

NOTA APLIKACYJNA – JAGIELLOŃSKIE CENTRUM INNOWACJI

POMIAR MASY MOLOWEJ TECHNIKĄ DLS ORAZ SEC-MALS

dr Paweł Hrynczyszyn*, Marzena Gizler*, Adam Wąchała*

*Laboratorium Chromatografii i Spektrometrii Mas, Jagiellońskie Centrum Innowacji, ul. Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków

WSTĘP

Jedną z technik analizy białek i polimerów jest detekcja rozpraszania światła lasera – w sposób dynamiczny (DLS) oraz statyczny (MALS). Wykorzystanie tychże detektorów, obok klasycznych UV i RI w chromatografii wykluczenia umożliwia uzyskanie informacji nie tylko o stanie oligomerycznym, ale także masie molowej (Mw) i promieniu hydratacyjnym (Rh) podczas jednego pomiaru.

Wykorzystanie techniki DLS w trybie kuwetowym umożliwia szybkie określenie masy molowej białka w roztworze bez konieczności specjalistycznego przygotowania próbek. Jest to idealne narzędzie do określenia rozkładu wielkości cząstek oraz optymalizacji warunków pomiarowych.

Celem niniejszej noty aplikacyjnej jest określenie czystości i stanu oligimerycznego mieszaniny białek, wykorzystując techniki dynamicznego i statycznego rozpraszania światła.

METODA

Dynamiczne rozpraszanie światła lasera (DLS)

- DYNAPRO NANOSTAR Detektor rozpraszania światła lasera DLS (Wyatt Technology)
- Pomiar wykonywany w kuwetach plastikowych (PO 0043837), objętość próbki badanej 10 µl, temperatura badania 25°C
- Oprogramowanie: Dynamics v.7.5.0.17

Chromatografia wykluczenia sprzężona z detektorem rozpraszania światła (SEC-MALS)

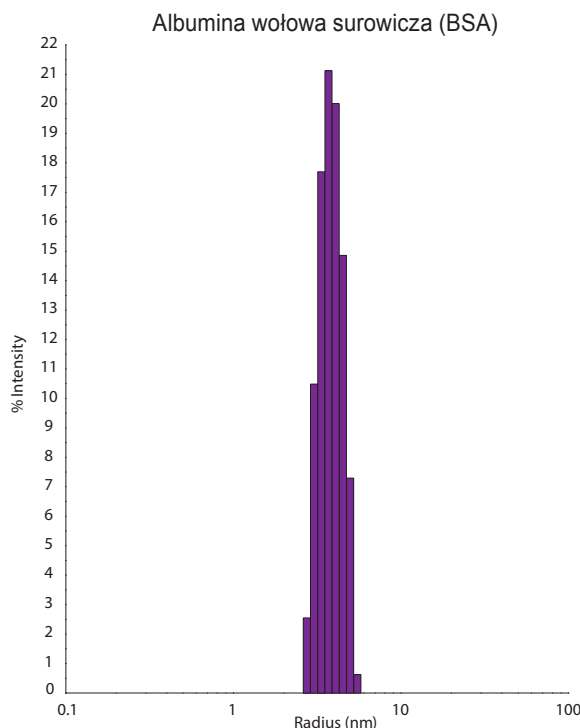
- System analityczny: DionexUltiMate 3000 sprzężony z detektorem UV-VIS, detektorem RefractoMax 520 ERC (RI) oraz detektorami rozpraszania światła lasera: DAWN8+ (MALS)
- Kolumna: WYATT 300Å, 5 µm, 300x7,8 mm, faza mobilna: 50 mM diwodorofosforan sodu; 50 mM NaCl, pH=7,0 przepływ=0,8 ml/min
- Oprogramowanie: Astra 6.1

Wykorzystane wzorce białkowe

Albumina wołowa surowicza (BSA) – Mw-R=66 kDa (Sigma Aldrich, Niemcy);

Mioglobulina – Mw-R=17 kDa (Sigma Aldrich, Niemcy);

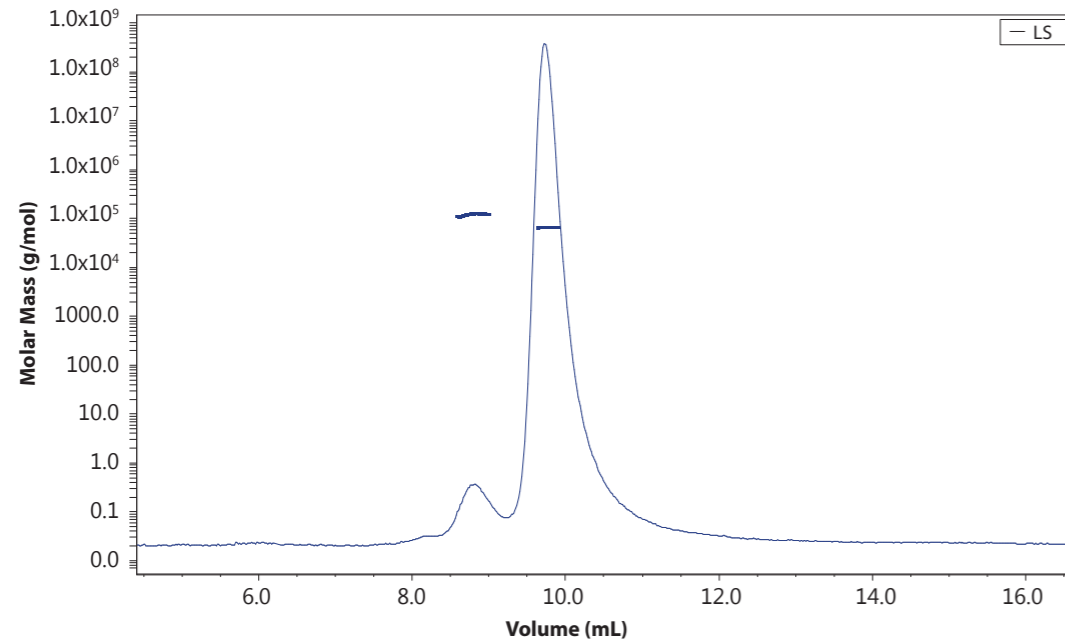
Tyreoglobulina – Mw-R=670 kDa (Sigma Aldrich, Niemcy).



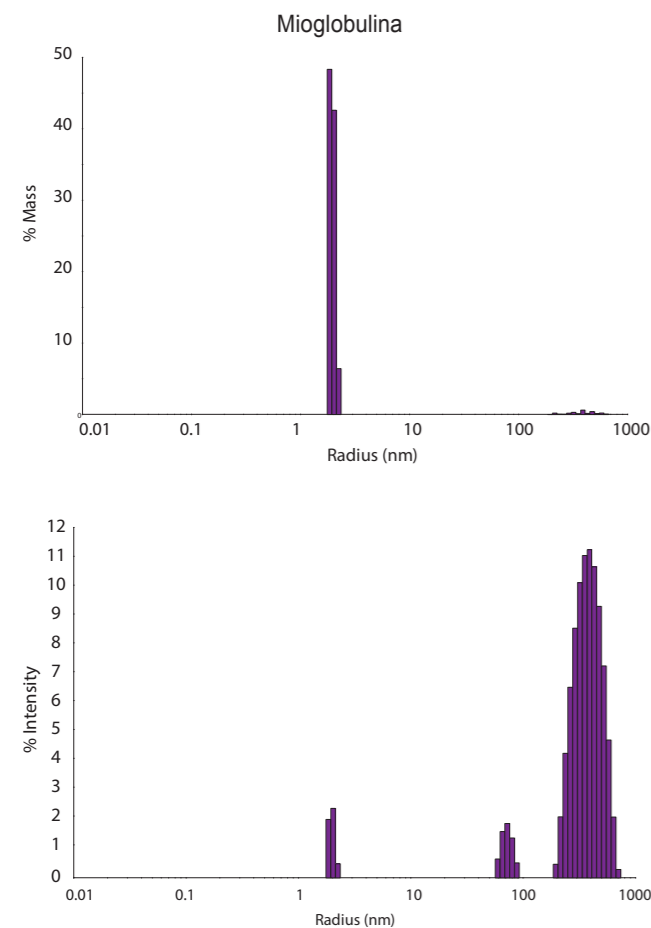
Rysunek 1. Pomiar BSA techniką DLS

Z pomiarów kuwetowych dowiadujemy się, iż główną populacją białek w badanej mieszaninie jest ta o promieniu hydratacyjnym R_h równym $3,9 \pm 0,1$ nm, która charakteryzuje się niewielką polidispersyjnością. Wyznaczona masa molowa M_w wynosi $79,0 \pm 1,0$ kDa. Zawyżona masa molowa wynika prawdopodobnie z obecności dimerów w roztworze. Aby potwierdzić tę tezę, niezbędny jest pomiar SEC-MALS.

SEC-MALS potwierdza przypuszczenia o stanie oligomerycznym białka: w roztworze znajdują się dwie populacje – monomer o masie M_w -R = $68,4 \pm 0,3$ kDa oraz dimer o masie M_w -R = $136,2 \pm 0,2$ kDa. Jak można zauważyć, pomiar SEC-MALS umożliwia dokładne wyznaczenie masy molowej poszczególnych frakcji białkowych.

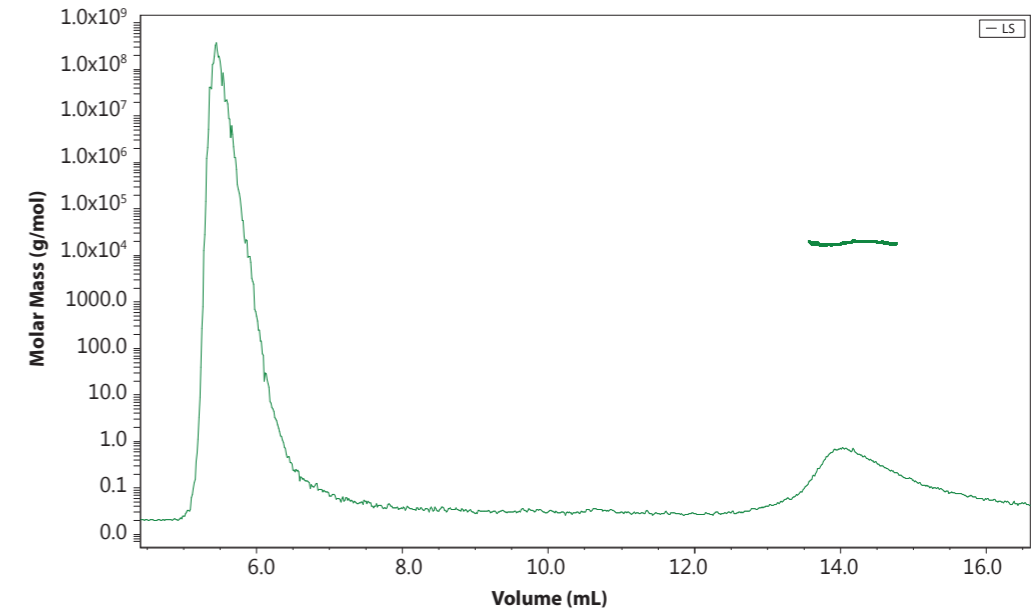


Rysunek 2. Pomiar BSA techniką SEC-MALS



Rysunek 3. Pomiar mioglobuliny techniką DLS

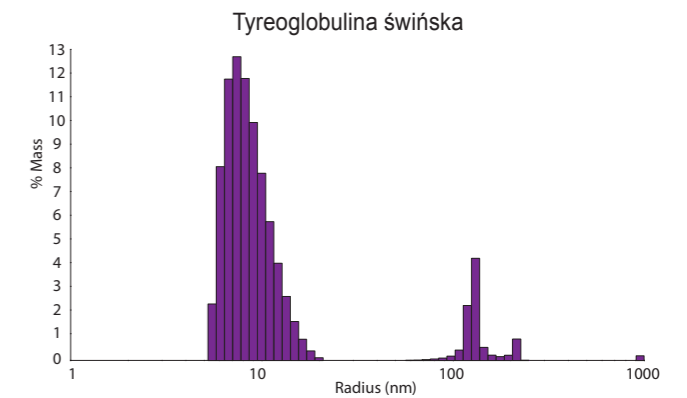
Porównanie histogramów % masowego oraz % intensywności pozwala stwierdzić, iż przeważająca część frakcji białkowej (względem stosunku masowego) charakteryzuje się $R_h = 2,1 \pm 0,1$ nm. Masa białka: M_w -R = $18,6 \pm 3,0$ kDa. Prócz badanego białka w roztworze znajdują się duże cząstki, silnie rozpraszające światło lasera.



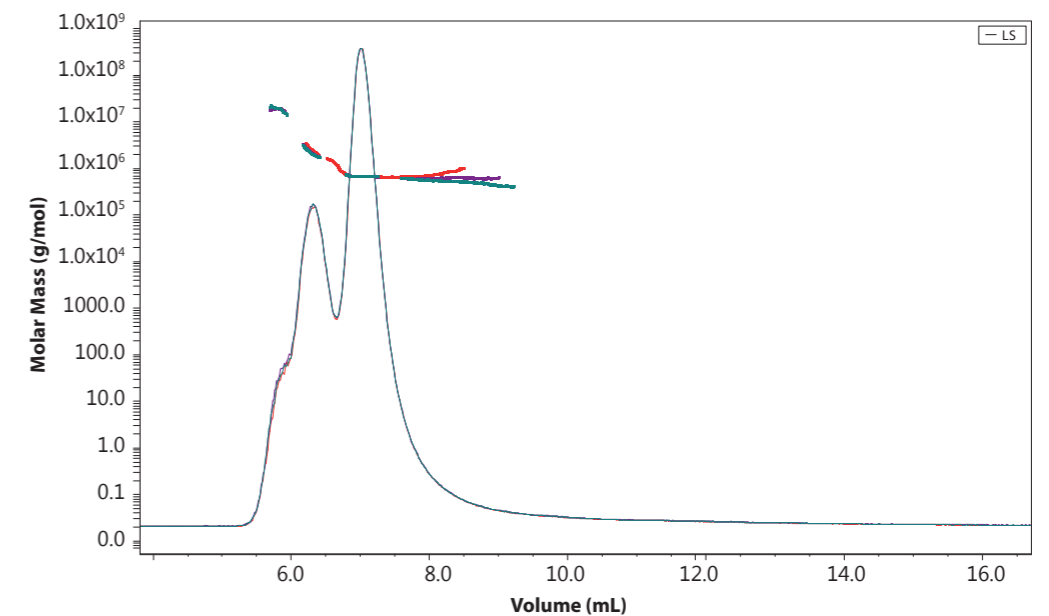
Rysunek 4. Pomiar mioglobuliny techniką MALS

Widoczne podczas pomiarów duże cząstki w trakcie rozdzielania SEC są wykluczane na kolumnie (widoczne jako pik $R_t = 5$ min). O ich niewielkim stężeniu świadczy brak sygnału innych detektorów stężeniowych. M_w -R białka = $17,4 \pm 0,6$ kDa.

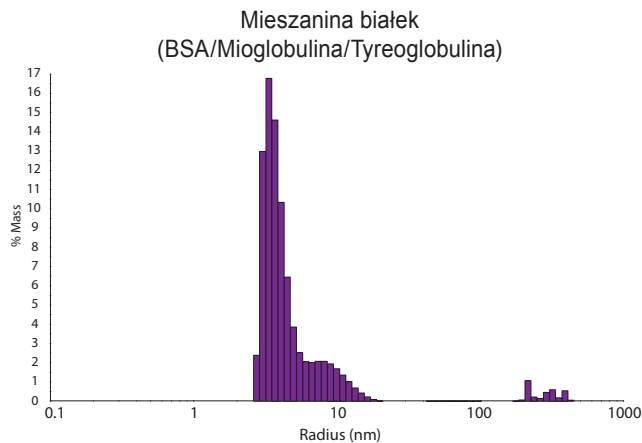
W przypadku tyreoglobuliny zaobserwowano dwie populacje: o $R_h = 8,7 \pm 0,1$ nm i M_w -R = $535,4 \pm 17,7$ kDa odpowiadające badanemu białku, oraz aglomeraty o $R_h > 100$ nm. Wysoka polidispersyjność pierwszego białka świadczy o obecności oligomerów. W tym przypadku dokładne wyznaczenie M_w -R z pomiaru DLS niesie duży błąd i niezbędny jest pomiar SEC-MALS celem rozdzielania poszczególnych merów. Chromatografia wykluczenia potwierdza przypuszczenia z pomiaru DLS – zaobserwowano frakcję białkową o M_w -R = $663,6 \pm 16,7$ kDa, odpowiadającą monomerowi tyreoglobuliny oraz frakcję wykluczone.



Rysunek 5. Pomiar tyreoglobuliny techniką DLS



Rysunek 6. Pomiar tyreoglobuliny techniką SEC-MALS



Rysunek 7. Pomiar techniką DLS

Rozkład wielkości cząstek dostarcza informacji, iż główna frakcja białkowa charakteryzuje się promieniem w zakresie $R_h=1,2-9,7$ nm. Wysoka polidispersyjność i widoczne dwa maksima na histogramie świadczą o istnieniu kilku populacji. Rozdział białek za pomocą kolumny SEC oraz detekcja wykorzystująca detektor MALS umożliwia wyznaczenie mas poszczególnych populacji.

Pomiar SEC-MALS wykazał istnienie 5 populacji.

Wyznaczone masy molowe:

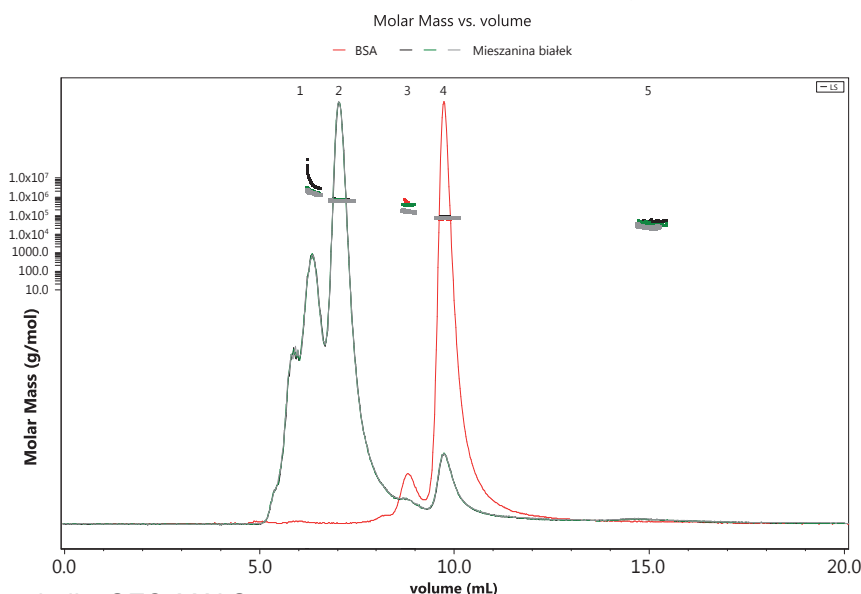
Mw-R 1 = 1585,5 kDa;

Mw-R 2 = 665,9 kDa;

Mw-R 3 = 140,0 kDa;

Mw-R 4 = 67,0 kDa;

Mw-R 5 = 26,0 kDa.



Rysunek 8. Pomiar techniką SEC-MALS

PODSUMOWANIE

Porównanie chromatogramu mieszaniny oraz roztworu BSA potwierdza zbieżność otrzymanych wyników. Oznacza to, że możliwe jest wyznaczenie masy analitu w próbce, bez konieczności wcześniejszego oczyszczania. Możliwe jest także uzyskanie informacji o procentowym stosunku poszczególnych frakcji.

Rozkład wielkości cząstek w roztworze:

10 – 50 kDa	10,35%
50 – 80 kDa	18,33%
80 – 200 kDa	21,35%
200 – 700 kDa	19,10%

Wykorzystanie detektora UV i RI umożliwia ponadto określenie stężenia. Stężenia monomerów białek odpowiadających odpowiednim frakcjom uzyskanym z pomiarów MALS-UV-RI (rys. 8): tyreoglobulina (pik nr 2)=0,35 μ M (odzysk 91%), BSA (pik nr 4) 4,94 μ M (odzysk 97%), mioglobulina (pik nr 5)=1,68 μ M (odzysk 99%). Pomiaru kuwetowe wykorzystujące dynamiczne rozpraszanie światła znajdują zastosowanie podczas kontroli parametrów białkowych, określaniu czystości czy optymalizacji innych metod analitycznych.

Połączenie chromatografii wykluczania z detektorem MALS daje możliwości określenia mas molowych, stanu oligomerycznego czy rozdzielenia mieszanin

białkowych w jednym pomiarze, bez przygotowania próbki.

Na powyższych przykładach wykazano przydatność technik DLS oraz SEC-MALS do analizy białkowej. Błąd względny dla wykonanych pomiarów szacuje się w zakresie 0,95-2,7%.

KONTAKT

dr Paweł Hrynczyszyn

Kierownik Laboratorium Chromatografii i Spektrometrii Mas

K: +48 571 336 008

E: pawel.hrynczyszyn@jci.pl

Jagiellońskie Centrum Innowacji Sp. z o.o.

ul. Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków

Projekt został zrealizowany w ramach programu Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący (KNOW)

KNOW Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący

Treść niniejszej noty jest rozpowszechniana na licencji Creative Commons Użycie niekomercyjne – Bez Utworów Zależnych 4.0 (CC BY-NC-ND 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode.pl>

Listopad 2018 r.