

## 使用 FTIR 光谱法测定单克隆抗体的蛋白质二级结构

04-AD-0244-CN

Zhen Hao Lee, Joyce Lim, Ai Ming Chua

### 对用户的好处

- ◆ 使用 MicromATR™ ATR 附件进行微量液体采样
- ◆ 使用 IRTracer-100 和 9 次反射 MicromATR ATR 附件提高灵敏度

### 引言

单克隆抗体 (mAb) 因其在医学和生物科学中的广泛应用而成为一大类生物药物。抗体的生物活性可归因于其独特的形态结构 [1]。蛋白质高序结构 (HOS) 包括构成蛋白质三维结构的二级、三级和四级蛋白质结构 [2]。mAb 的 HOS 分析对于确保蛋白质治疗产品的质量和有效性至关重要。已用于表征蛋白质 HOS 的一些分析方法包括紫外圆二色光谱、核磁共振 (NMR) 和傅立叶变换红外 (FTIR) 光谱。

FTIR 光谱适用于测定蛋白质不同二级结构的相对量。可以从 IR 光谱中蛋白质的酰胺谱带 I 中获得该信息, 范围为  $1600\text{ cm}^{-1}$  到  $1700\text{ cm}^{-1}$ 。可应用带曲线拟合和二阶导数等数学程序来解析重叠的酰胺谱带 I 成分, 并量化蛋白质的二级结构。在本应用报告中, 使用 FTIR 光谱和谱带曲线拟合数据分析检查 mAb 的二级结构。

### 实验部分

本分析中使用的 mAb 是贝伐单抗生物仿制药和曲妥珠单抗。制备贝伐单抗生物仿制药和曲妥珠单抗, 并使用去离子水分别稀释至  $25\text{ mg/mL}$  和  $30\text{ mg/mL}$ 。

使用配备 9 次反射 ATR 晶体 (金刚石) 的 MicromATR ATR 附件 (图 1) 进行 FTIR 测量。与应用新闻 AD-0178 [3] 中使用的透射池技术相比, ATR 的小晶体表面积只需使用  $30\text{ }\mu\text{L}$  样品, 且更易于清洁。与单次反射晶体相比, 9 次反射 ATR 晶体具有更好的灵敏度。

将作为对照空白样品的去离子水移取至晶体表面。使用岛津 IRTracer-100 FTIR 光谱仪获得红外光谱, 测量条件如表 1 所示。在  $1900\text{ cm}^{-1}$  至  $600\text{ cm}^{-1}$  的波数范围内获得红外光谱。用相同的方法测定抗体溶液, 每个样品测定四次

表 1 仪器和分析条件

仪器	:	IRTracer-100 傅立叶变换红外光谱仪 MicromATR ATR 附件
分辨率	:	$4\text{ cm}^{-1}$
测定次数	:	100 次
变迹函数	:	Sqr-Triangle
检测器	:	DLATGS



图 1 MicromATR™ ATR

### 结果和讨论

抗体蛋白的酰胺 I 谱带 ( $1600\text{ cm}^{-1}$  至  $1700\text{ cm}^{-1}$ ) 与水振动模式 ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ) 直接重叠。为了获得抗体的真实光谱, 抗体光谱中扣除对照空白的的光谱。为确保减去的对照空白样品光谱没有过多或不足,  $1900\text{ cm}^{-1}$  到  $1700\text{ cm}^{-1}$  的波数范围应该是平坦的基线, 且该范围内没有负数部分。图 2 显示了减法后抗体样品的重叠红外光谱。

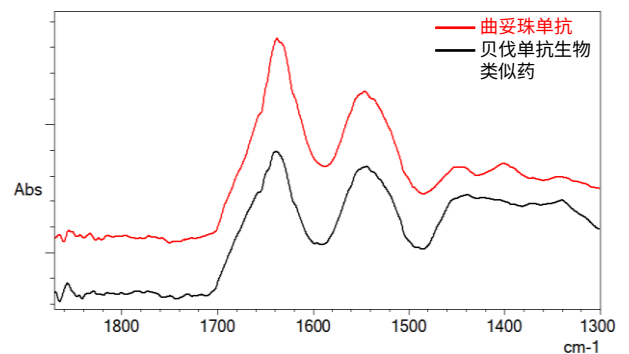


图 2 减去去离子水后贝伐单抗生物仿制药和曲妥珠单抗的重叠红外光谱

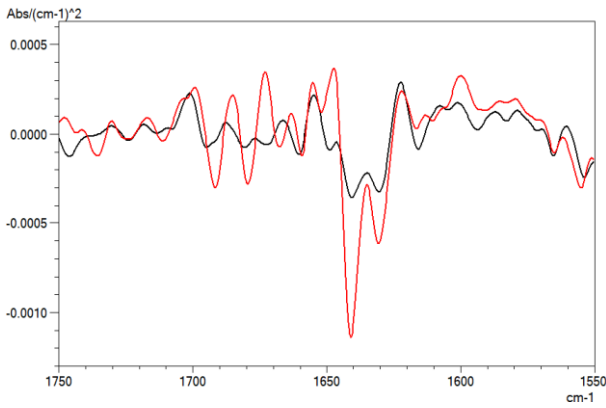


图3 贝伐单抗生物仿制药 (A) 和曲妥珠单抗 (B) 的二阶导数光谱

图3显示了抗体蛋白的二阶导数光谱。将来自二阶导数光谱的谱带位置用作酰胺谱带I曲线拟合分析的指导。对图2中差谱后的抗体光谱进行ATR校正,以获得与透射法光谱类似的光谱。使用七点 Savitzky-Golay 函数进一步平滑 ATR 校正光谱,以去除任何可能的白噪声。随后进行酰胺谱带I的基线校正。根据表2中的设置,使用 LabSolutions™IR 曲线拟合函数对酰胺谱带I进行谱带曲线拟合分析。图4显示了贝伐单抗生物仿制药 (A) 和曲妥珠单抗 (B) 的曲线拟合酰胺谱带I的IR光谱。

表2 曲线拟合设置

峰曲线类型	: 高斯函数
基线	: 无基线
范围	: 1595 - 1705 cm <sup>-1</sup>
最大误差	: 0.01 %

每个组分峰代表一个二级结构元素 [4]。根据每个指定组分峰的面积计算每个二级结构元素相对于总贡献的相对贡献。贝伐单抗生物仿制药和曲妥珠单抗各二级结构元素的定量结果见表3 定量结果是四次重复测定结果的平均值。

表3 贝伐单抗生物仿制药与曲妥珠单抗二级结构百分比

二级结构	贝伐单抗生物仿制药 (%)	曲妥珠单抗 (%)
α 螺旋	5.91	6.65
β 折叠	62.31	70.08
β 旋转	29.83	22.88
随机	1.94	0.39

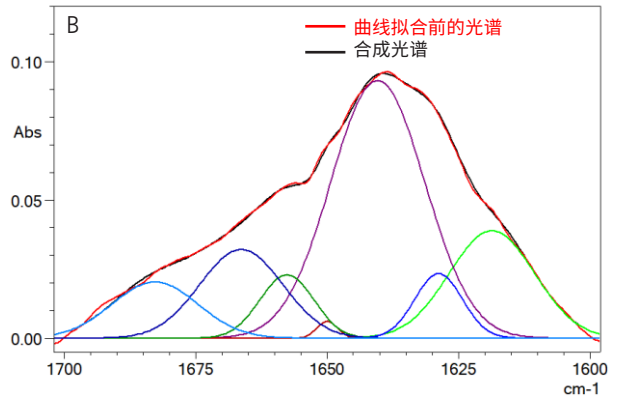
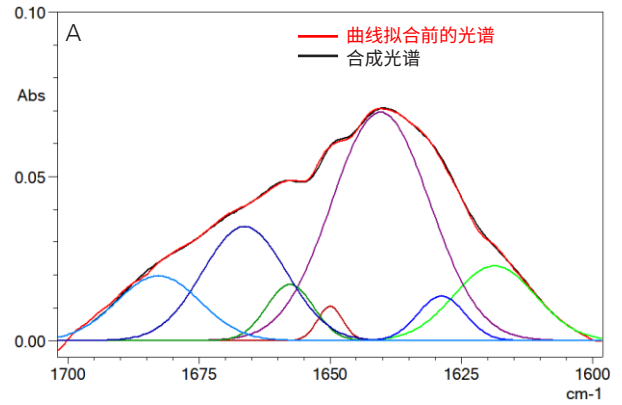


图4 贝伐单抗生物仿制药 (A) 和曲妥珠单抗 (B) 的红外光谱与拟合的组分谱带

## 结论

使用曲线拟合方法分析酰胺谱带I区域上 mAb 的二级结构。使用带有9次反射 ATR 附件的 FTIR 光谱,可以利用最少的样品体积和简单的样品制备步骤来测量水溶液中的蛋白质。

### 参考文献

1. Davies, D. R., and Metzger, H. (1983) Structural Basis of Antibody Function. *Annu Rev Immunol* 1:87-115.
2. Wei, Z., Shacter, E., Schenerman, M., Dougherty, J., and D. McLeod, L. (2011) The Role of Higher-Order Structure in Defining Biopharmaceutical Quality. *BioProcess International* 5:58-66.
3. Lee, Z. H., Kuek, J. S., Lim, J and Chua, A. M. (2018). Determination of Protein Secondary Structures using FTIR Spectroscopy. *Application News*, No. AD-0178.
4. Dong, A., Huang, P. and Caughey, W. S. (1990). Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* 29: 3303-3308.

岛津应用云



IRTracer 和 LabSolutions 是岛津制作所或其附属公司在日本和 / 或其他国家 / 地区的商标。  
MicromATR 是 CziTek, LLC 的注册商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司  
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2021年6月