UNCHAINED LABS

APPLICATION NOTE

使用 Stunner 对蛋白浓度和粒径进行全面的表征

简 介

在生物开发和制造的每个阶段，蛋白质定量和分子大小与分子量的生物物理表征是了解样品发生了什么的第一步。科学家为此使用的许多工具，而占用了太多时间和大量宝贵的样品。因此，高通量、低体积的表征方法对于评估蛋白质和加快管线速度至关重要。

常规蛋白质浓度的分析通常依赖于难以追踪的稀释度、昂贵的染料或复杂的标准曲线。这些方法引入的偏差可能会影响结果的准确性和精确性。

直径和多分散性是确定蛋白质制剂是否发生聚集，以评估其质量的关键属性。动态光散射技术（DLS）是通过非侵入性测定这些参数的经典方法，但许多 DLS 仪器都是基于比色皿，并且每次只能测量一个样品。此外，这些仪器中的许多都需要大量稀释才能获得准确、可靠的结果。

Stunner 是一款将高通量 UV/Vis 与旋转角度 DLS（RADLS）和多角度静态光散射（MALS）相结合的平台。其可在仅 2µL 的样品上读取包括蛋白质浓度、分子量、颗粒数、尺寸和多分散性（图 1）等全面的数据。Stunner 的所有 RADLS 和 UV/Vis 数据都是以 96 孔板为规格的板材进行测量的，每个样品只需不到 2 分钟，无需稀释、设立标准或使用染料。

本应用陈述了如何使用 Stunner 来确定溶液中蛋白质和颗粒的大小和多分散性，量化蛋白质浓度，测量蛋白质分子量，并检查聚集情况。

要深入了解 RADLS 的细节，请参阅技术说明“深入了解 Stunner 的光散射技术”。

图 1: Stunner 是一款在同一个 2μL 样品上汇集 UV/Vis、RADLS 和 MALS 数据的系统

方 法

将 10g/L 的聚苯乙烯 41nm 和 202nm NIST™可追溯尺寸标准品（Thermo Fisher Catalog#33040A 和 3200A）的储备溶液分别在水中稀释 10 倍和 50 倍，并在 Stunner 中测量 20 次。通过将 41 和 202nm 微球在水中分别稀释至 0.24 和 0.012g/L 的最终浓度，来制备 20:1 的混合体系样品，然后一式三份进行测量。

将牛血清白蛋白（BSA）、白蛋白、人免疫球蛋白 G（IgG）和卵清蛋白（MilliporeSigma）的冻干粉在磷酸盐缓冲液（PBS）中复溶。将所有这些储备溶液和牛 RNaseA（Qiagen）的溶液一样都在 PBS 中稀释至 5mg/mL。然后通过 0.1 或 0.02μm 注射器过滤器过滤所有工作溶液，并一式四份进行测量。

将单克隆抗体（mAb1）在 5mM 琥珀酸钠、60mM 海藻糖（pH 5.0）中稀释至 10mg/mL，并通过 0.1μm 注射器过滤器过滤。从 mAb1 溶液中取出等分试样，加热至~80°C 孵育 15 分钟以诱导聚集。然后将聚集的 mAb1 与未聚集的样品以 99:1 和 9:1 的比例组合，分别制备 99%和 90%的 mAb1 样品。所有样品在 Stunner 上一式八份进行测量。将 mAb1 的另一等分试样在~80°C 下加热 30 分钟，并在 0 秒、10 秒、30 秒、1 分钟、3 分钟、5 分钟、10 分钟和 30 分钟取样。这些时间点的样品在 Stunner 上一式四份进行测量。

使用 Stunner 应用模块中“蛋白质（浊度）+RADLS”评估蛋白质浓度、颗粒浓度、分子量、瑞利比、流体动力学尺寸和多分散性。NIST™ 可追溯尺寸标准品，使用“浓度+尺寸”应用模块进行测量。在适当的情况下，使用 PBS、水或琥珀酸缓冲液（如上所述）作为空白。在 20°C 下，水和 PBS 的缓冲液粘度和折射率分别为 1.002cP 和 1.334，而琥珀酸缓冲液的值分别为 1.105cP 和 1.336。RADLS 使用 7 个角度、5 次采集和 1 秒时长的默认采集设置，并使用软件的自动角度选择和异常值排除功能。表 1 包含使用的所有蛋白质的 E1%值。

Protein	Extinction coefficient (E1%)
BSA	6.67
Conalbumin	11.6
IgG	13.7
Ovalbumin	7.5
RNaseA	8.99

表 1: 所用蛋白的 EI%值

结 果

测量数据非常接近，重复性很好

纳米颗粒标准品的精确尺寸使任何生物制品分析方法的验证都更简单。Stunner 的 RADLS 测量多个角度，因此它可以看到难以探测的大颗粒物。此外，RADLS 光学器件可自我优化，自动调整以获得每次测量和采样的最佳光束重叠。这意味着 Stunner 的 RADLS 可以提供非常精确的 DLS 读数，并且可以很容易地从 2µL 的样品中确定溶液中颗粒的大小。

在 Stunner 上测量了 41nm 和 202nm 的聚苯乙烯 NIST™ 可追溯尺寸标准品，其 CV 分别为 2.9%和 2.1%（图 2）。当样品 PDIs＜0.1 时，这是单分散颗粒的特征，意味着溶液中颗粒的数量均匀一致。将 41 和 202 nm 尺寸的标准品以 20:1 的比

例混合，可以显示当测量多分散、不均匀的样品时会我们能看到什么：Z 平均直径在球体的标称尺寸之间，PDI 增加到>0.2。

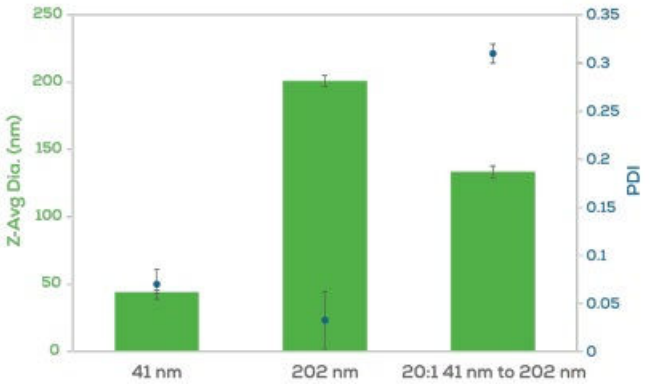

图 2: 41nm 和 202nm 聚苯乙烯 NISTTM 可追溯尺寸标准品和 20:1 标准品混合物的 Z 平均直径（绿色，左 y 轴）和多分散指数（PDI；蓝色，右 y 轴）。误差条表示 1 个标准偏差

使用累积法分析的 RADLS 数据，如 Z 平均直径和 PDI，非常适合判断样品颗粒大小是否均匀，以及判断单分散颗粒的大小。然而在研究多分散样品时，仍有许多不足之处。另一方面，正则化分析在观察非均匀粒子分布时更有用。该方法为不均匀样品中的颗粒的尺寸分布提供了最佳拟合。

Stunner 稳健的正则化分析给出了 20:1 混合标准品的高度可重复的粒径分布（图 3）。来自三次测量的散射光强度分布叠加图（左，绿色）在 200 nm 处显示出比 40 nm 高得多的峰值，这仅仅是因为较大的颗粒比较小的颗粒有更强烈地散射光（光散射强度随着尺寸的六次方而增加）。来自相同测量的质量分布（中间，蓝色）显示了相反的峰高比，因为较小的颗粒在溶液中颗粒的总质量密度中所占比例较大。由于较小的颗粒比较大的颗粒具有高得多的颗粒浓度，因此数量分布（右侧，紫色）仅在~40nm 处显示出单个峰值。

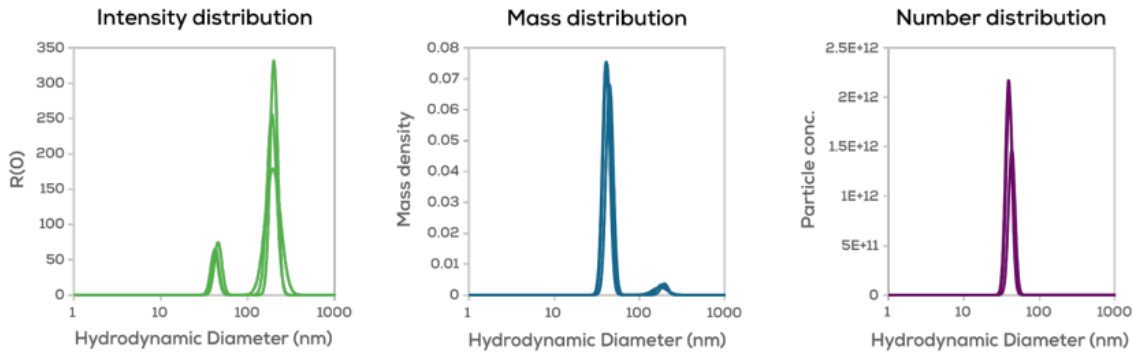

图 3: 41nm 和 202nm 聚苯乙烯 NISTTM 可追溯尺寸标准品在水中的 20:1 混合物，三个平行样品的散射光强度分布叠加图（绿色，左）、质量（蓝色，中）和数量（紫色，右）

蛋白定量和粒径测定永远不能同日而语

由于蛋白质的紫外/可见吸收定量不依赖于标准曲线，因此它非常精确、准确和可靠。在 PBS 中将五种蛋白质制备至 5mg/mL 的目标浓度 (图 4)。所有 5 种样品的测量浓度都在目标值的 2%以内，并且具有小于 1%的 CV。

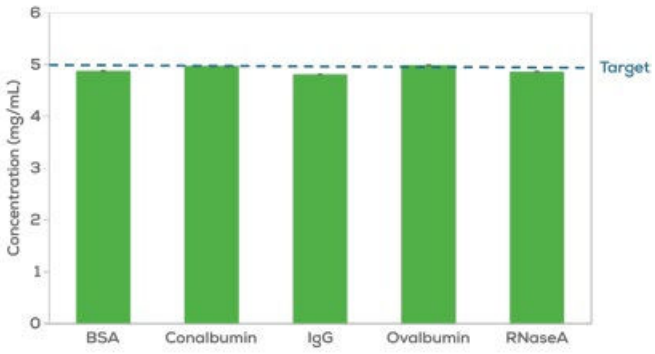

图 4: 5 mg/mL 牛血清白蛋白（BSA）、白蛋白、人免疫球蛋白 G（IgG）、卵清蛋白和 RNaseA 的蛋白质浓度。误差条表示标准偏差

对蛋白质进行真正的比较需要的不仅仅是它们的浓度。它们还需要真实的尺寸和粒子数。Stunner 收集多角度静态光散射（MALS）强度及其 RADLS 测量值。这些散射强度数据中的每一个都与粒子数量成比例——然而，这些测量也受到散射角的影响。通过组合不同角度的 MALS 数据，Stunner 可以获得任何尺寸的生物制品的

准确结果，而与角度无关。因此，Stunner 的强度、质量和数量分布是真实的，而不是数据归一化的，它们可以用于进行样品间的比较。

5mg/mL IgG 样品的散射强度显著高于相同浓度的卵清蛋白（图 5，顶部，浅绿色与深绿色），因为 IgG 的分子量约为卵清蛋白的 3 倍。当观察质量分布时（图 5，中间，蓝色），尽管蛋白质的大小不同，但峰的高度大致相同，因为它们在溶液中具有相同的浓度或总质量。在相同质量浓度下，卵清蛋白的颗粒数或摩尔浓度高于 IgG，因此其在数量分布中的峰值（图 5，底部，暗紫色）要高得多。

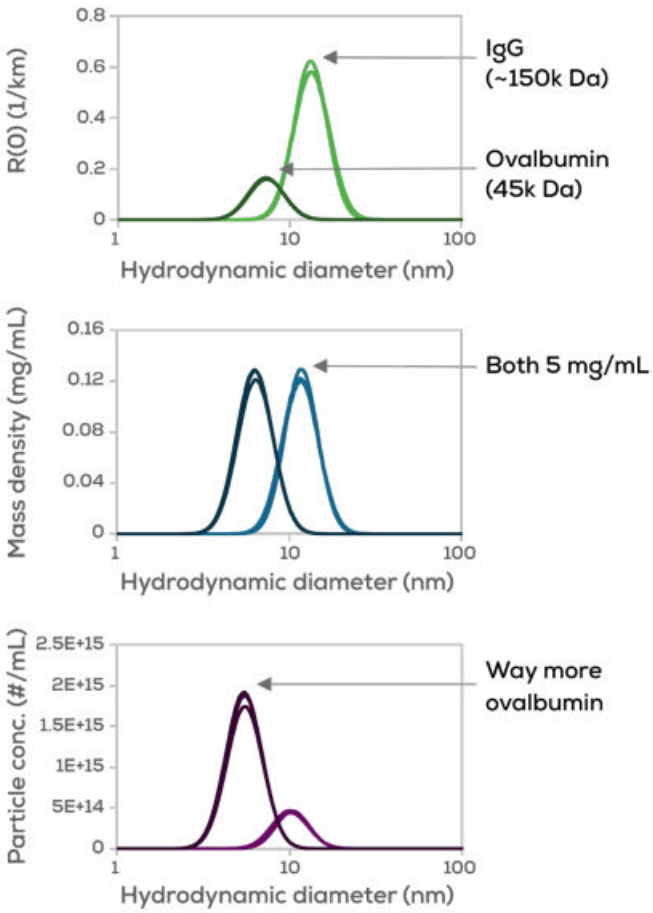

图 5: 5 mg/mL IgG（浅色）和卵清蛋白（深色）的散射光强度分布（绿色，顶部）、质量分布（蓝色，中间）和颗粒数量分布（紫色，底部），三个平行重复

获取分子量，无需等待

Stunner 使用 7 个角度的光散射强度，表示为瑞利比 R(θ)，来推断 0°角或 R(0) 时的强度。在理论上，0°的散射角是支持测量颗粒尺寸范围最宽的散射光强度最强的“最佳”测量角度；但在技术上不可能以这个角度进行测量，因为探测器将直接检测到光源激光。使用 IgG、白蛋白、卵清蛋白和 RNaseA 的 Guinier 图以图形方式描述 R(0) 的外推，显示了瑞利比的另一个特性：它与分子量成比例（图 6）。使用 R(0)，您可以使用以下方程对均匀纯化的蛋白质进行合理准确的分子量测定：R(0)=KcM。其中 K 是光学对比度常数，主要取决于分析物的折射率增量（dn/dc），c 是蛋白质的浓度，M 是分子量。

四种蛋白和 BSA 的结果如图 6 和表 2 中所示。（使用了近似的 dn/dc 对五种蛋白质进行计算。）

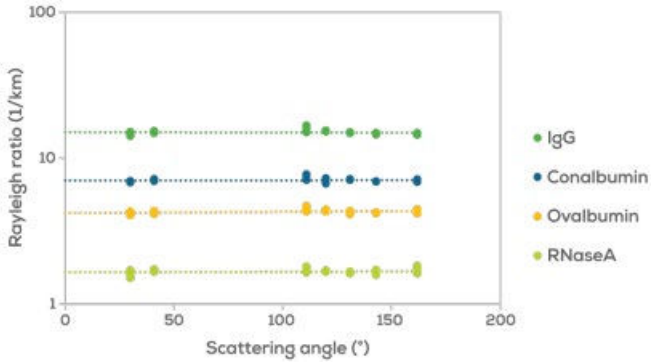

图 6: 5 mg/mL IgG（绿色）、白蛋白（蓝色）、卵清蛋白（黄色）和 RNaseA（浅绿色）的瑞利比（R）与散射角（°）的 Guinier 图，四个平行样品用 R（0）外推法测量

Protein	Reference MW (kDa)	Stunner MW (kDa)
BSA	67	70±1.3
Conalbumin	76	64±0.6
IgG	150	150±1
Ovalbumin	45	39±0.5
RNaseA	14	17±0.4

表 2: 5 种蛋白质的分子量理论值和 Stunner 测定值。每个样品的 MWs 由四个平行样品的 Stunner 测量值计算，方程为 MW=R/(K*c)，其中 K 是不同蛋白质的光学对比度常数（对所有样品使用相同的 dn/dc 近似），c 是通过 UV/Vis 吸光度确定的浓度

一次测量得到所有数据

确定生物样品的质量需要一个人使用很多不同的工具才能完成。然而，Stunner 能够针对每个样品在不到 2 分钟的测量时间内，提供包括浓度、直径和分子量等多种数据，这对于快速检测蛋白质样品中的聚集体非常有用。当用于样品间比较时，它甚至更接近表示聚集的程度。

含有 0%、1%和 10%聚集体的单克隆抗体样品，通过 UV/Vis 检测均得到相同的浓度，但通过 RADLS 检测能看到颗粒浓度的逐渐减少（图 7）。就分子量和直径而言，蛋白质聚集体比单体大得多，因此达到相同质量浓度所需的单个颗粒更少。mAb 样品的散射光强度和质量分布反映了这一点（图 8）。来自 0%聚集的 mAb 样品的八个平行样品 RADLS 测量的强度和质量分布显示出单一的、明确的、重叠的峰。来自 1%聚集的 mAb 样品，在散射光强度分布中显示 2 个峰值，但在质量分布中仅显示 1 个峰值。在 10%的聚集样品中，在散射光强度和质量分布中都可以看到第二个峰值。

Stunner 可以提供蛋白质质量浓度并检测聚集。当将样品相互比较时，它还可以半定量地确定聚集程度。

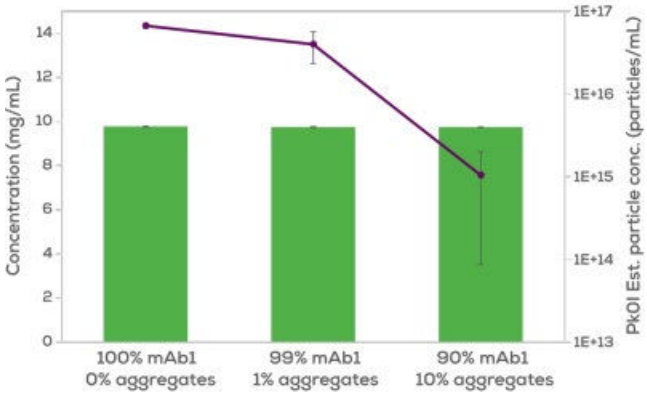

图 7: 通过 UV/Vis 测定质量浓度（绿色，左 y 轴）和含有 0%、1%和 10%聚集体样品的颗粒浓度（紫色，右 y 轴），在琥珀酸钠缓冲液 mAb1 浓度为 10mg/mL

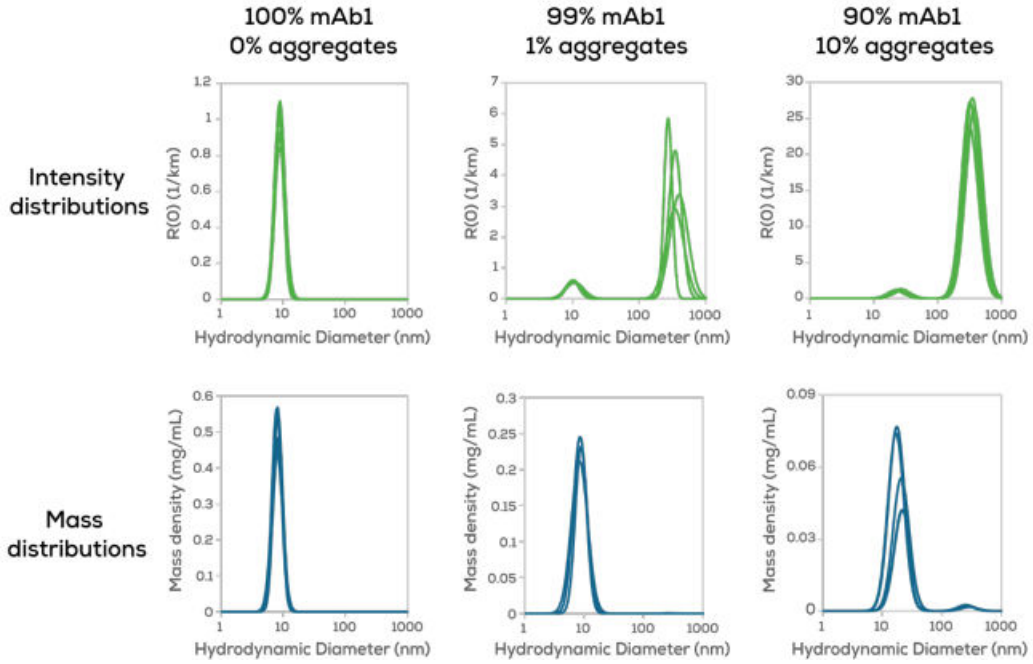

图 8: 在琥珀酸钠缓冲液中 10mg/ml 单克隆抗体，0%（左）、1%（中）和 10%（右）聚集体含量的样品各八个平行重复的散射光强度分布（绿色）和质量（蓝色）分布叠加图

压力测试简单易行

生物制品在开发过程中要进行一系列的强制降解研究。各种应力都被用来诱导蛋白质损伤，包括温度、pH 和机械损伤等。Stunner 的 UV/Vis 和 RADLS 技术通过评估不同采样时间点的聚集情况，快速了解压力测试过程中样品发生的情况。例如，即使 mAb1 的 UV/Vis 浓度在热应力时间过程中没有变化，但质量分布中主峰的流体动力学直径在 10 分钟后急剧增加（图 9）。到 30 分钟时，蛋白质已经完全聚集。

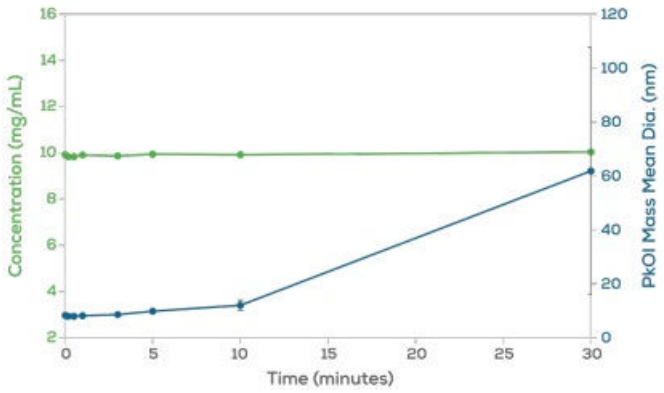

图 9: 加热至 80°C 的 mAb1 的 UV/Vis 浓度数据（绿色，左 y 轴）和溶液中颗粒的平均直径（蓝色，右 y 轴）。采用每个样品四个平行重复，使用 Stunner 在指定的时间点采集数据进行测量。误差条表示标准偏差

结 论

Stunner 使高通量、低体积的生物物理表征需求的变得简单。RADLS 和 UV/Vis 数据提供了关于蛋白质浓度、分子量、聚集性、大小和多分散性的精确结果。无论是在压力测试还是未知情况，真实的散射光强度、质量和数量分布都可以让你更全面的进行样品间比较，以确定蛋白质样品中的聚集程度。Stunner 仅使用 2μL 的样品，在不到 2 分钟的时间内，即可在任何生物制品上提供无需稀释、无需标准品、无需标记的蛋白质表征。

Unchained Labs
4747 Willow Rd
Pleasanton, CA 94588
Phone: 1.925.587.9800
Toll-free: 1.800.815.6384
Email: info@unchainedlabs.com

© 2024 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo, Stunner the Stunner logo are trademarks and/or registered trademarks of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev A