

UV-Vis 분광기를 사용한 단백질 열 안정성 특성 분석

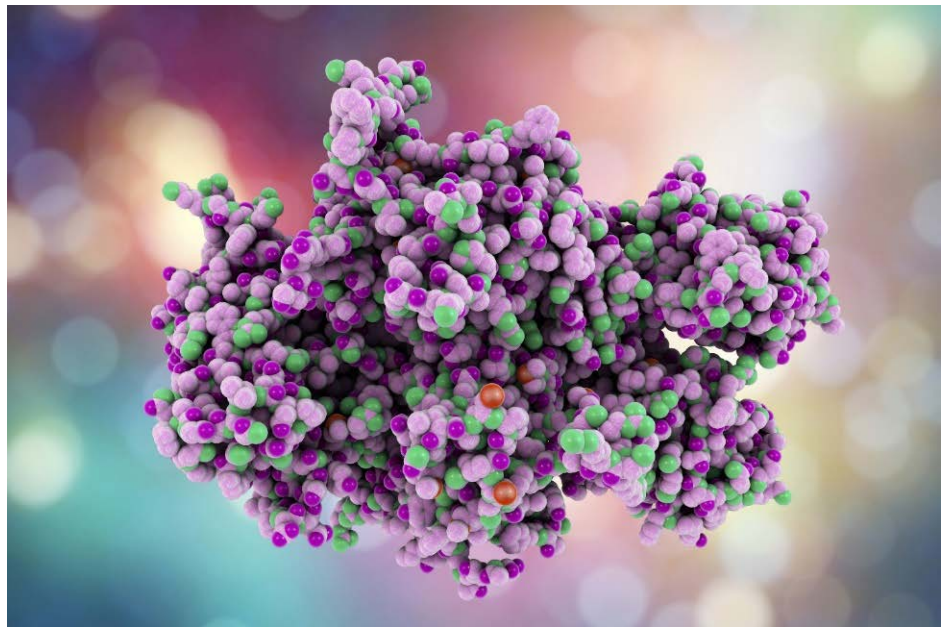
단백질 치료 연구에서 Peltier 온도 제어 멀티셀이 포함된 Agilent Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계의 이점

저자

Carlos Santos Martin
La Trobe 분자과학연구소
(LIMS), La Trobe 대학,
호주 빅토리아 3086, 멜버른

Biswaranjan Mohanty
시드니 분석 핵심연구시설
(Sydney Analytical Core
Research Facility),
시드니 대학, 호주
뉴사우스웨일즈 2006, 시드니

Wesam Alwan, Mathieu Rault
Agilent Technologies, Inc.



개요

단백질의 열 안정성은 바이오 치료제의 중요한 특성으로 여겨지는데, 단백질의 안정성과 구조에 영향을 미치는 물리적 및 화학적 특성에 대한 통찰력을 제공하기 때문입니다. 이 연구는 Peltier 온도 제어 멀티셀 모듈이 장착된 Agilent Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 단백질의 열 안정성과 용융 온도 특성을 분석하는 방법을 빠르고 간단하게 보여줍니다.

서론

신약 개발은 잠재적인 신약과 그 치료 효과를 입증해야 하는 다각적인 과정입니다. 약물 표적을 적절하게 식별하고 특성화는 신약 개발 과정의 중요한 단계로, 납 치료 화합물을 원활하게 식별할 수 있는 초석이 됩니다.¹ 단백질 치료제의 경우, 생화학적 특성화에는 분자량, 균질성 및 불균일성, 용해도, 열 안정성, 아미노산 서열 조성, 2차 구조, 3차원 구조 및 단백질 변형이 포함됩니다.^{2,3}

열 안정성 데이터는 단백질 안정성과 구조에 영향을 미치는 물리적 및 화학적 특성에 대한 통찰력을 제공합니다. 용융 온도는 다양한 기술을 사용하여 점진적인 온도 증가에 따른 시료의 특성 변화를 모니터링하여 결정할 수 있습니다(표 1). 단백질이 고온에 노출되면 2차 및 3차 구조에 변화가 생깁니다. 이러한 구조적 변화는 소수성 코어를 노출시키고 단백질 응집으로 이어집니다.⁴ 단백질의 절반이 여전히 가용성 형태로 존재하는 온도는 그림 1에서와 같이 뚜렷한 녹는점(T_m)으로 알려져 있습니다. 결합된 리간드가 있으면 이 온도가 증가할 수 있습니다.^{5,6} 열 안정성을 연구하면 리간드 결합, 약물 안정성, 보관 기간 및 최적의 보관 조건을 보다 잘 이해할 수 있으며, 이는 약물의 향후 생산 및 상업화에 유용한 정보로 이용됩니다.

UV-Vis 분광기를 이용한 단백질의 열 안정성 분석

표 1은 단백질의 열 안정성을 측정하는 데 사용되는 다양한 기술의 장점과 단점을 요약한 내용입니다. UV-Vis 분광기는 분석의 많은 문제를 극복합니다. UV-Vis는 형광 표지 없이 직접 흡광도 측정을 제공하고, 소량의 시료를 사용하여 측정할 수 있으며, 결과를 빠르고 쉽게 해석하고 보고할 수 있습니다.

이 응용 자료는 단백질의 열 안정성 및 재현성 특성 분석에 Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계(그림 2)가 어떤 이점이 있는지 입증합니다. Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계는 Peltier 블록에 피드백을 제공하는 통합 큐벳 내 온도 프로브를 사용하여 측정 중에 용액의 온도를 제어할 수 있습니다. 8-포지션 멀티셀 홀더가 기기에 내장되어 있으며 물이 없는 공랭식 Peltier 장치를 사용하여 시료 온도를 0~110°C 사이에서 제어합니다. 보다 효과적인 실험을 위해 멀티셀의 각 큐벳 위치를 동시에 측정하여 다른 기술에 비해 분석을 더 빠르게 수행합니다.

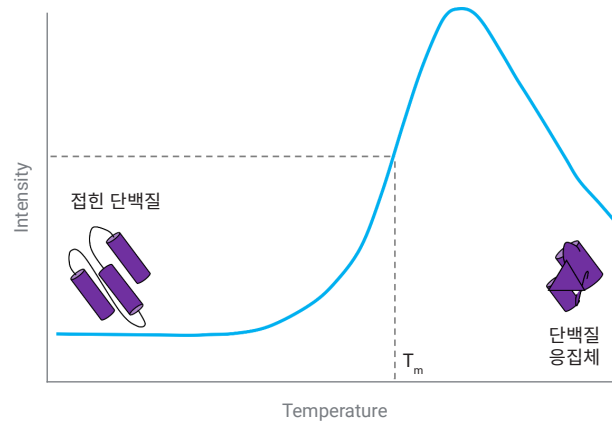


그림 1. 온도 증가에 따른 단백질 강도(또는 흡광도)의 일반적인 반응.

표 1. 단백질의 열 안정성을 측정하는 데 사용되는 기술.

기법	원리	장점	단점
원색색 분광법 ^{7,8}	원형 편광을 이용한 타원을 척도로 흡광도를 측정합니다.	- 소량의 물질만 필요 - 고감도 - 고분해능	- 시간 소모적 - 일부 완충액은 원자외선에서 간섭을 일으킵니다
차등적 스캐닝 비색법 ^{9,10}	기준 물질에 대비시켜 열용량의 변화를 측정합니다.	- 소량의 물질만 필요 - 고분해능	- 결과 해석이 어려울 수 있음
열 이동 분석 ^{11,12}	소수성 분자에 형광단 염료가 결합할 때 형광의 변화를 측정합니다.	- RT-PCR 장비에서 하나 이상의 시료를 실행할 수 있음 - 고감도 - 소량의 물질만 필요	- 형광 프로브 필요 - 형광 프로브가 구조적 변화를 일으킬 수 있음 - 단백질에 형광 프로브를 수용할 수 있는 포켓이 있어야 함



그림 2. Agilent Cary 3500 UV-Vis 멀티셀 분광 광도계를 사용하면 8개의 큐벳 위치에서 동시에 최대 4개의 온도를 실험할 수 있습니다.



그림 3. 이 연구에 사용된 애질런트 울트라 마이크로셀. Agilent Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계의 아주 작고 집중된 빔이 조정이 필요 없는 영구적으로 정렬된 작은 구멍을 통과합니다.

실험

시료

Escherichia coli disulfide bond isomerase A(EcDsbA, 천연 상태) 시료는 호주 La Trobe 대학의 La Trobe 분자과학연구소 (LIMS)에서 제공했습니다. 50mM NaCl, 1mM EDTA 및 100mM 인산나트륨을 포함하는 완충액에 약 0.6mg/mL의 EcDsbA 용액을 준비하고 pH를 7.0으로 조정했습니다. Agilent ultra-microcell, 50µL 부피, 10mm 광학 경로 길이 석영 큐벳을 사용했습니다(부품 번호 5062-2496, 그림 3). 순수 인산염 완충액을 참조(블랭크) 용액으로 사용했습니다.

기기 및 분석법

Agilent Cary UV Workstation 소프트웨어를 사용하여 Cary 3500 UV-Vis 멀티셀 Peltier 분광 광도계를 제어했습니다. 단백질 흡광도 및 열 안정성을 측정하는 데 사용되는 분석법 파라미터를 각각 표 2 및 3에 나와 있습니다. 열 안정성 분석 연구를 위해 0.1°C/min의 램프 속도를 사용하여 0.1°C마다 데이터를 수집했습니다. 각 데이터 포인트가 기록되기 전에 2초 동안 신호의 평균을 구했습니다.

표 2. 파장 범위 스캔 파라미터.

파라미터	값
기기	Agilent Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계
파장 범위	200 ~ 400nm
신호 평균화 시간	0.1초
스펙트럼 대역폭	2nm
시료량	80µL, 증발을 고려해 여분의 부피가 추가됨

표 3. 열 응용 실험 파라미터.

파라미터	값
기기	Agilent Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계
파장	280nm
신호 평균화 시간	2초
스펙트럼 대역폭	2nm
데이터 간격	0.1°C
램프 속도	0.1°C/분
온도 제어	Peltier 블록
온도 범위	25~90°C
평활화 및 미분 필터 크기	25
평활화 및 미분 데이터 간격	0.1°C
분석 온도 하한	30°C
분석 온도 상한	90°C
큐벳	울트라 마이크로셀 석영 큐벳
시료량	70µL

높은 램핑 속도에서 응집에 대한 시료 민감성을 고려해 0.1°C/min의 램프 속도를 사용했습니다. 실험 온도는 Cary 3500의 Peltier 블록을 통해 제어했습니다.

결과 및 토의

EcDsbA 단백질의 최대 흡광 피크를 결정하기 위해 표 2에 나타낸 파라미터를 사용하여 Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계로 파장 스캔을 수행했습니다. 멀티셀 모듈이 장착된 Cary 3500을 사용하면 7개의 시료와 1개의 참조 용액을 동시에 측정할 수 있습니다. 그러면 동일한 조건에서 동시에 측정값을 수집하므로 결과의 신뢰도가 향상됩니다. 예를 들어 70μL과 같은 작은 시료량이 필요한 경우, 울트라 마이크로셀을 사용하여 측정을 수행할 수 있습니다(그림 3). Cary 3500 시스템에는 작고 집중된 빔이 사용되므로 사전 정렬 없이 울트라 마이크로셀로 정확한 측정을 수행할 수 있습니다. *EcDsbA*의 최대 흡광 피크는 그림 4와 같이 280nm에서 발견되었습니다.

EcDsbA 단백질의 열 안정성 분석을 위해 온도가 증가함에 따라 280nm에서 흡광도를 모니터링했습니다. 시료 온도는 표 3에 명시된 바와 같이 0.1°C/min의 램프 속도로 Peltier 블록 온도를 사용하여 제어했습니다. 온도가 상승함에 따라 피크가 관찰되어 단백질 구조의 변화로 인한 단백질의 흡광도 변화를 알 수 있었습니다. 열 용융 플롯(그림 5)은 *EcDsbA* 단백질이 고온(65°C 이상)에서 전이가 발생하는 모습을 보여줍니다.

Cary UV Workstation 소프트웨어는 측정된 흡광도 데이터의 1차 도함수를 사용하여 생물학적 시료의 T_m 을 계산합니다. T_m 은 분석의 상한 및 하한 온도와 함께 적절한

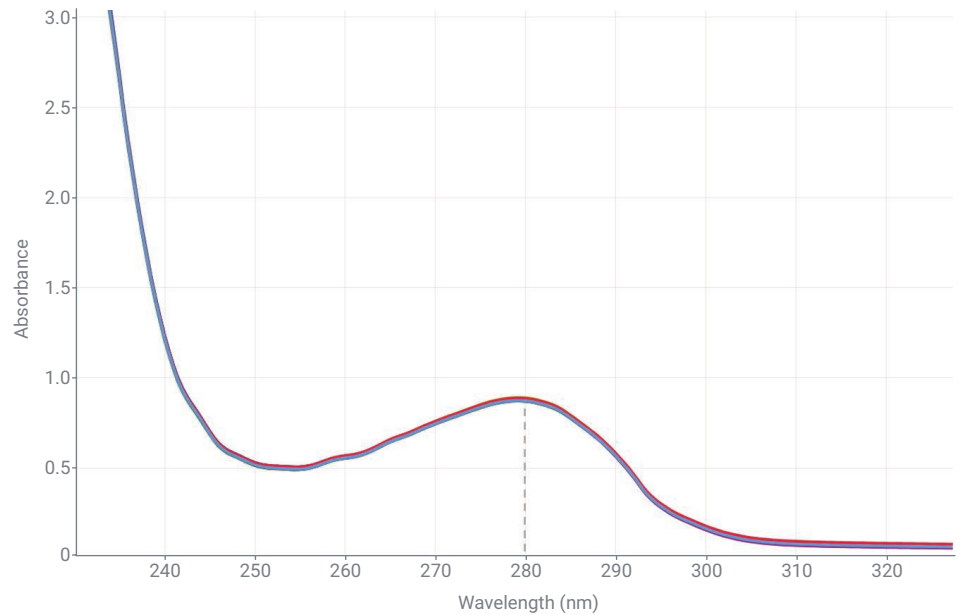


그림 4. *EcDsbA* 단백질(천연 상태)의 7개 개별 시료에 대한 파장 범위 스캔으로, 280nm에서 *EcDsbA* 단백질 피크를 보여줍니다. 울트라 마이크로셀을 사용하여 7개 시료를 동시에 측정했습니다.

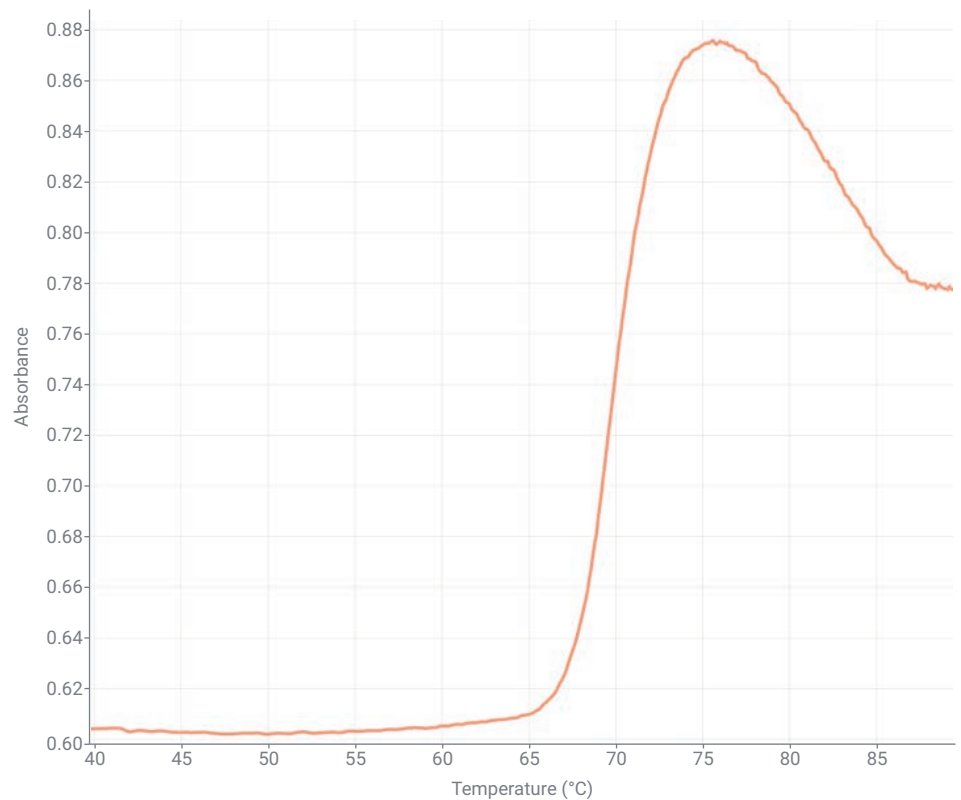


그림 5. *EcDsbA* 단백질의 열 용융 플롯. 온도 증가에 따른 흡광도의 변화는 단백질의 구조적 변화를 나타냅니다.

평활화 및 미분 필터 크기를 선택하여 결정할 수 있습니다. *EcDsbA*의 T_m 은 표 3에 제공된 분석 파라미터를 사용했을 때 69.86°C ($n = 6$, 그림 6)인 것으로 나타났습니다.

Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 얻은 *EcDsbA* 단백질의 계산된 T_m 은 표 4.14, 15에 나와 있는 것처럼 원이색법을 사용하여 얻은 이전에 보고된 결과와 일치했습니다.

반복성 연구를 실행하여 Cary 3500에 의한 *EcDsbA*의 T_m 측정 정밀도를 평가했습니다. 단백질 시료 용액을 6개 부분으로 나누고 각 부분을 70μL 울트라 마이크로셀을 사용하여 개별적으로 분석했습니다. 결과의 반복성은 *EcDsbA*의 T_m 값 평균과 표준편차를 계산하여 평가했습니다(표 4). Cary 3500 UV-Vis 시스템은 6번의 측정에서 표준편차가 0.16°C에 불과하여 탁월한 정밀도를 보여주었습니다.

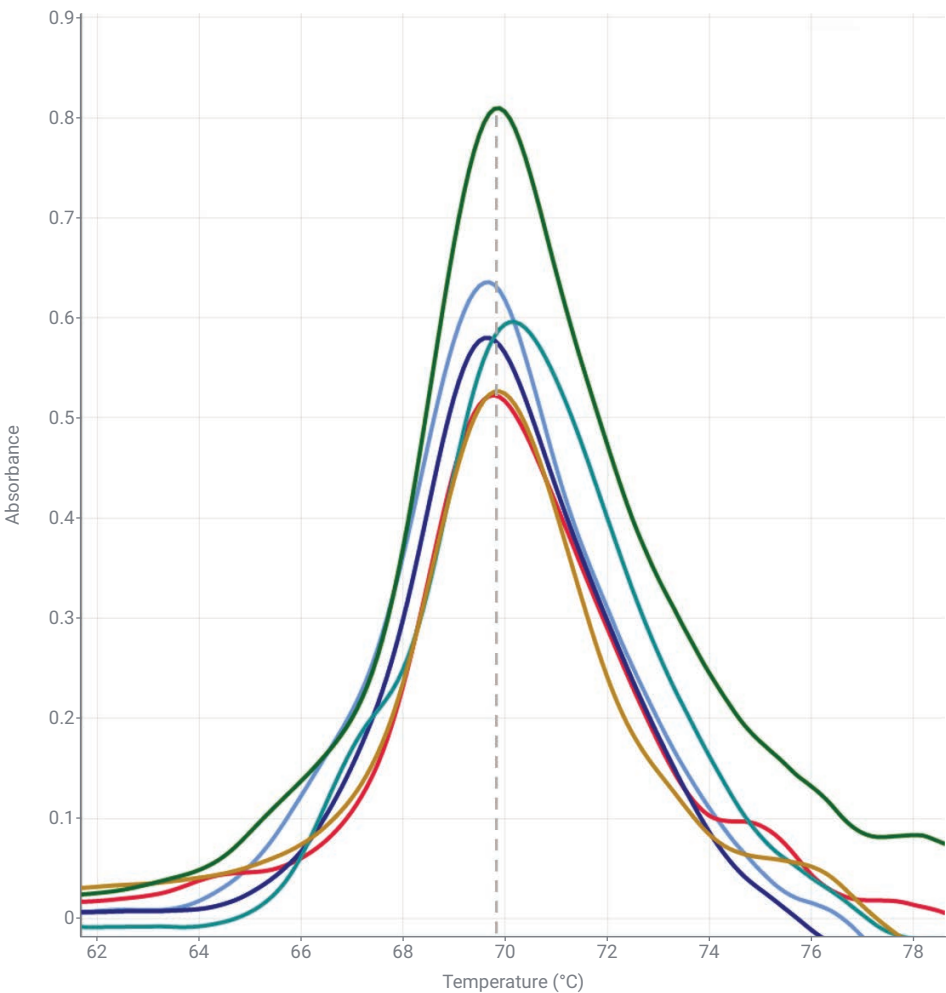


그림 6. Agilent Cary UV Workstation 소프트웨어를 사용하여 얻은 *EcDsbA* 단백질의 6개 개별 시료에 대한 1차 도함수 플롯($T_m = 69.86^{\circ}\text{C}$, $n = 6$).

표 4. Agilent Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 측정한 *EcDsbA* T_m 값과 문헌에 보고된 값.

기법	<i>EcDsbA</i> 의 $T_m(^{\circ}\text{C})$
Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계 복제 1	69.70
Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계 복제 2	69.80
Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계 복제 3	69.70
Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계 복제 4	70.20
Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계 복제 5	69.90
Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계 복제 6	69.90
평균치	69.86
표준편차	0.16
문헌 값 1 ¹⁴	68.55
문헌 값 2 ¹⁵	69.25

결론

Peltier 온도 제어 멀티셀이 있는 Agilent Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 EcDsbA 단백질 시료 6개의 녹는점(T_m)을 동시에 측정했습니다. EcDsbA 단백질 한 시료의 6개 부분에 대해 0.16°C의 표준편차가 얻어진 것으로 나타난 바와 같이 결과에 재현성이 있었습니다. 또한 Agilent Cary UV Workstation 소프트웨어를 사용하여 계산한 69.86°C의 평균 T_m 은 원색법 분광기를 사용하여 얻은 문헌 값과 일치했습니다. 이러한 결과는 단백질 열 안정성 분석에 Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계를 이용할 때 높은 정확성, 정밀도 및 속도를 얻을 수 있음을 보여줍니다.

Cary 3500 UV-Vis는 결과의 정확도를 저하시키지 않으면서 7개의 시료를 동시에 측정할 수 있어 분석법의 생산성이 더욱 극대화됩니다. 기기 설계를 통해 최소 3회의 반복 시료를 동시에 측정할 수 있어 반복 측정이 필요한 실험실에서 귀중한 시간을 절약할 수 있습니다.

Cary UV Workstation 소프트웨어에는 원활한 데이터 분석을 위해 평활화와 도함수 계산 기능이 내장되어 있습니다. 또한 데이터를 안전하게 수집, 처리, 보고 및 저장하기 위한 기술 제어 옵션과 함께 소프트웨어를 사용할 수 있습니다. 이러한 제어는 FDA 21 CFR 파트 11, EU Annex 11, GAMP5, 그리고 ISO/IEC 17025 및 EPA 40 CFR 파트 160의 규제를 준수해야 하는 실험실에 매우 중요합니다.

www.agilent.com

DE83250769

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
2022년 8월 4일 한국에서 인쇄
5994-5086KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

참고 문헌

1. Mohs, R. C.; Greig, N. H. Drug Discovery and Development: Role of Basic Biological Research, *Alzheimers Dement (NY)* **2017**, 11, 3(4), 651–657. doi: [10.1016/j.trci.2017.10.005](https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.10.005)
2. Schenone, M. et al. Target Identification and Mechanism of Action in Chemical Biology and Drug Discovery, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9(4), 232–40. doi: [10.1038/nchembio.1199](https://doi.org/10.1038/nchembio.1199)
3. Gashaw, I. et al. What Makes a Good Drug Target? *Drug Discovery Today* **2012**, 17, Supplement, S24–S30. doi: [10.1016/j.drudis.2011.12.008](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.12.008)
4. Jahn, T. R.; Radford, S. E. Folding Versus Aggregation: Polypeptide Conformations on Competing Pathways, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, 469(1), 100–17. doi: [10.1016/j.abb.2007.05.015](https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.05.015)
5. Mateus, A.; Määttä, T. A.; Savitski, M. M. Thermal Proteome Profiling: Unbiased Assessment of Protein State Through Heat-Induced Stability Changes, *Proteome Sci.* **2017**, 24, 15, 13. doi: [10.1186/s12953-017-0122-4](https://doi.org/10.1186/s12953-017-0122-4)
6. Ball, K. A. et al. An Isothermal Shift Assay for Proteome Scale Drug-Target Identification, *Commun. Biol.* **2020**, 3, 75. doi: [10.1038/s42003-020-0795-6](https://doi.org/10.1038/s42003-020-0795-6)
7. Greenfield, N. J. Using Circular Dichroism Collected as a Function of Temperature to Determine the Thermodynamics of Protein Unfolding and Binding Interactions, *Nat. Protoc.* **2006**, 1(6), 2527–35. doi: [10.1038/nprot.2006.204](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.204)
8. Beychok, S. Circular Dichroism of Biological Macromolecules, *Science* **1966**, 9, 154(3754), 1288–99. doi: [10.1126/science.154.3754.1288](https://doi.org/10.1126/science.154.3754.1288)
9. Abd-Elghany, M.; Thomas, M. K. A Review on Differential Scanning Calorimetry Technique and its Importance in the Field of Energetic Materials, *Physical Sciences Reviews* **2018**, 3, 4. 20170103. doi: [10.1515/psr-2017-0103](https://doi.org/10.1515/psr-2017-0103)
10. Deangelis, N. J.; Papariello, G. J. Differential Scanning Calorimetry. Advantages and Limitations for Absolute Purity Determinations, *J. Pharm. Sci.* **1968**, 57, 1868–1873. doi: [10.1002/jps.2600571109](https://doi.org/10.1002/jps.2600571109)
11. Pantoliano, M. W. et al. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery, *J. Biomol. Screen.* **2001**, 6(6), 429–40. doi: [10.1177/108705710100600609](https://doi.org/10.1177/108705710100600609)
12. Ericsson, U. B. et al. Thermofluor-Based High-Throughput Stability Optimization of Proteins for Structural Studies, *Anal. Biochem.* **2006**, 357(2), 289–98. doi: [10.1016/j.ab.2006.07.027](https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.07.027)
13. Martin, J.; Bardwell, J.; Kuriyan, J. Crystal Structure of the DsbA Protein Required for Disulphide Bond Formation In Vivo, *Nature* **1993**, 365, 464–468. doi: [10.1038/365464a0](https://doi.org/10.1038/365464a0)
14. Christensen, S. et al. Structural and Biochemical Characterization of *Chlamydia trachomatis* DsbA Reveals a Cysteine-Rich and Weakly Oxidising Oxidoreductase, *PLoS One* **2016**, 28, 11 (12):e0168485. doi: [10.1371/journal.pone.0168485](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168485)
15. Heras, B. et al. Staphylococcus aureus DsbA Does Not Have a Destabilizing Disulfide, a New Paradigm for Bacterial Oxidative Folding. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283(7), 4261–71. doi: [10.1074/jbc.M707838200](https://doi.org/10.1074/jbc.M707838200)