

Uncle——火热的蛋白等温应用程序

简介

以高通量的方式在尽可能早的时候通过等温稳定性筛选候选分子是评估蛋白质能否通过长期稳定性试验的最快方式。解折叠温度和聚集温度是对蛋白制剂进行评级的关键，同时也是观察样品在恒温下耐受数小时或数天的关键。为了从小体积以及低浓度样品中获取全部信息，您需要一套针对生物制剂不同应用程序的多用途工具。

Uncle拥有3种检测技术：全光谱荧光、静态光散射 (SLS) 和动态光散射 (DLS) 无缝分析蛋白质稳定性(图1)。温度控制 (15°C–95°C) 为您的实验设计带来了更大的灵活性——在升温过程中加热样品，或者在等温试验中保持样品恒温。将样品密封在9 μ L的石英毛细管内以最大限度减少蒸发，而且单次实验可筛选最多48个样品。



图1：Uncle是首款多合一生物制品稳定性分析平台

在全光谱荧光检测 (250 nm–720 nm) 下可以仔细观察蛋白质内源荧光和染料如 SYPRO™ Orange 荧光信号，从而评估蛋白质解折叠情况。与此同时，SLS可跟踪大聚集体和小聚集体的形成情况，而DLS则可进行粒径大小和粒径分布检测。这3种方法全部

整合在升温程序 T_m & T_{agg} 应用中，可在2小时内测试蛋白质分析物的稳定性。根据升温程序的结果来设置等温实验是一种灵活的加速稳定性测试方式，而且还能补充蛋白质的稳定性信息。

如果您希望设置更长时间的实验，同时又想解放Uncle用于其他实验，您可以将样品放置在恒温箱中孵育，在特定的时间将样品放入Uncle中，通过开箱即用的稳定性应用程序来获取相关数据。无论是一小时、一天还是一周，Uncle都能根据您的需要灵活地完成任何蛋白质的分析并指出哪些蛋白质最佳。

在本应用手册中，我们阐述了如何使用Uncle的 T_m & T_{agg} ，SYPRO染料检测 T_m ，等温以及开箱即用应用程序评价3种不同制剂中单克隆抗体和RNase A的热稳定性。

方 法

将单克隆抗体1 (mAb 1) 的储备液从26 mg/mL稀释至1 mg/mL，缓冲体系为pH 7.4，25 mM His-HCl缓冲液，含0 mM、50 mM或250 mM的NaCl。

用水将核糖核酸酶 (RNase) A (Sigma-Aldrich) 冻干粉重构成10 mg/mL的溶液，分成若干等份在 -20°C 下冻存。在室温下解冻各等分溶液并按照原先所列的制剂稀释至1 mg/mL。稀释后的RNase A用0.22 μm 过滤器过滤。

将9 μL 的各份样品以一式两份或一式三份的方式加入到Uni管中（16个9 μL 石英毛细管组成的阵列，用硅胶条密封）用以进行下列实验。重复进行每一项Uncle实验并展示代表性数据。

通过内源性荧光检测

T_m & T_{agg} 使用Uncle的 T_m & T_{agg} 应用进行蛋白质解折叠和聚集实验。样品在Uncle中从 15°C 升至 95°C ，升温速率 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，并在266 nm处进行激发，同时检测荧光发射和SLS。Uncle 分析软件根据300–430 nm波长下荧光光谱的变性曲线以质心波长 (BCM) 为模型确定 T_m ，同时根据266 nm波长下的散射光强度来确定 T_{agg} (图2)。

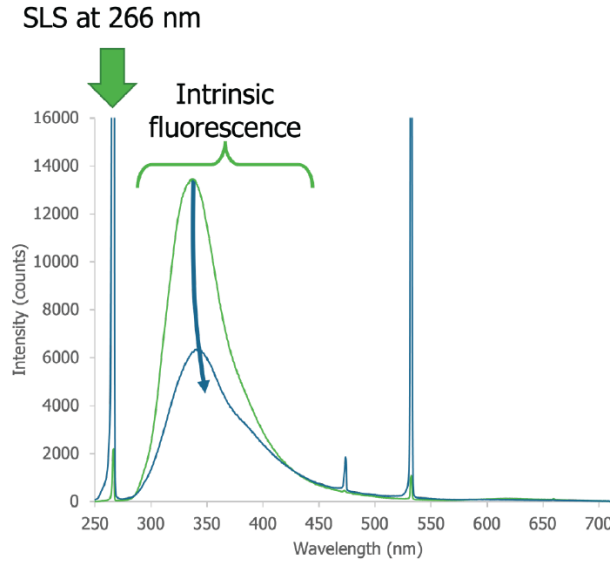


图2: Uncle利用266 nm激光激发蛋白质内源性荧光并测量SLS。随着蛋白质的解折叠, 蛋白质的内源性荧光信号通常会降低, 光谱会发生红移。这种转变通过监测光谱质量中心或BCM来加以跟踪。随着蛋白质的聚集, SLS信号强度会不断增加。

使用SYPRO检测 T_m

评估蛋白质解折叠的第二种方法是使用Uncle的SYPRO应用来检测 T_m 。用水将5000x SYPRO Orange (ThermoFisher) 稀释至100x, 然后加入到蛋白质溶液中至10x的最终浓度。样品在Uncle中从15°C升至95°C升温速率1°C/min, 并在473 nm的波长下进行激发, 同时监测荧光发射和SLS信号。Uncle分析软件根据510–680 nm波长下的荧光强度曲线下面积来确定 T_m , 同时根据473 nm波长下的散射光强度来确定 T_{agg} (图3)。

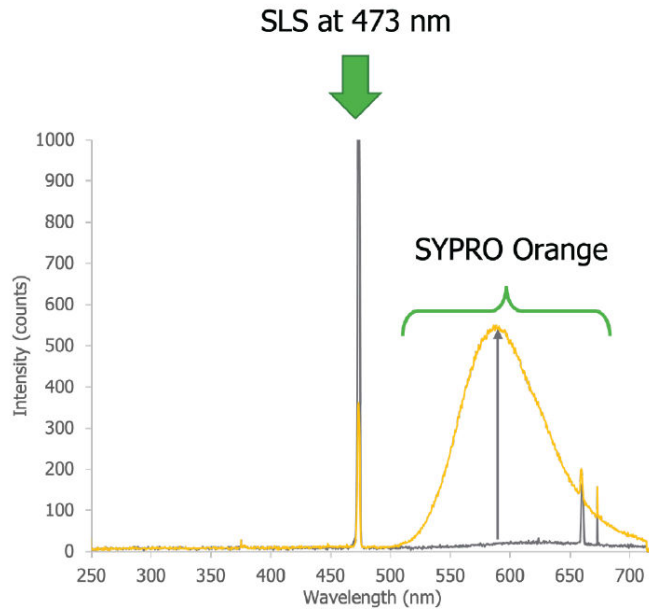


图 3: Uncle 利用 473 nm 激光激发 SYPRO Orange 的荧光并检测 SLS。随着蛋白质的解折叠，蛋白质的疏水区与 SYPRO Orange 染料形成相互作用，使得荧光强度增加。

等温实验

使用Uncle的等温应用程序，在mAb 1和RNase A的 T_m 以下于60°C的温度中将样品孵育16小时，并且在266和473 nm的波长下进行激发，同时每分钟监测一次荧光发射和SLS。

开箱即用实验

使用Uncle开箱即用的稳定性应用程序进行长期稳定性研究。将样品加入Uni管中并放入恒温箱内60°C孵育。通过DLS检测平均粒径（采集4次，每次5秒），每天一次，持续3天。

结果

T_m & T_{agg} ，使用SYPRO检测 T_m 和mAb 1的等温稳定性

mAb制剂的热稳定性可基于蛋白质解折叠或聚集情况进行评级。通过监测蛋白质的荧光发射全光谱和散射光信号，Uncle可以同时直接追踪这两种表现。在0或50mM NaCl制剂中的mAb1其 T_m 值几乎一致，分别为70.4°C和70.2°C（图4）。在250mM NaCl的缓冲体系中，mAb1的 T_m 降至69.5°C，表明稳定性略有下降。

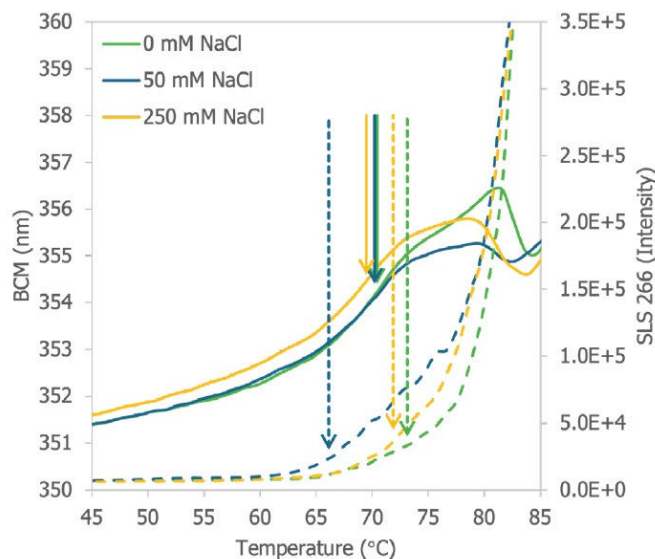


图4: mAb 1在25 mM His-HCl缓冲体系 (pH 7.4, 含0 mM (绿色)、50 mM (蓝色) 和250 mM (黄色) 的NaCl) 中进行 T_m & T_{agg} 实验时得出的BCM曲线 (实线) 和266 nm波长下的SLS曲线 (虚线)。虚线箭头表示为 T_{agg} , 实线箭头表示为 T_m 。

266 nm波长下的SLS信号表明, 在50mM NaCl体系下mAb 1的聚集起始温度是66.1°C, 但在250 mM NaCl体系下, mAb 1在71.9°C时才可以检测到类似的聚集程度, 在无盐体系下温度要达到73.1°C才可以检测到类似的聚集水平 (图4)。NaCl可以稳定蛋白质或者破坏蛋白质的稳定并诱发或抑制蛋白质聚集, 具体取决于蛋白质的浓度和状态。单独从蛋白质解折叠 (T_m) 值来看, 这种mAb1在低盐和无盐条件下的情况类似。然而, 同时检测聚集 (T_{agg}) 情况时, 我们就能更加清楚地了解蛋白质的稳定性特征, 因为在低盐和无盐条件下会出现显著差异。

我们还可以使用外源染料如SYPRO Orange在Uncle内使用差示扫描荧光法 (DSF) 来检测蛋白质稳定性: 在此实验中检测到mAb 1有2个 T_m (图5)。在250 mM NaCl缓冲体系下 T_{m1} 为64.4°C, T_{m2} 为81.0°C。在无盐条件下, T_m 会变得更高: T_{m1} 为67.5°C, T_{m2} 为82.4°C。

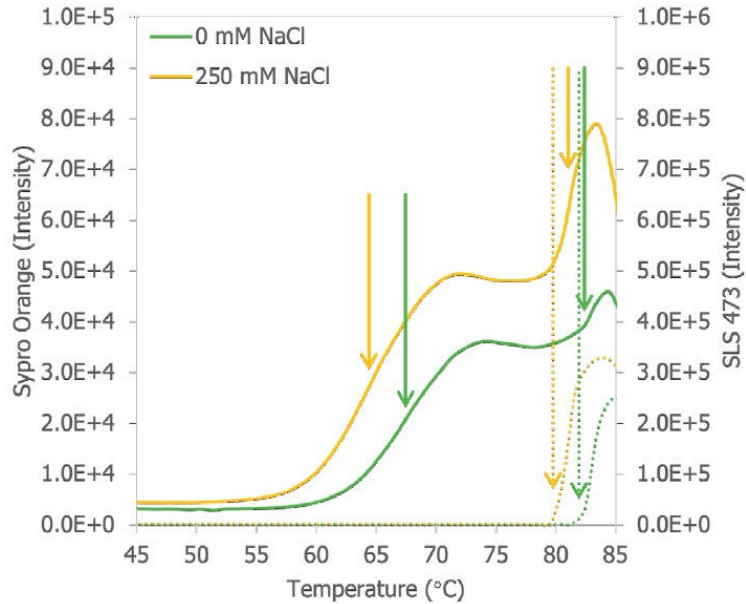


图5: 根据SYPRO检测mAb 1在25 mM His-HCl缓冲液中 T_m 得到SYPRO Orange荧光曲线 (实线) 和473 nm波长下的SLS曲线 (虚线), 其中绿色曲线为含0 mM NaCl的体系, 黄色曲线为含250 mM NaCl体系。实线箭头表示为 T_m , 虚线箭头表示为 T_{agg} 。

通过SLS来观察聚集情况时, 两种条件下的 T_{agg} 与 T_m 均接近, 表明第二个“熔解”事件源于SYPRO Orange检测到蛋白质形成大的聚集体而非蛋白质的解折叠。

涉及荧光染料的稳定性研究更难进行解读。SYPRO Orange会无差别地结合疏水区, 因此会增加其荧光发射信号。单独检测荧光信号时无法区分信号增加是源于蛋白质解折叠还是源于蛋白质聚集。通过对荧光 (T_m) 和SLS (T_{agg}) 的同时检测, Uncle可以通过染料区分出荧光发射信号增加的这两个原因。需要牢记的另一个复杂性因素在于所添加的染料极有可能通过天然状态的稳定或去稳定来改变蛋白质行为 (和 T_m)。mAb 1也是这种情况, 因为SYPRO Orange检测的 T_m 要比蛋白质荧光所确定的 T_m 低3–5°C (表1)。Uncle的可靠之处就在于可通过比较两种方法的结果来揭示这种影响。

升温实验是确定mAb稳定性的快速且强力工具, 但更长时间地将样品维持在恒定温度下可以让我们更为详细地了解蛋白质解折叠和聚集情况。

对于mAb 1, 选择60°C作为等温实验的温度, 因为该温度远低于内源性荧光、SYPRO

Orange或SLS所确定的蛋白质稳定性参数 (表1)。

NaCl	T_m by BCM	T_{agg} 266	T_{m1} by Sypro	T_{agg} 473	T_{m2} Sypro
0 mM	70.4 °C	73.1 °C	67.5 °C	81.9 °C	82.4 °C
50 mM	70.2 °C	66.1 °C	66.2 °C	80.2 °C	81.3 °C
250 mM	69.5 °C	71.9 °C	64.4 °C	79.8 °C	81.0 °C

表1: mAb 1在25 mM His-HCl缓冲液 (pH 7.4) 中的蛋白质稳定性参数汇总, 已指出各NaCl浓度 (参见图4和5)。

根据266 nm波长下的SLS可知, 在试验开始后的第一个小时内, 50 mM NaCl制剂中就形成了聚集物 (图6)。473 nm波长下的SLS信号在实验的后期开始增加, 但也只持续数小时。由于SLS的强度是波长与聚集物粒径的函数, 因此266 nm更短波长对更小的聚集物更为敏感并能捕捉到这些聚集物。473 nm的信号可指出更大的聚集物, 而且可以增加系统的动态范围。在这些制剂中, 无盐条件对聚集的延阻程度比其他两种含盐条件更大。

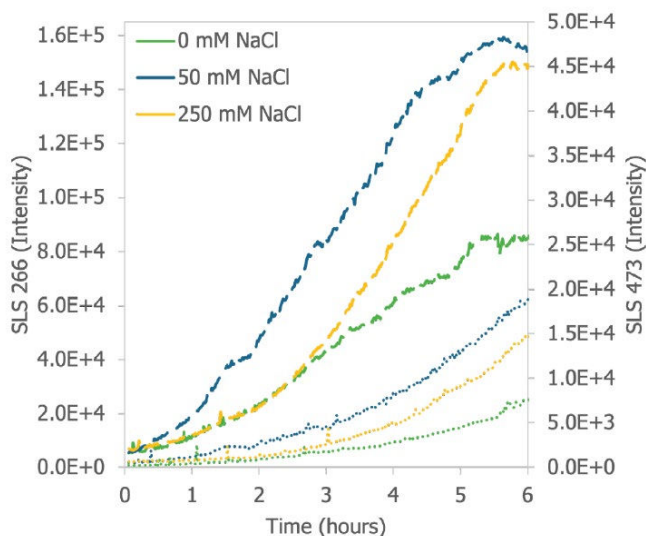


图6: mAb 1在25 mM His-HCl缓冲液 (pH 7.4, 含0 mM (绿色)、50 mM (蓝色) 和250 mM (黄色) 的NaCl) 中进行60°C等温实验得到的266 nm波长 (虚线) 下和473 nm波长 (点线) 下的SLS曲线。

基于短期稳定性筛选来对蛋白质制剂进行评级排序可以减少用于长期储存和效力研究的制剂数量, 因此大大节省了时间。根据升温 and 等温实验mAb 1的解折叠和聚集情况可知, 无

盐的25 mM His-HCl缓冲液 (pH 7.4) 在多种检测条件当中始终都是最稳定的检测条件, 而50 mM NaCl条件则是最不稳定的。升温与等温实验之间良好的关联性证实了短期实验对于这种特定分析物的预测价值。

SYPRO检测 T_m 和RNase A的等温稳定性

检测蛋白质稳定性时首选无试剂法, 因为染料和标签会影响蛋白质构象, 具体可参见以上对mAb 1的说明。但并非所有蛋白质都能进行内源性荧光检测。RNase A就是例子之一, 由于完全缺乏色氨酸, 其内源性荧光极低。对于这一类难以进行表征分析的蛋白质, 可以使用Uncle的全光谱荧光检测并联合外部染料如SYPRO Orange来满足您的稳定性表征分析需求。

使用Uncle的SYPRO应用程序检测 T_m 时, RNase A在3种制剂中都获得了单一的 T_m , 而且全部都在61°C左右 (图7A)。在升温实验中, SLS信号没有增加, 表明蛋白质在任何制剂中都没有显著聚集。将RNase A维持在60°C的温度下孵育16小时并使用SLS来检测聚集情况时, 0 mM和50 mM的NaCl溶液在大约10小时后才出现显著聚集 (图7B)。

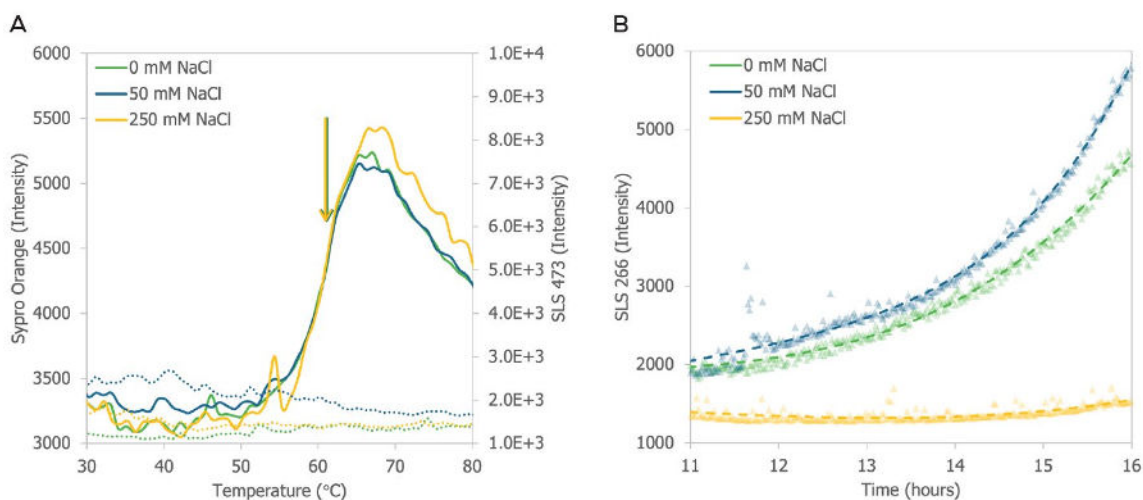


图7: T_m 实验期间的SYPRO Orange荧光强度曲线 (实线) 和473 nm波长下的SLS曲线 (虚线), 其中实线箭头指代 T_m (A)。60°C孵育16小时的等温实验, 266 nm波长下的SLS曲线 (三角符号) (B)。仅展示最后5小时的数据。

无法单独基于短期升温实验的数据对不同盐浓度条件下的RNase A进行评级排序。但更长时间的等温实验带来了更多深度观察，因此可以得出结论认定高盐条件在更长期的表现中更加稳定。

开箱即用的稳定性

大多数长期蛋白质稳定性研究依赖于复杂且耗时的方法如HPLC、SEC或质谱分析法。Uncle则有更好的方法。将含有RNase A (与之前3种含盐制剂中的RNase A相同) 的Uni管置入60°C恒温箱中孵育3天，同时通过Uncle的DLS来检测聚集物，每天检测一次。在这些应激条件下，蛋白质在高盐条件中未出现粒径的变化，而其他制剂中的蛋白质在第2天结束时出现了平均粒径的显著变化 (图8)。DLS实验也证实了在上述等温试验中观察到的RNase A的表现。

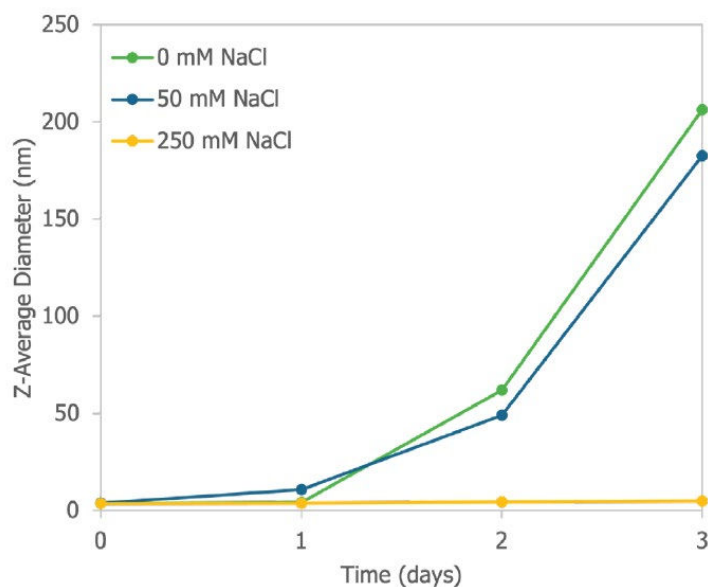


图8：通过DLS检测RNase A的Z-平均粒径的变化，绿色、蓝色和黄色曲线分别代表含0 mM、50 mM 以及250 mM NaCl pH 7.4 25 mM His-HCl缓冲液，样品在Uncle外部60°C孵育3天，每天检测一次。

不同于之前所述的mAb 1，RNase A必须通过等温实验来确定制剂条件对蛋白质稳定性的影响，因为升温实验并不能展现出3种实验条件之间的差异。

结 论

利用Uncle灵活且高通量稳定性的工具可以更快确定出可保护蛋白质免受温度影响的最佳制剂配方。通过内源性荧光或染料荧光可在2小时内确定熔解温度，因此Uncle可随时用于任何蛋白质的检测。

升温实验可反映蛋白质的聚集趋势，而Uncle的等温应用程序则可在设定温度下连续数小时或数天监测分析物，从而让温度测试变得更加完整。开箱即用的应用程序可让您在收集长期数据的同时进行更多的实验。Uncle有助于您探索出哪些蛋白质和制剂能够以最有效的方式应对温度的影响。



Unchained Labs
6870 Koll Center Parkway
Pleasanton, CA 94566
Phone: 1.925.587.9800
Toll-free: 1.800.815.6384
Email: info@unchainedlabs.com

© 2022 Unchained Labs. All rights reserved. Uncle is a trademark and Unchained Labs is a registered trademark of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev A