

使用紫外-可见光谱表征蛋白质 热稳定性

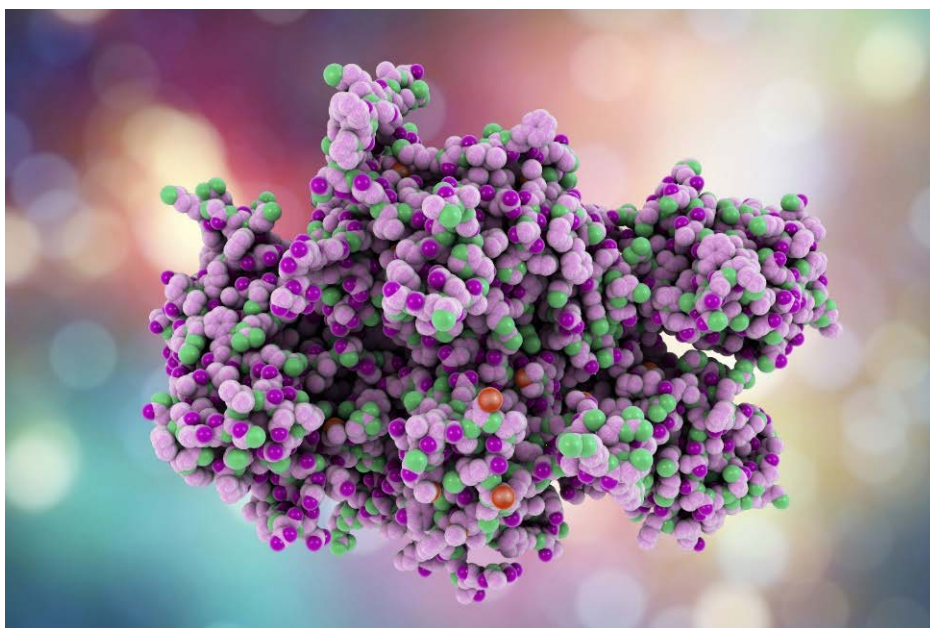
帕尔帖温控多池配置的 Agilent Cary 3500
紫外-可见分光光度计在蛋白质治疗药物
研究中的优势

作者

Carlos Santos Martin
乐卓博分子科学研究所 (LIMS),
乐卓博大学, 澳大利亚维多利
亚州墨尔本, 3086

Biswaranjan Mohanty
悉尼分析科学核心研究机构,
悉尼大学, 澳大利亚新南威尔
士州悉尼, 2006

Wesam Alwan 和
Mathieu Rault
安捷伦科技有限公司



摘要

蛋白质的热稳定性是生物治疗药物表征的重要组成部分，因为这些数据有助于深入了解影响蛋白质稳定性和结构的物理和化学特性。本研究证明，使用配备帕尔帖温控多池模块的 Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计能够快速、轻松表征蛋白质的热稳定性和熔解温度。

前言

药物发现是一个多方面的过程，需要证明潜在的新药及其治疗效果。药物靶标的正确鉴定和表征是药物发现过程中的重要步骤，可以促进先导治疗性化合物的鉴定^[1]。对于蛋白质治疗药物，生化表征包括分子量、同质性和异质性、溶解度、热稳定性、氨基酸序列组成、二级结构、三维结构和蛋白质修饰^[2, 3]。

热稳定性数据有助于深入了解影响蛋白质稳定性和结构的物理和化学特性。溶解温度可通过多种技术监测样品特性随温度逐渐升高所发生的变化来确定（表 1）。在高温条件下，蛋白质的二级和三级结构发生变化。这些结构变化暴露了疏水性核心并导致蛋白质聚集^[4]。一半蛋白质仍处于可溶形式的温度称为表观溶解温度（ T_m ），如图 1 所示。结合配体的存在可以提高该温度^[5, 6]。热稳定性研究有助于了解配体结合、药物稳定性、保质期和最佳储存条件，这些是对未来的药物生产和商业化有用的信息。

使用紫外-可见光谱分析蛋白质的热稳定性

表 1 总结了用于测量蛋白质热稳定性的各种技术的优缺点。紫外-可见光谱克服了该分析的许多挑战。紫外-可见光谱无需荧光标记即可提供直接吸光度测量，可以使用少量样品进行测量，结果可快速得到且易于解读和报告。

本应用简报展示了 Cary 3500 紫外-可见分光光度计（图 2）在表征蛋白质的热稳定性和重现性方面的优势。Cary 3500 紫外-可见分光光度计使用集成式比色皿内温度探头，为控温模块提供反馈，从而在测量期间控制溶液的温度。仪器内置一个八位多池支架，使用无水风冷帕尔帖装置将样品温度控制在 0–110 °C 之间。多池模块的各比色皿位置可同时测量，提高了实验通量，与其他技术相比，提供了更快的分析速度。

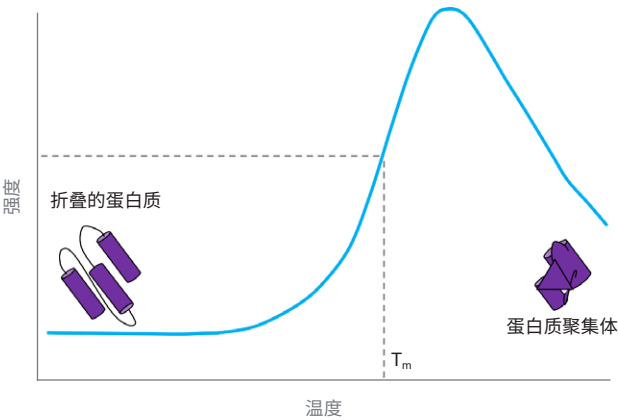


图 1. 蛋白质强度（或吸光度）随温度升高的典型响应

表 1. 用于测量蛋白质热稳定性的技术

技术	原理	优点	缺点
圆二色性光谱 ^[7, 8]	使用圆偏振光根据椭圆率测量吸光度。	– 所需的材料量少 – 灵敏度高 – 分辨率高	– 耗时 – 一些缓冲液会干扰远紫外光谱
差示扫描量热法 ^[9, 10]	测量热容相对于标准物质的变化。	– 所需的材料量少 – 分辨率高	– 结果解析可能很困难
热漂移测定 ^[11, 12]	测量荧光染料与疏水性分子结合后的荧光变化。	– 可以在 RT-PCR 仪器上运行多个样品 – 灵敏度高 – 所需的材料量少	– 需要荧光探针 – 荧光探针会导致构象变化 – 蛋白质应具有口袋结构以容纳荧光探针



图 2. Agilent Cary 3500 紫外-可见多池分光光度计可用于在八个比色皿位置同时执行最多四个温控实验



图 3. 本研究所用的安捷伦超微量比色皿。Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计的极小的聚焦光束可透过永久光学准直的小孔，无需调整

实验部分

样品

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 二硫键异构酶 A (EcDsbA, 天然状态) 样品由澳大利亚乐卓博大学乐卓博分子科学研究所 (LIMS) 提供。使用含 50 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA 和 100 mmol/L 磷酸钠的缓冲溶液配制约 0.6 mg/mL 的 EcDsbA 溶液，调节至 pH 7.0。使用安捷伦超微量（容积 50 μ L，光程 10 mm）石英比色皿（部件号 5062-2496，图 3）。使用纯磷酸盐缓冲液作为参比（空白）溶液。

仪器和方法

使用 Agilent Cary UV Workstation 软件控制 Cary 3500 紫外-可见多池帕尔帖分光光度计。用于测量蛋白质吸光度和热稳定性的方法参数分别见表 2 和表 3。对于热稳定性分析研究，使用 0.1 $^{\circ}$ C/min 的升温速率每 0.1 $^{\circ}$ C 采集一次数据。在记录每个

表 2. 波长范围扫描参数

参数	值
仪器	Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计
波长范围	200–400 nm
信号平均时间	0.1 s
光谱带宽	2 nm
样品量	80 μ L，增加额外的体积以适应蒸发

表 3. 热熔实验参数

参数	值
仪器	Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计
波长	280 nm
信号平均时间	2 s
光谱带宽	2 nm
数据间隔	0.1 $^{\circ}$ C
升温速率	0.1 $^{\circ}$ C/min
温度控制	控温模块
温度范围	25–90 $^{\circ}$ C
平滑和导数过滤因子	25
平滑和导数数据间隔	0.1 $^{\circ}$ C
分析起始温度	30 $^{\circ}$ C
分析终止温度	90 $^{\circ}$ C
比色皿	超微量石英比色皿
样品量	70 μ L

数据点之前，将信号平均 2 秒。由于样品在较高的升温速率下容易聚集，因此使用 0.1 °C/min 的升温速率。通过 Cary 3500 的控温模块控制实验温度。

结果与讨论

为确定 *EcDsbA* 蛋白质的最大吸收峰，利用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计按照表 2 中列出的参数进行波长扫描。配备多池模块的 Cary 3500 能够同时测量七个样品和一份参比溶液。此功能提高了结果的可信度，因为测量结果是在相同条件下同时采集的。如果需要较小的样品量，例如 70 μ L，则可以使用超微量比色皿进行测量（图 3）。由于 Cary 3500 系统具有小的聚焦光束，因此无需任何预校准即可使用超微量比色皿进行准确测量。发现 *EcDsbA* 的最大吸收峰位于 280 nm 处，如图 4 所示。

对于 *EcDsbA* 蛋白质的热稳定性分析，随着温度的升高，监测 280 nm 处的吸光度。使用控温模块温度控制样品温度，升温速率为 0.1 °C/min，如表 3 所示。随着温度的升高，观察到一个峰，表明蛋白质结构的变化导致蛋白质的吸光度发生变化。热熔图（图 5）显示了 *EcDsbA* 蛋白质在高温（高于 65 °C）下发生的转变。

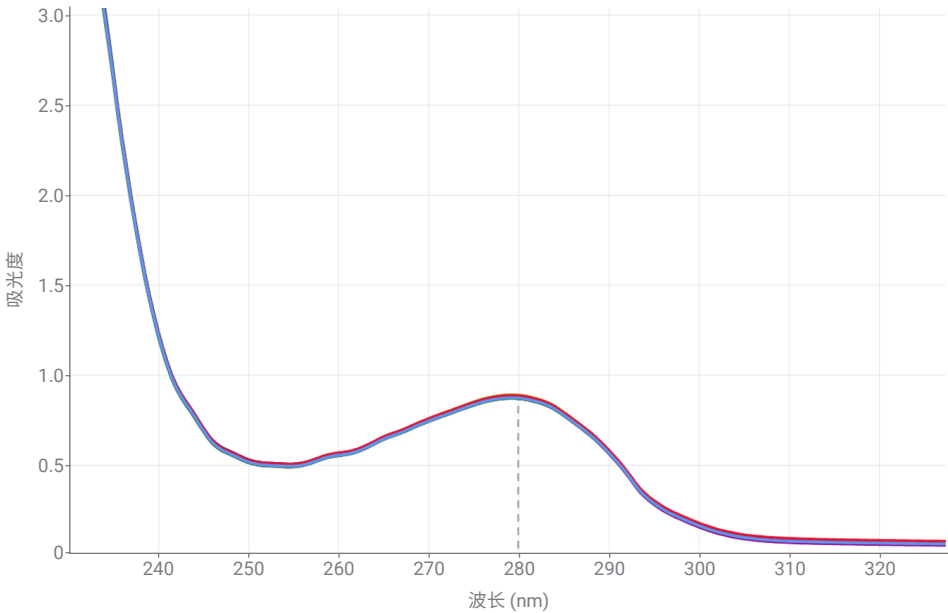


图 4. *EcDsbA* 蛋白质（天然状态）的七个单独样品的波长范围扫描，显示 *EcDsbA* 蛋白质峰在 280 nm 处。使用超微量比色皿同时测量七个样品

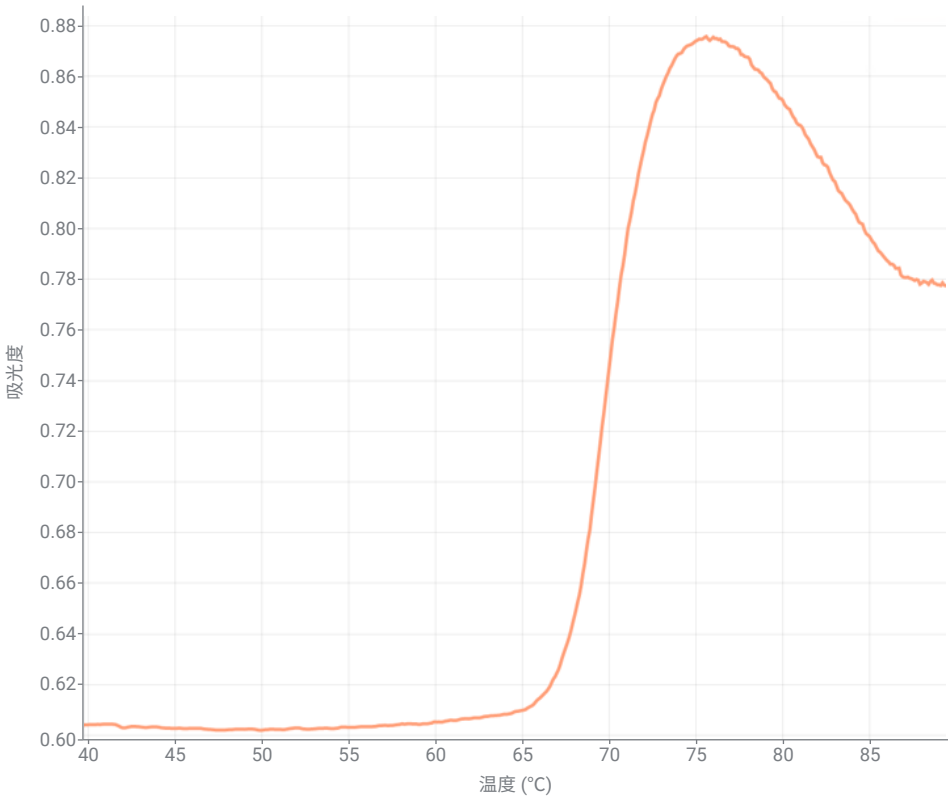


图 5. *EcDsbA* 蛋白质的热熔图。吸光度随温度升高的变化表明蛋白质的结构发生了变化

Cary UV Workstation 软件使用实测吸光度数据的一阶导数计算生物样品的 T_m 。可通过选择适当的平滑和导数过滤因子以及用于分析的起止温度来确定 T_m 。使用表 3 中列出的分析参数，发现 *EcDsbA* 的 T_m 为 69.86 °C ($n = 6$; 图 6)。

使用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计获得的 *EcDsbA* 蛋白质的计算 T_m 与先前报道的使用圆二色性光谱获得的结果一致，如表 4 所示^[14, 15]。

通过运行重现性研究，评估利用 Cary 3500 得到的 *EcDsbA* 的 T_m 测量结果的精密度。将蛋白质样品溶液分为六份，使用 70 μ L 超微量比色皿对每份样品进行单独分析。通过计算 *EcDsbA* 的 T_m 值得平均值和标准偏差来评估结果的重现性 (表 4)。Cary 3500 紫外-可见分光光度计系统表现出出色的精密度，六次测量结果的标准偏差仅为 0.16 °C。

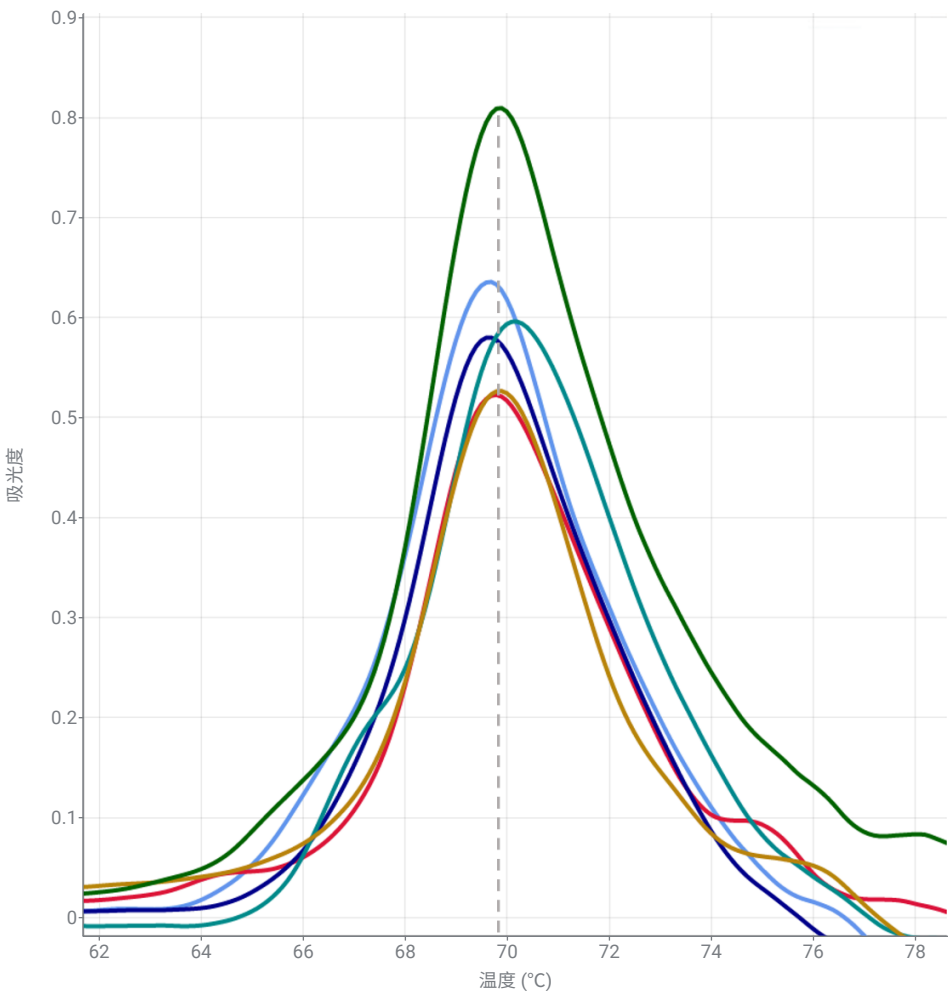


图 6. 使用 Agilent Cary UV Workstation 软件获得的六个不同 *EcDsbA* 蛋白质样品的一阶导数图 ($T_m = 69.86$ °C, $n = 6$)

表 4. 使用 Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计测得的 *EcDsbA* T_m 值以及文献中报道的值

技术	<i>EcDsbA</i> 的 T_m (°C)
Cary 3500 紫外-可见分光光度计重复样 1	69.70
Cary 3500 紫外-可见分光光度计重复样 2	69.80
Cary 3500 紫外-可见分光光度计重复样 3	69.70
Cary 3500 紫外-可见分光光度计重复样 4	70.20
Cary 3500 紫外-可见分光光度计重复样 5	69.90
Cary 3500 紫外-可见分光光度计重复样 6	69.90
平均值	69.86
标准偏差	0.16
文献值 1 ^[14]	68.55
文献值 2 ^[15]	69.25

结论

利用配备帕尔帖温控多池的 Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计同时测定六个 *EcDsbA* 蛋白质样品的溶解温度 (T_m)。结果可重现, 表现为六个 *EcDsbA* 蛋白质重复样品的标准偏差达到 0.16 °C。此外, 使用 Agilent Cary UV Workstation 软件计算的平均 T_m 为 69.86 °C, 与使用圆二色性光谱获得的文献值一致。结果证明了 Cary 3500 紫外-可见分光光度计在蛋白质热稳定性分析中的准确度、精密度和速度。

为进一步提高该方法的分析效率, Cary 3500 紫外-可见分光光度计可同时测量七个样品, 而不会影响结果的准确度。通过仪器设计同时测量至少三个重复样品的能力为需要重复测量的实验室节省了宝贵的时间。

Cary UV Workstation 软件内置有平滑和导数计算功能, 便于进行数据分析。此外, 该软件还提供可选的技术控制手段, 以安全地采集、处理、报告和存储数据。这些控制手段对于必须遵守 FDA 21 CFR Part 11、欧盟附录 11、GAMP5 以及 ISO/IEC 17025 和 EPA 40 CFR Part 160 合规性指南的实验室至关重要。

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE83250769

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2022

2022 年 8 月 4 日, 中国出版

5994-5086ZHCHN

参考文献

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)