ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНАЯ ЦЕНТРИФУГА AVANTI J-15R ПРЕИМУЩЕСТВА И ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ

Дж.П. Лусиано-Чади (J.P. Luciano-Chadee), Beckman Coulter, lsc-russia@beckman.com

УДК 54.053
БАК 03.01.06

Центрифугирование – важная составляющая многих биологических и химических рабочих процессов. В повседневной работе научных лабораторий центрифугирование применяют на каждом этапе работы, начиная с первоначального сбора и осаждения материала и заканчивая концентрированием белков. Более 70 лет компания Beckman Coulter Life Sciences сохраняет лидирующие позиции в создании и производстве центрифужных систем для задач лабораторного анализа и биотехнологий. В 2017 году компания произвела революцию на рынке, выпустив настольные центрифуги нового поколения серии Avanti J-15, сочетающие в себе все достоинства напольных центрифуг серии Avanti и настольных центрифуг серии Allegra.

Традиционно основополагающими параметрами, определяющими конструкционные особенности настольных центрифуг, являлись время, температура и скорость. В новой серии центрифуг, благодаря технологии Ultra Harmonic Technology, удалось оптимизировать не только скорость, но и профиль разгона/торможения. При торможении образец испытывает воздействие различных сил, что может привести к смешиванию фракций. Ультраплавный и быстрый режим разгона/торможения минимизирует воздействие на образец, в результате чего увеличивается полнота осаждения и уменьшается количество загрязняющих компонентов и неосажденного материала в супернатанте. Эффективность

разделения особенно важна для образцов, образующих неплотный осадок с низкими адгезивными свойствами.

Другим важным моментом работы лаборатории является время, затрачиваемое на решение задачи. Часто с центрифугой работает не один сотрудник, при этом используется несколько протоколов, что может создавать определенные сложности из-за недоступности центрифуги. Общее время, затраченное на выполнение работы, включает, в том числе, и время, в течение которого выполняется торможение и происходит полная остановка ротора. В протоколах с большим количеством рабочих циклов время, сэкономленное в каждом цикле, может в итоге при-

вести к значительному повышению эффективности всего рабочего процесса.

В статье описаны два эксперимента, демонстрирующие достоинства центрифуги серии Avanti J-15 при проведении быстрого и полного осаждения. Эффективность осаждения, снижение контаминации и выход материала проиллюстрированы на примере клеток *E. coli*, центрифугирование которых часто вызывает определенные сложности. Другая серия экспериментов демонстрирует экономию времени при осаждении белка альбумина сыворотки крупного рогатого скота (БСА) на центрифуге Avanti J-15R с ротором JS-4.750. В обоих экспериментах центрифугой сравнения служила центрифуга Allegra X-14R с ротором SX4750 производства Beckman Coulter.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОСАЖДЕНИЯ НА ПРИМЕРЕ КЛЕТОК *E. COLI*

Материалы. Компетентные клетки *E. coli* DH5-Alpha производства New England BioLabs. Раствор глицерина производства Sigma-Aldrich.

Методы. *E. coli* DH5-Alpha выращивали в течение ночи при 37°C и перемешивании 170 об./мин. Ночную культуру охлаждали на водяной бане при 4°C. Затем отбирали образец культуры для измерения оптической плотности (OD_{600}) с помощью спектрофотометра Beckman-Coulter DU730 UV/Vis с длиной оптического пути 10 мм. Образец разводили в соотношении 1:3.

В 50 мл коническую пробирку отбирали аликвоту клеток объемом 40 мл. В дальнейшем использовали по одному образцу для каждой центрифуги: Avanti J-15R и Allegra X-14R (рис.1).

Для первоначального осаждения клеток центрифугирование в каждой центрифуге выполнялось при 3600 g в течение 20 минут в режиме максимального

Рис.1. Этап подготовки эксперимента: аликвоты образца бактериальных клеток

разгона и торможения. Осадки отмывали 20 мл 10% глицерина и центрифугировали при 3600 g в течение 20 минут. Чтобы предотвратить потерю образца, для разгона и торможения использовался режим 4. После центрифугирования супернатант аккуратно удаляли и дважды повторяли отмывку глицерином. Затем клетки ресуспендировали в 20 мл натрий-фосфатного буфера (PBS). Аликвоты разводили 1X PBS в соотношении 1:3. Затем с помощью спектрофотометра Beckman-Coulter DU730 UV/Vis измеряли оптическую плотность при длине волны 600 нм.

Результаты и обсуждение. Чтобы показать преимущества эффективности осаждения для технологии Ultra Harmonic Technology, были приготовлены

Таблица 1. Сравнение эффективности осаждения для разных моделей центрифуг

Образец до центрифугирования, центрифуга	OD (при разведении 1:3)	Концентрация клеток (клеток/мл) с учетом разведения	Потеря образца
Исходная культура клеток	0,56	$1,35 \times 10^9$	—
Avanti J-15R	0,55	$1,33 \times 10^9$	1,6%
Allegra X-14R	0,48	$1,15 \times 10^9$	14%

Таблица 2. Реальная продолжительность циклов в центрифугах Avanti J-15R и Allegra X-14R при заданном времени 10 мин

Центрифуга	Реальное время цикла (мм:сс)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Среднее
Avanti J-15R	10:49	10:53	10:55	10:54	10:55	10:50	10:54	10:55	10:56	10:46	10:52
Allegra X-14R	12:03	12:01	12:02	12:03	12:03	12:02	12:01	12:03	12:02	12:01	12:02

образцы одинакового объема, и центрифугирование на обеих центрифугах выполнялось в одинаковых режимах. Оптическая плотность измерялась при разведении 1:3, но количество клеток пересчитывалось с учетом разведения. После завершения этапа выращивания клеток измерялась исходная оптическая плотность, при этом вычисленная концентрация клеток составила $1,35 \times 10^9$ клеток/мл. При вычислении концентрации клеток использовался коэффициент экстинкции *E. coli*, найденный на основе измеренного на спектрофотометре значения оптической плотности. В таблице 1 приводятся результаты эксперимента.

После трех циклов отмывки глицерином вычислялся выход клеток и выполнялось сравнение результатов для двух центрифуг. Новая центрифуга Avanti J-15R пока-

зала превосходные результаты, свидетельствующие о более высокой эффективности разделения и осаждения образцов. После нескольких отмывок глицерином было потеряно менее 2% образца, т.е. почти в десять раз меньше, чем на центрифуге сравнения. Этот результат был получен не только математически, его можно было наблюдать визуально. Образец, извлеченный из центрифуги Avanti J-15R после этапа осаждения, имел прозрачный супернатант, в отличие от образца, извлеченного из центрифуги Allegra X-14R (рис.2).

При использовании центрифуг аналогичного класса других производителей потеря образца иногда может достигать 50%. При невысоком выходе количество материала уменьшается, что приводит к необходимости повторять трудоемкое выделение. Незапланированное повторение этапов методики ведет к возрастанию затрат, использованию дополнительных ресурсов и привлечению дополнительных сотрудников.

ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ВЫДЕЛЕНИЯ НА ПРИМЕРЕ БСА

Материалы. Альбумин сыворотки крупного рогатого скота (БСА) производства Sigma-Aldrich. Центрифужные концентраторы Amicon Ultra-4 10K MWCO производства Millipore.

Методы. Было приготовлено 100 мл раствора БСА (1 мг/мл) в 1хPBS (натрий-фосфатный буфер). Для подтверждения концентрации белка была измерена оптическая плотность (OD_{280}) исходного раствора. Измерение выполнялось с помощью спектрофотометра Beckman Coulter DU730 UV/Vis с длиной оптического пути 10 мм.

Центрифугирование в каждой центрифуге выполнялось при 4000 g в течение 10 минут, всего было выполнено 10 циклов с использованием максимально быстрого разгона и торможения. Для концентрирования образца использовался один и тот же concentra-

Рис.2. Визуальное сравнение образцов, отцентрифугированных в Allegra X-14R и Avanti J-15R.

Таблица 3. Выход БСА в центрифугах Avanti J-15R и Allegra 14R

Центрифуга	Исходная OD ₂₈₀	Исходный объем	Исходное количество БСА	Конечная OD ₂₈₀	Конечный объем	Конечное количество БСА
Avanti J-15R	0,642	40 мл	38,9 мг	16,461	1450 мкл	36 мг
Allegra X-14R	0,642	40 мл	38,9 мг	15,034	1550 мкл	35 мг

тор Amicon. Перед началом каждого цикла во вставку концентратора добавляли 4 мл раствора БСА и перемешивали, всего в каждой центрифуге было подвергнуто концентрации 40 мл БСА. Для каждого цикла регистрировалось заданное и реальное время центрифугирования.

По завершении последнего этапа центрифугирования оптическая плотность OD₂₈₀ каждого образца БСА измерялась с помощью спектрофотометра Beckman-Coulter DU730 UV/Vis.

Результаты и обсуждение. Заданное время центрифугирования устанавливалось в ручном режиме ввода параметров и составляло 10 мин для каждого цикла. Реальное время центрифугирования – от начала вращения ротора до полной его остановки – фиксировалось. Сравнение полученных значений приведено в таблице 2.

В среднем, каждый цикл центрифугирования в центрифуге Avanti J-15R выполнялся на 1 минуту 10 секунд быстрее, чем в центрифуге Allegra. Таким образом, суммарная экономия времени за 10 циклов составила 12 минут или более 10%.

В таблице 3 приведены исходная и конечная оптическая плотность OD₂₈₀ БСА и концентрация, вычисленная с использованием коэффициента экстинкции БСА. Исходная концентрация БСА составила 0,97 мг/мл. Общий объем БСА для проведения эксперимента в каждой центрифуге составил 40 мл, поэтому всего было подвергнуто концентрации 38,9 мг белка. По завершении центрифугирования из концентратора в центрифуге Avanti J-15R было получено 36 мг БСА, а из концентратора в центрифуге Allegra X-14R – 35 мг БСА, то есть выход материала в обоих образцах составил примерно 90%.

Таким образом, благодаря технологии Ultra Harmonic Technology можно максимально эффективно использовать время при проведении экспериментов. Кроме того,

использование центрифуги Avanti позволяет сделать рабочий цикл более коротким и быстрее перейти к следующему этапу. Это также обеспечивает более высокую сохранность образцов из-за уменьшения воздействия воздуха и изменений температуры, что особенно важно при работе с белками, когда даже небольшие изменения параметров очистки могут привести к нежелательному воздействию на структуру молекул.

* * * *

Получение максимального выхода материала при центрифугировании критически важно для выполнения исследований. При потере образца может потребоваться повторение эксперимента несколько раз. Недостаточное отделение контаминантов может привести к получению неточных результатов. Особенно остро этот вопрос встает в случае работы с образцами, образующими мягкий неплотный осадок, которые включают как природные материалы, такие как клетки или водоросли, так и синтетические соединения. При центрифугировании таких образцов существует высокая вероятность потери материала из-за смешивания фракций, поэтому до сих пор для них использовались режимы с более длительным разгоном и торможением.

Вместе с тем научное сообщество заинтересовано в повышении эффективности рабочего процесса, одной из составляющих которой является время, затраченное на выполнение научных экспериментов.

Технология Ultra Harmonic Technology позволяет усовершенствовать процесс разгона и торможения и обеспечить решение обеих составляющих: улучшить качество разделения и ускорить рабочий процесс.

Центрифуга Avanti J-15R превосходно подойдет лабораториям, которые уделяют первостепенное внимание высокому выходу образцов и эффективному управлению временем. ■