

DSF 差示扫描荧光测定法 在 NISTab 中的应用

介绍

NISTmAb 是一种广泛表征的单克隆抗体，旨在用作开发治疗蛋白表征新技术中的标样。在本应用文献中，我们使用 SUPR-DSF 来获取 NISTmAb 的差示扫描荧光法 (DSF) 的数据，并将结果与差示扫描量热法 (DSC) 进行比较。

SUPR-DSF 解析了 NISTmAb 所有的三个结构域：CH2(69°C), CH3(83°C)和高解链温度的 FAB 结构域(94°C)[1]。此外，所测得的 T_m 值与文献的报道完全一致。这些结果证明了，应用 SUPR-DSF 可以轻松获得高质量的蛋白质稳定性信息。

结果

SUPR-DSF 测 T_m 值的实验中所获得的荧光光谱可以用来计算重心平均值(barycentric mean,BCM)，该值可以用来量化 NISTmab 从折叠状态过渡到展开状态时的波长偏移。图 1(a)所示的 NISTmAb 的 BCM 解链温度曲线显示了三个明显不同的转变点：CH2(69°C), CH3(83°C)和 FAB 结构域(94°C)。SUPR-DSF 能够准确测量 Fab 的高解链温度，这得益于它能够将样品升温至 105°C，而其它 DSF 仪器则很难做到，这一点在图 1(a)中非常的明显。该图显示了，其它仪器 DSF 无法准确分析 Fab 结构域的解链温度[2]。

SUPR-DSF 经过一阶导数的数据处理，并通过归一化，与 DSC 所测得 Fab 域的数据进行比较[1]。图 2(b)的结果清楚的显示了两种测量方法之间结果的一致性，所有的三个峰值都基本一致。两种测量方法之间有极佳的相关性。这表明，基于蛋白质的内源荧光 (DSF) 和 DSC 这两种方法测量蛋白质热稳定性是可以正交验证的。通过 SUPR-DSF，可在 2 小时内获得 384 个样品的高质量解链温度曲线。这也给高通量测量解链温度曲线，开辟了新的可能性。两种方法所测量得到和计算解链温度都显示在表 1 中。

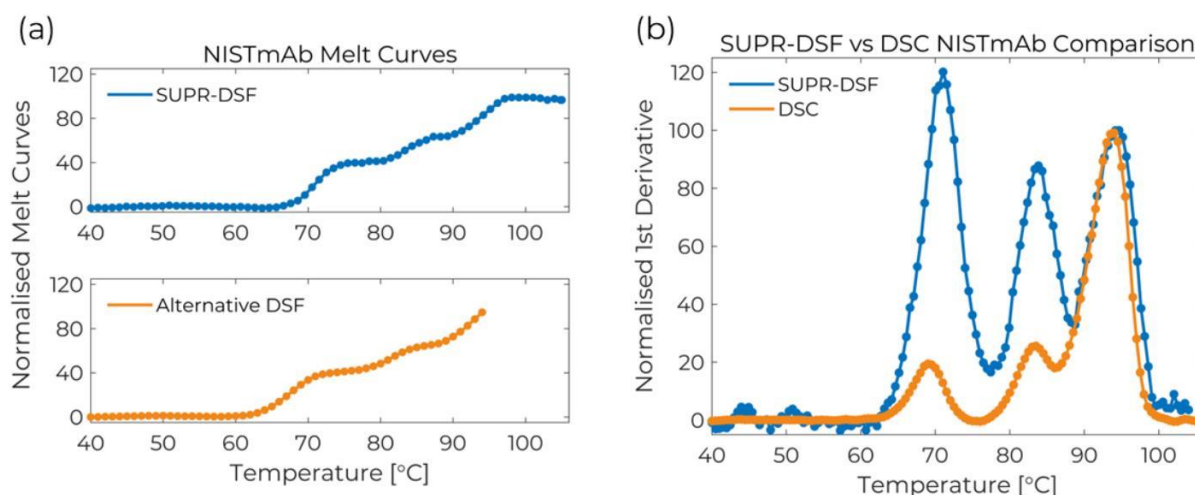


图 1 – (a) SUPR-DSF 的 BCM 解链温度曲线与其它 DSF 的解链温度曲线比较。
(b) 归一化后的 BCM 一阶导数数据与 DSC 结果的比较。

表1 – NISTmAb DSC 和 SUPR-DSF 拟合后的数据。其标准差小于 0.2°C。

样品	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T _{m3} (°C)
DSC	69.2	83.1	93.4
SUPR-DSF	70.8	83.7	93.7

结论

Protein Stable 公司的 SUPR-DSF 可以通过检测蛋白质内源荧光的峰位移，并快速准确地测量解链温度。结果表明 SUPR-DSF 能够获得准确的解链温度，包括像 Fab 结构域这样的超高解链温度(94°C)。

这也验证了基于内源荧光法的 SUPR-DSF 可以获得与 DSC 一致的结果。利用 384 孔板进行测试的优势在于提高了通量，增加了便利性同时降低了样品的消耗。

方法

浓度为 1mg/ml 的 NISTmAb 在 pH6 的 L-组氨酸缓冲液中进行配制，分别加到 384 孔 PCR 微孔板中，每个孔用量是 10µL。分装后，将微孔板离心 60 秒后，用透明胶膜密封。将 SUPR-DSF 中的连续升温程序设置成以每分钟 1°C 的升温速率测量 15°C 到 105°C 的荧光光谱。

荧光光谱所获得的数据，通过 BCM 方法进行计算处理，并量化光谱偏移。BCM 的数据会处理成温度的函数，并转换成一阶导数再进行分析。根据导数的峰值计算解链温度。所有样品的方法和结果均可获取。

参考文献

- [1] – Y. Gokarn, S. Agarwal, K Arthur, A Bepperling, et al. “Biophysical Techniques for Characterizing the Higher Order Structure and Interactions of Monoclonal Antibodies,” in State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 2. Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study. Chapter 6, p.285-327.2015
- [2] – Y. Hamuro, M. Derebe, S. Venkataramani, J. Nemeth. “The Effects of Intramolecular and Intermolecular Electrostatic Repulsions on the Stability and Aggregation of NISTmAb Revealed by HDX-MS, DSC and NanoDSF”. *Protein Science*. Vol. 30, Issue 8, p. 1686-1700. 2021.

Protein Stable

21 Mole Business Park
Leatherhead

Surry
KT22 7BA
UK 英国

