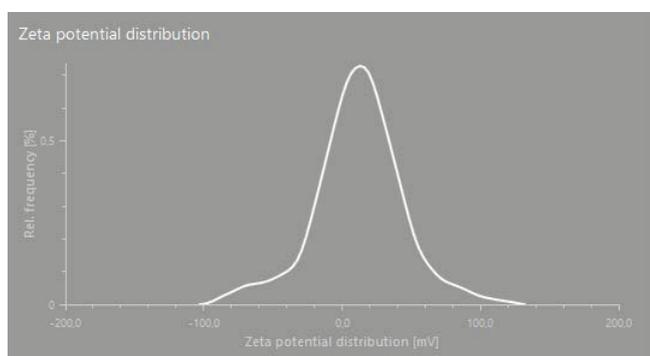


Рисунок 1: Пример распределения дзета-потенциала для лизоцима 1 мг/мл PBS

4 Заключение

В этом отчете о применении мы демонстрируем, что воспроизводимые измерения дзета-потенциала белков в растворителях с высокой проводимостью достижимы при использовании Litesizer™ 500 и Univette. Запатентованная технология cmPALS позволяет проводить измерения дзета-потенциала при более низких напряжениях и при коротких интервалах измерения, что значительно снижает воздействие на образец. Это позволяет проводить измерения методами ELS даже для образцов белка с низкой концентрацией (0,1 мг/мл) и с высокой проводимостью. Кроме того, специальный режим для белков в программе Kalliope™ ограничивает нагрев во время измерений ELS, и способствует сохранению как образца, так и кюветы.

5 Литература

1. **Salgын, S., U. Salgын & S. Bahadir (2012).** Zeta Potentials and Isoelectric Points of Biomolecules: The Effects of Ion Types and Ionic Strengths. *Int. J. Electrochem. Sci.* 7:12404-12414.
2. **Noack, H. & C. Moitzi (2015).** Modulator monitoring during measuring electromobility. *European Patent EP2735870 B1.*
3. **Moitzi, C. & B. Petrillo (2016).** Faster, more sensitive zeta-potential measurements with cmPALS and the Litesizer™ 500. *Anton Paar Application Report D51IA021*, www.anton-paar.com.
4. **Burgstaller, C. & N. Etchart (2017).** Measuring zeta potential in organic solvents using the Univette. *Anton Paar Application Report D51IA034*, www.anton-paar.com.
5. **ISO 13099-2 (2012).** Colloidal systems: Methods for zeta-potential determination, Part 2: Optical methods. *International Organization for Standardization*, www.iso.org.

Измерения

Carina Burgstaller

Текст

Carina Burgstaller & Nathalie Etchart

Contact 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