

优化热稳定性测量以鉴定寡核苷酸 APIs

使用 Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计实现快速、准确的热解链 (T_m) 测量



作者

Sarina Schuler, Gerd Berger 和
Alexandra Heussner 博士
Vetter Pharma-Fertigung,
德国拉芬斯堡
Wesam Alwan 博士和
Mathieu Rault 博士
安捷伦科技有限公司

前言

为确保药品安全，所有药品起始材料在进入药品生产流程之前，必须经过分析鉴定 (ID)，以作为放行流程的一部分。该法规要求也适用于药品的活性药物成分 (API)。要确认这些原辅料的身份，需要简单、能够快速执行且具有高特异性的分析方法。寡核苷酸是一类相对较新的 APIs，给 ID 检测带来了巨大的挑战。一些常用的成熟方法，例如色谱法或电泳法是分子量确认的理想选择；对于序列确认，需要一种可以区分碱基对变化的技术^[1]。此外，这些方法对短链寡核苷酸的选择性较差，因为无论寡核苷酸序列如何，长度相同的相似寡核苷酸可能会产生相似的 HPLC 色谱图和保留时间。



图 1. Agilent Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计

然而，解链温度 (T_m) 具有高度的寡核苷酸序列特异性，将 T_m 测定与完整质量测量相结合，可实现 ID 确认^[1,2]。因此，Vetter 使用配备多区控温软件插件的 **Agilent Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计**，通过基于紫外 (UV) 的光谱测定流程，可靠、准确地测定了寡核苷酸的解链温度 (图 1)。

寡核苷酸解链温度

双链核酸（包括寡核苷酸双链体）通过互补碱基之间的分子间非共价氢键（H-键）以及核苷酸碱基中芳香环的堆积实现热力学稳定。对寡核苷酸双链样品进行热变性处理（即加热），可以打破其氢键和碱基堆积作用，实现链分离（图 2）。50% 的双链解离成单链寡核苷酸时的温度即为寡核苷酸的解链温度，这也是衡量其稳定性的一个指标^[3]。

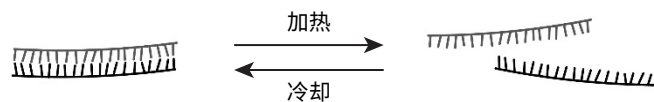


图 2. 寡核苷酸热解链示意图。寡核苷酸双链在温度控制下可逆地结合和解离成互补单链的过程称为“解链”

尽管寡核苷酸的长度和整体碱基组成（比例）会影响 T_m ，但序列内具体的核苷酸顺序也会影响 T_m 。此外，寡核苷酸的化学性质和修饰、环境中的盐浓度以及链浓度也会影响解链温度^[3]。

由于溶液中单链寡核苷酸在 260 nm (A_{260}) 处的吸光度高于双链寡核苷酸的吸光度，因此可使用紫外光谱监测解链过程并确定 T_m 。通过在寡核苷酸样品热变性过程中持续测量其吸光度，可以绘制解链曲线（图 3）。在该曲线中，拐点对应于寡核苷酸的具体解链温度。通过计算解链曲线的一阶导数并找出最大值，即可轻松确定 T_m ^[3]。

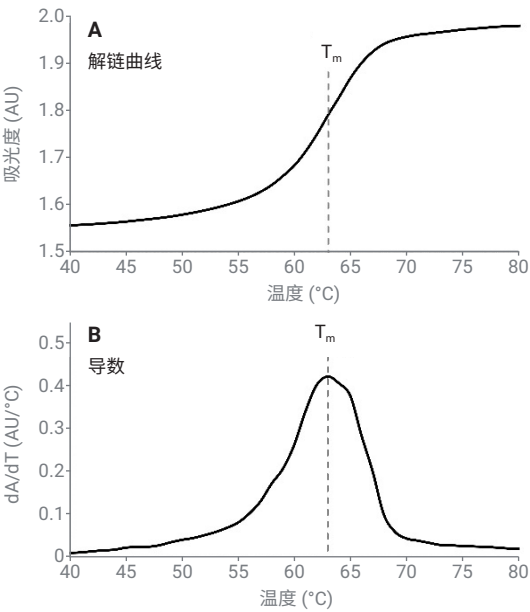


图 3. 解链曲线与导数。将 260 nm 处的吸光度与不断升高的样品温度 (A) 作图，可获得典型的寡核苷酸解链曲线。解链曲线的一阶导数最大值对应于 T_m (B)

使用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计测定 T_m

样品前处理

为了使用配备多区控温软件插件的 Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计测定 T_m ，按照表 1 制备寡核苷酸样品，并使用 Agilent Cary UV Workstation 软件中设置的热分析方法进行测量。充分涡旋样品溶液并在 2–8 °C 下孵育约 20 分钟，然后进行 T_m 测量。在方法开发实验中使用随机选择的未经修饰的 20-mer 寡核苷酸及其互补链（表 2）。这些高纯度无盐 (HPSF) 寡核苷酸序列由 Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) 合成，并复溶于 1x Tris-EDTA (TE) 缓冲液 (pH 8.0, Fisher Bioreagents, 货号 BP2473) 中，得到 100 μ M 寡核苷酸储备溶液。

表 1. 用于 T_m 测量的样品的成分

组分	最终浓度
寡核苷酸 (100 μ M)	4 μ M
互补寡核苷酸 (100 μ M)	4 μ M
10x Tris-EDTA (TE) 缓冲液 (pH 7.4) (Fisher Bioreagents, 货号 BP2477)	1x
2 M NaCl (用 NaCl 制备) (Sigma-Aldrich, 货号 S3014)	0.1 M
无核酸酶水 (Invitrogen, 货号 AM9937)	不适用

表 2. 本研究使用的寡核苷酸序列

描述	序列 (5' $\rightarrow$ 3')
寡核苷酸	CCA CGA CAG TAA CAT TCT CA
互补寡核苷酸	TGA GAA TGT TAC TGT CGT GG

方法开发与优化

在所有 T_m 测定实验中，均使用 TE 缓冲液对配备多区控温软件插件的 Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计的参比光路和所用的样品光路进行基线校正。然后根据参比光路中的 TE 缓冲液测定寡核苷酸样品。为了确定测定 T_m 的最佳仪器设置和实验装置，在方法开发过程中改变了几个可调的仪器参数（表 3）。总共使用并比较了九种方法，以评估理想的参数设置（表 3）。检测结束后，Cary UV Workstation 软件使用平滑和导数过滤值（平滑/导数过滤值：31，平滑/导数间隔：0.1）计算一阶导数和 T_m 。

为了提供更多有关优化 T_m 测量实验条件的信息，我们制定了一份良好操作规范指南。

使用方法 1-9 获得的平均解链温度相当（图 4），结果介于 60.7 °C（方法 8）和 62.9 °C（方法 6）之间。

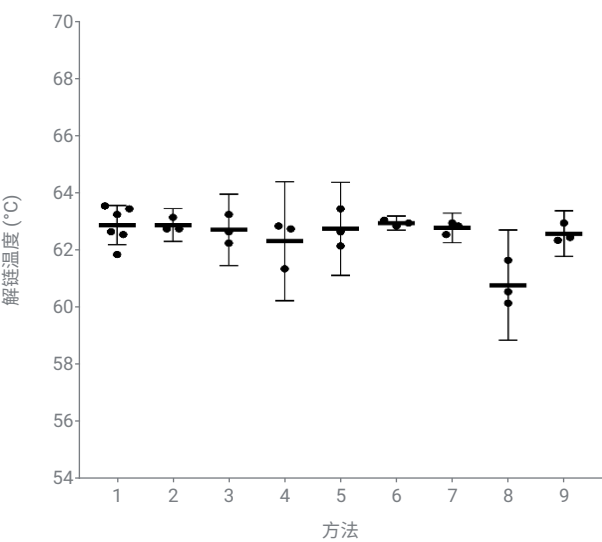


图 4. 使用方法 1-9 测得的 T_m 数据。使用含有 4 μ M 寡核苷酸、4 μ M 互补寡核苷酸和 0.1 M NaCl 的 TE 缓冲液进行 T_m 测定。图中显示了平均 T_m （中心；方法 1 中 $n = 6$ ，方法 2-9 中 $n = 3$ ），重复测量获得的各个 T_m （点）和 95% 置信区间（线）

表 3. 方法开发过程中使用的方法

参数 [设置范围]	方法								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
升温速率 (°C/min) [0.1–40.0]	10	10	10	10	10	20	1	10	10
数据间隔 (°C) [0.1–10.0]	0.5	0.5	0.1	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
信号平均时间 (s) [0.004–1000.000]	1.0	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
光谱带宽 (nm) [0.10–5.00]	2	2	2	2	5	2	2	2	2
比色皿类型 [半微量/微量/大体积]*	半微量	半微量	半微量	半微量	半微量	半微量	半微量	微量	大体积
比色皿内搅拌 (rpm) [关闭/400–1400 rpm]	关闭	关闭	关闭	关闭	关闭	关闭	关闭	关闭	500
温度探头 [是/否]	是	是	是	是	是	是	是	是	是
起始温度 (°C) [–5.0 至 110.0]	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
结束温度 (°C) [–5.0 至 110.0]	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0
阶段数 [1–10]	1	1	1	1	1	1	1	1	1

* 样品用量：0.8 mL（半微量）、0.4 mL（微量）和 2.0 mL（大体积）

方法评估

作为制药环境中 ID 检测的一部分，可靠的 T_m 测定方法必须具备很高的测量精度。测量精度通过计算置信区间 (CI) 来定量。CI 越小，测量精度越高。此外，在选择合适的 ID 检测方法时，还应考虑单次测量所需的时间以及整体操作的便利性。

升温速率

在方法 6 和 7 中，将不同的升温速率与 10 °C/min 的升温速率（方法 1–5 和 8–9）进行了比较，后者需要大约 10 分钟的测量时间。采用 20 °C/min 的较快升温速率（方法 6）时，运行时间约为 8 分钟。考虑到升温速率是常规设置的两倍，时间上的差异似乎微不足道。然而，如果测量时间非常关键，则可以使用方法 6。使用方法 7（升温速率 = 1 °C/min）测定 T_m 需要大约一个小时，并且没有任何分析上的优势。这表明 Cary 3500 UV-Vis 具有出色的准确度。使用更快的升温速率可缩短 T_m 实验时间，并且不会影响数据质量。

数据间隔

采用方法 3 和 4 评估数据间隔的影响。比较 1.0 °C（方法 4）和 0.1 °C（方法 3）数据间隔，结果表明，方法 3 的 T_m 测量结果 CI 较小，即精度更高。然而，对于 0.1 °C 的数据间隔而言，10 °C/min 的升温速率过快。因此我们排除了这两种方法，并在所有其他方法中采用了数据间隔的平均值 (0.5 °C)。

信号平均时间

与使用 1.0 秒的信号平均时间 (SAT) 相比，在方法 2 中将 SAT 缩短至 0.1 秒并没有带来任何优势。SAT 决定了移动到下一个数据点之前的信号平均时间。一般来说，较长的 SAT 可降低背景噪音，平滑信号，从而提高信噪比 (SNR)。Cary 3500 紫外-可见分光光度计噪音低，使用较短的 SAT 即可获得高质量的数据。

光谱带宽

通过调整光谱带宽 (SBW) 可以控制光通量，从而改变 SNR 和光谱分辨率。在 SBW 较大的情况下，会有更多的光穿过样品，从而提高 SNR。在方法 5 中，将 SBW 从 2 nm 增加到 5 nm 对测量结果或 T_m 计算没有明显影响。由于 5 nm 为该参数的上限，因此优先选择中间值 2 nm。

比色皿类型和比色皿内搅拌 (rpm)

从实际角度来看，方法 8 比较方便，因为使用微量比色皿时所需的样品量极少（最小样品量为 0.4 mL）。然而，在最佳实践指南中，微量比色皿是与加热块温度控制结合使用的，而不是温度探头，因为温度探头的设计不适用于微量比色皿。如果样品量较少，可使用微量比色皿以及缓慢的升温速率（例如 < 0.5 °C），并使用加热块温度控制而不是探头温度控制。

尽管方法 9 的 CI 值可以接受，但仍排除了该方法，因为大体积比色皿所需的样品量（最小样品量为 2.0 mL）远远大于半微量比色皿（最小样品量为 0.8 mL）。如果样品量不是关键考虑因素，则建议使用更大的样品量，因为在大体积比色皿内进行搅拌，可以确保样品溶液的温度分布均匀。

温度探头

在所有测量中，都观察到样品温度与加热块温度之间存在偏移（图 5）。本质上，任何样品加热系统都会存在时间延迟。这种延迟是由于热量需要从加热块通过比色皿的石英玻璃传递到样品溶液，这正是观察到温度差异的原因。因此，使用比色皿内温度探头对于实现准确的 T_m 测量至关重要，尤其是在设置了中等或高升温速率时（通常升温速率 $\geq 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）。

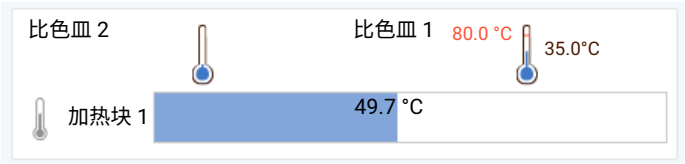


图 5. T_m 测量过程中 Agilent Cary UV Workstation 软件提供的温度信息示例。该软件提供了有关系统温度控制的详细信息，包括对帕尔帖控温模块和样品温度的监测。截图所示为使用配备多区控温软件插件的 Agilent Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计和方法 1 时，加热块 (49.7 °C)、样品溶液 (35.0 °C) 的实际温度以及设定温度 (80.0 °C)

通过排除法，我们认为方法 1 和方法 9 是可靠测定寡核苷酸样品 T_m 的最合适和最有利的方法。总体而言，这两种方法表现出了良好的整体精度，并且所设定的升温速率可实现快速测量。方法 1 的另一个优势在于，因采用半微量比色皿，所需的样品量少。图 6 显示了使用方法 1 获得的解链曲线示例以及相应的平滑处理后的导数。

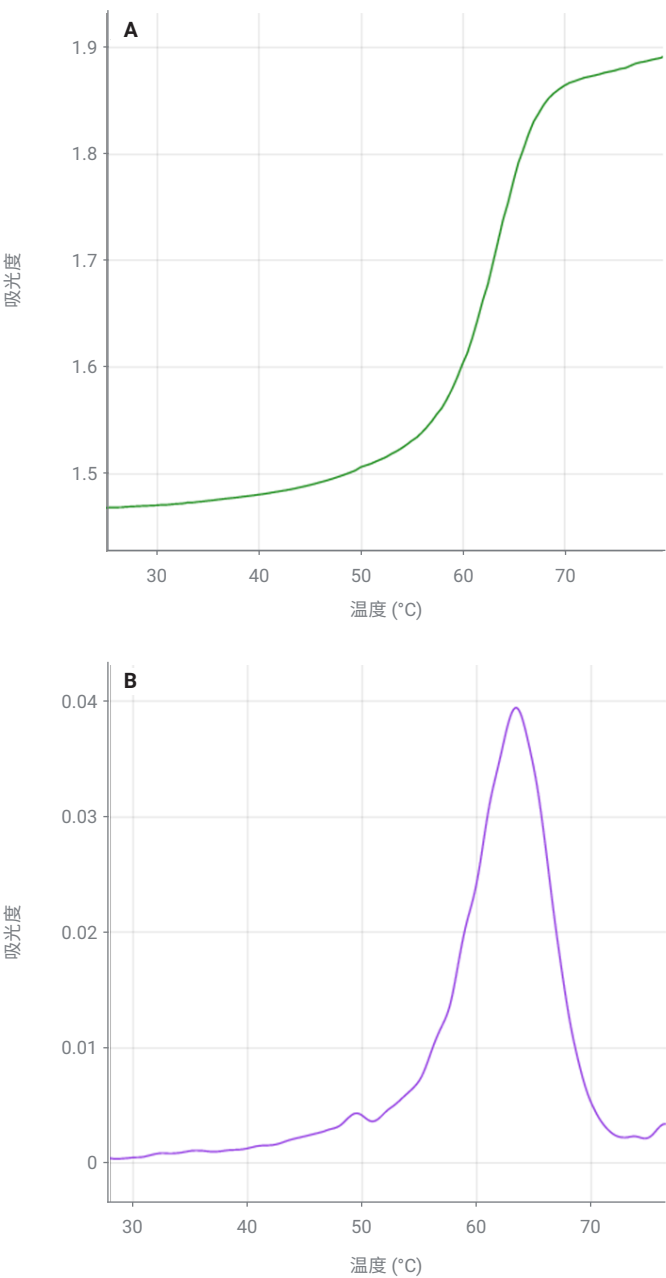


图 6. (A) 方法 1 的解链曲线示例。(B) 平滑后的一阶导数图

T_m 测定中的平滑处理

Cary UV Workstation 软件可以对解链曲线应用平滑和导数功能，以减少干扰和噪音。平滑功能可减少原始数据中可能存在的噪音。Cary UV-Vis Workstation 平滑算法采用 Savitzky-Golay 技术^[5]。导数计算也采用 Savitzky-Golay 技术。

在计算 T_m 之前，可以手动设置平滑和导数的过滤值和间隔大小。过滤值大小定义了用于生成每个输出点的数据点数量。过滤值越大，输出数量越少。Savitzky-Golay 技术需要均匀的间隔。在执行平滑和导数计算之前，数据将被设置为指定的间隔。通常情况下，输入的间隔应与数据采集间隔相匹配。这两种计算可以单独使用，也可以依次使用，即先进行平滑计算，然后进行导数计算^[4]。

图 7 为方法 5 的一阶导数示例。即使解链曲线的原始数据显示出较低的噪音水平（解链曲线未显示），如果平滑和导数步骤未经优化，一阶导数图也会显示出较高的噪音。例如，图 7A 为来自方法 5 的未进行平滑和导数参数未优化的一阶导数图（导数间隔 0.5 °C，过滤值 5）。T_m 为 62.5 °C。图 7B 为对相同数据应用参数经过优化（平滑和导数间隔 0.1 °C，过滤值 31）的平滑和导数函数获得的一阶导数图。T_m 值相当（62.6 °C），但图中的噪音较少。

未优化的平滑和导数数据处理可能会导致曲线噪音较高以及伪影，如图 7 所示。使用的过滤值过大，最终会导致曲线图平滑过度以及输出减少。使用 Cary UV Workstation 软件可以快速、轻松地优化平滑和导数参数。优化参数后，可将其保存作为方法的一部分，并在测量结束时自动应用。

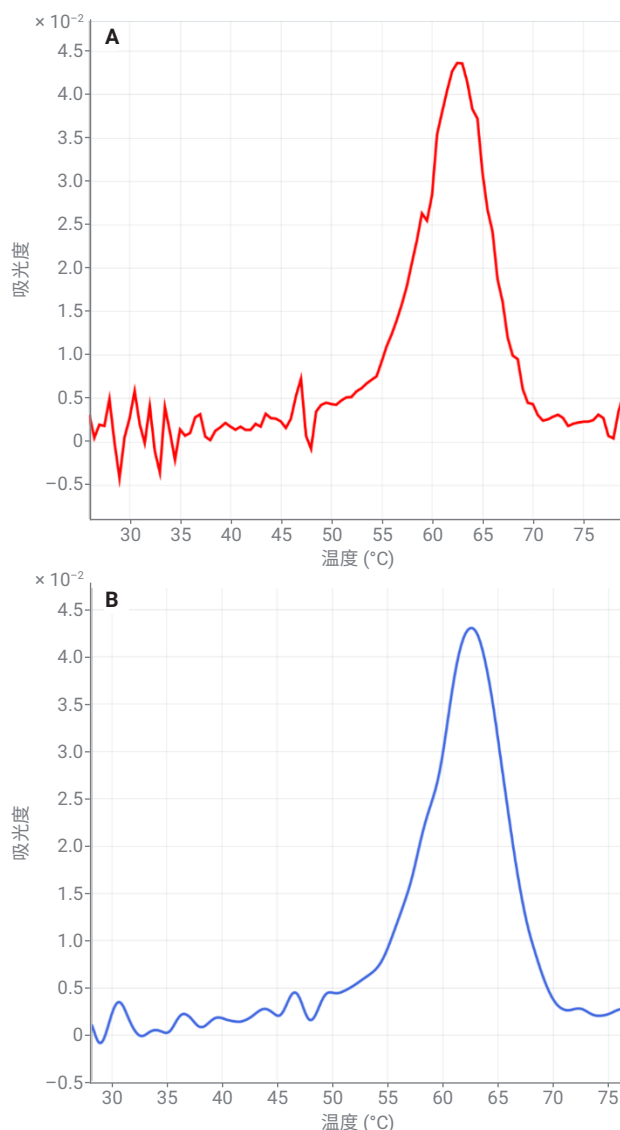


图 7. (A) 方法 5：未平滑的一阶导数图和未经优化的导数参数（导数间隔为 0.5 °C，过滤值 5）。(B) 使用经优化的平滑和导数参数获得的一阶导数图（平滑和导数间隔 0.1 °C，过滤值 31）

结论

在对仪器参数进行全面评估后，Vetter 使用配备多区控温软件插件的 Agilent Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计，通过可靠、准确的基于 UV 的光谱测定方法，简单、快速地测定了寡核苷酸的解链温度。Agilent Cary UV Workstation 软件内置平滑和导数功能，能够优化解链曲线分析，改善寡核苷酸解链温度的评估。

参考文献

1. Capaldi, D.; et al. Strategies for Identity Testing of Therapeutic Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products. *Nucleic Acid Therapeutics* **2020**, 30(5), 249–264. Doi: 10.1089/nat.2020.0878
2. Evaluating an Innovative Analytical ID Testing Strategy for Oligonucleotides (评估寡核苷酸的创新鉴定检测策略)，安捷伦科技公司/Vetter 案例研究，**2022**
3. Bonilla, J. V.; Srivatsa, S. Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products; CRC Press, Taylor & Francis Group: October 19, **2016**, ISBN 9781138198456
4. 使用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计进行核酸热稳定性测量的最佳操作规程，安捷伦科技公司白皮书，出版号 5994-4028ZHCN，**2022**
5. Savitzky, A.; Golay, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal.Chem.* **1964**, 36(8), 1627–1639. Doi: 10.1021/ac60214a047

更多信息

- Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计
- Cary UV Workstation 软件
- GMP 设施的数据可靠性选项 — 用于 Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计系列
- 紫外-可见光谱法与分光光度计常见问题解答

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

DE09081872

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，2023，2024
2024 年 8 月 28 日，中国出版
5994-5145ZHCN