



使用 UHPLC 配合荧光检测对单克隆抗体和其它糖蛋白进行 N-糖链分析

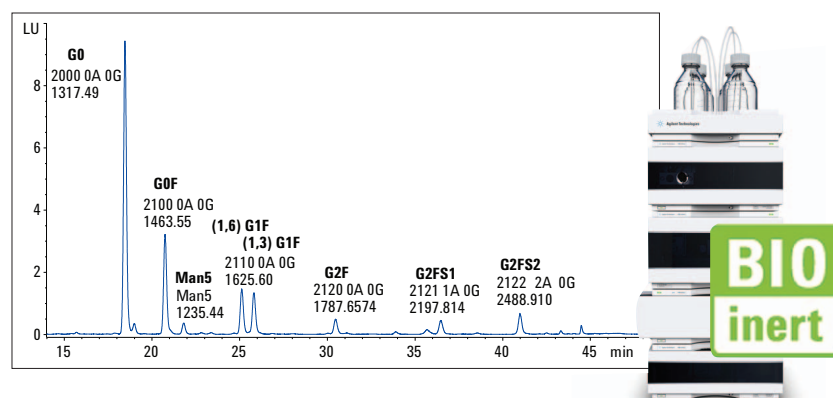
Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵液相色谱系统及 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器

应用简报

生物制药

作者

Sonja Schneider 和 Edgar Nägele
安捷伦科技公司
德国瓦尔德布隆



摘要

本应用简报展示了利用亲水相互作用色谱法 (HILIC) 对 N-连接糖链进行分析，其中联合使用了 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵液相色谱系统及 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器。使用 PNGase F 对单克隆抗体 (mAb) 及另外两种源自鸟类卵清的糖蛋白（卵清蛋白及伴清蛋白）进行酶解后，利用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 对释放的糖链进行衍生化。结果显示，可以良好地分离单克隆抗体的糖链模式，且 mAb 包含的所有主要 N-糖链检测信噪比良好。此外，两种主要类型的鸟类卵糖蛋白的复杂糖链模式也得到了良好的分离，可检测出 30 至 35 个色谱峰。1260 Infinity 生物惰性四元泵液相色谱与 1260 Infinity 荧光检测器联用，是高灵敏度和高分离度分析 mAb 及其它糖蛋白释放糖链（经 2-AB 衍生化处理）的理想解决方案。



Agilent Technologies

前言

蛋白质糖基化是一种最为常见的翻译后修饰。哺乳动物糖蛋白包括三种主要类型的糖链：即由一个或多个单糖单元构成的 N-连接糖链、O-连接糖链以及糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 脂锚。由于糖蛋白质量数和电荷数的原因，单个糖基化位点即可产生可观的异质性。这些低聚糖涉及到许多生物调节和识别过程，例如蛋白质分选、免疫及受体识别、炎症、致病性、新陈代谢及其它细胞过程。因此，特定的糖基化模式可能与患者的疾病或健康状况有关^{1,2}。此外，治疗性蛋白的安全性、有效性和血清半衰期等特性也会受到其糖基化模式的影响。

作为一种主要的新型药物，重组单克隆抗体治疗药物 (mAb) 是最大的一类治疗性蛋白。此类治疗性药物的有效性高度依赖于 mAb 正确的糖基化模式，且迄今为止，所有批准的治疗性 mAb 均为免疫球蛋白 G (IgG)³。人 IgG 中有一个单独的保守 N-连接糖基化位点，位于每条重链 Fc 段的 Asn 297⁴ (图 1)。因此每个 IgG 可连接两个糖基，均具有很高的异质性，包含多达 30 种不同的糖链类型⁵。再加上 Fc 段中这两个糖基化位点上不同糖链的组合，导致每批 mAb 产品中包含有大量不同的糖型。

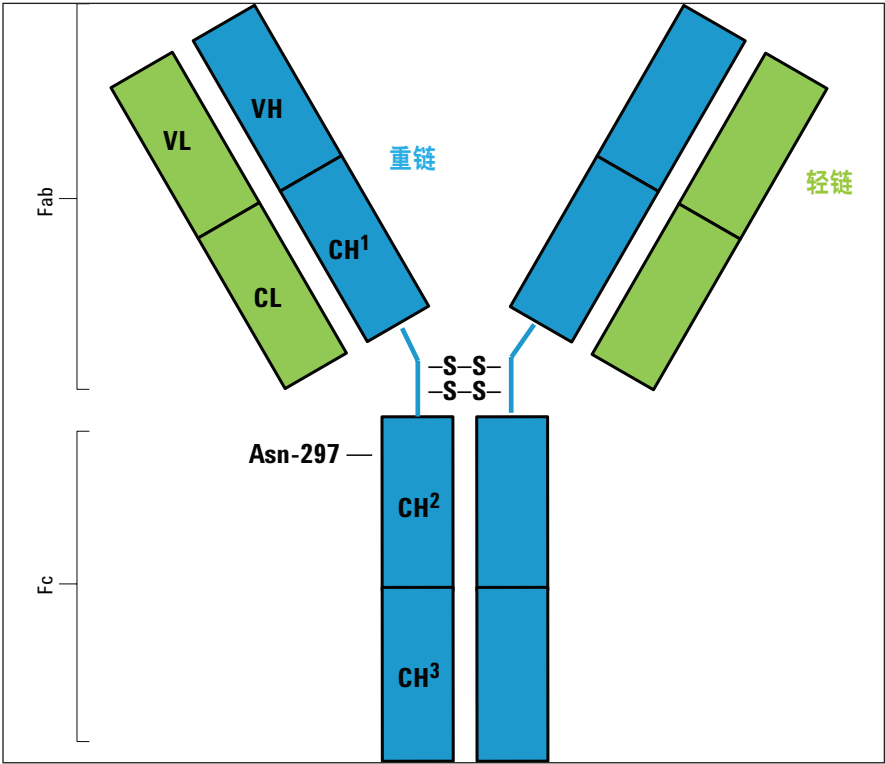


图 1
IgG 抗体结构

该糖基化位点上糖链的结构在补体激活和受体亲和性方面发挥重要作用⁶，可影响治疗性 mAb 的有效性。此外，非人类来源的糖链还存在安全性问题，因为它们会引发免疫反应。

因此，糖链模式分析是表征治疗性糖蛋白（尤其是 mAb）的一个重要部分。图 2a 中展示了用于描述蛋白质不同糖链结构的糖残基的一般命名法。图 2b 中展示了出现在 IgG Asn-297 位点上的主要糖链结构。通常 N-糖链有一个核心结构，包括两个 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 及三个甘露糖 (Man) 单元。IgG Fc N-糖链主要为二分支复合型结构，部分为核心岩藻糖基化的（例如，G0F）。

关于糖链分析，已有一些不同的方法策略。其中大量方法均基于糖链的蛋白质释放后衍生化⁷，这是由于其缺少可进行光学方法检测（例如 UV 检测）的发色团。我们在此利用 PNGase F 进行 N-糖链的酶解释放，随后使用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 进行衍生化，以进行荧光检测。

2-AB 是一种中性的稳定键合标记物，常用于糖链分析^{7, 8, 10}。图 3 中展示了 2-AB 通过还原胺化反应进行标记（希夫碱中间体未展示）。糖链的 2-AB 标记使得糖链质量数增加 119 Da。由于质子化作用，最终质谱中的质量数偏差为 120 Da（表 1，2，3）。

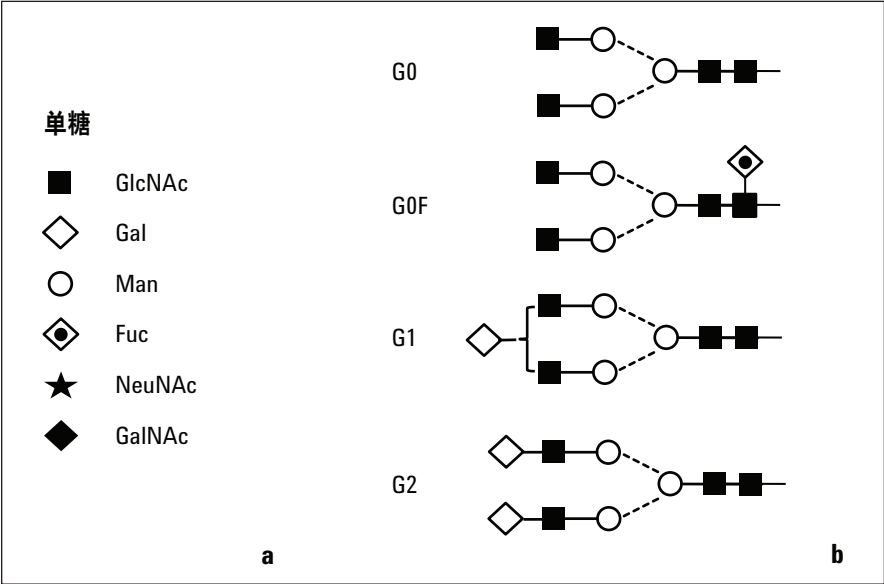


图 2
糖链结构和亚型。a) 糖链的一般命名法 b) IgG 的主要糖链结构
G = 半乳糖单元，F = 岩藻糖单元。根据 Arnold 等人⁴ 所述进行修改

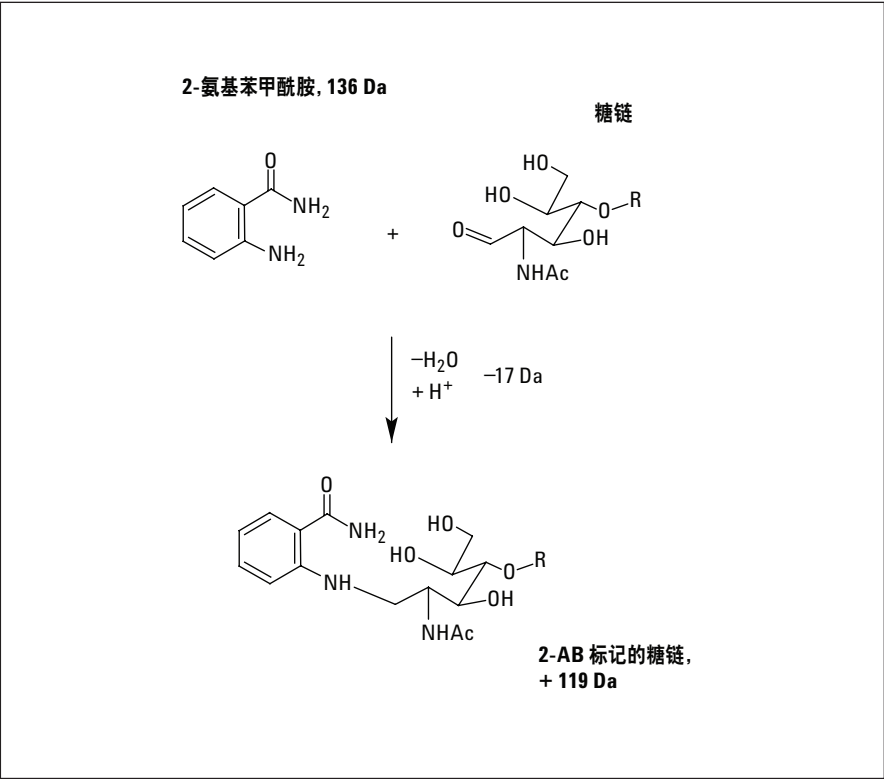


图 3
采用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 对糖链进行标记

由于糖链具有亲水性，后续的纯化过程采用亲水相互作用色谱-固相萃取 (HILIC-SPE) 法以去除过量的标记化合物⁸。

采用 HILIC 分离并利用荧光进行检测是一种稳健的糖链分析方法⁹。Pauline Rudd 及其同事根据 HILIC 保留特性建立了一个数据库 (<http://glycobase.nibrt.ie/>)，这是蛋白质糖基化分析中的一种常用技术^{8, 10}。为了鉴定色谱峰中糖链的单糖组成，可将 HILIC-LC 与 ESI-QToF-MS 技术联用，以获取质量数和结构信息。

实验部分

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 高效生物惰性自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 VL (G1315D，配置生物惰性标准流通池，10 mm)
- Agilent 1200 系列荧光检测器 (G1321A)，配有标准流通池

质谱系统

Agilent 6530 精确质量数四极杆-飞行时间液质联用系统

色谱柱

HILIC Glycan Amide 色谱柱，2.1 × 150 mm，亚 2 微米

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation，LC 和 LC/MS 系统版，修订版 C.01.02 [14]

Agilent MassHunter Workstation 软件，版本为 B.04.00，Build 4.0.479.0

样品制备

去糖基化步骤

对单克隆抗体和糖蛋白使用 PNGase F 进行去糖基化，从糖蛋白中释放天冬酰胺连接的低聚糖 (N-糖链)。PNGase 可从糖蛋白中断裂出天冬酰胺连接的高甘露糖和复杂的混合型低聚糖，并保持糖链的完整性。蛋白的平均糖基化率为 2–5%，平均分子量为 1000 Da。因此，为了获得约 20 µg 糖链，需加入 400 µg 糖蛋白。卵

色谱条件

	梯度，抗体标准品	梯度，糖蛋白
初始流速：	0.5 mL/min	0.5 mL/min
梯度：	0 min – 85% B	0–6 min – 85% B
	5 min – 75% B	10 min – 80%B
	35 min – 64%	60 min – 64% B
	40 min – 50%	65 min – 50% B
	42 min - 流速 0.25 mL/min	67 min – 流速 0.25 mL/min
	43 min – 0% B	68 min – 0% B
	48 min – 0% B	73 min – 0% B
	50 min – 85% B	75 min – 85% B
	55 min – 流速 0.5 mL/min	80 min – 流速 0.5 mL/min
停止时间：	55.01 min	80.01 min
后运行时间：	20 min	20 min
进样体积：	10 µL	1 µL
柱温：	60 °C	
FLD：	激发 260 nm 发射 430 nm	
峰宽：	> 0.025 min (18.52 Hz)	

清蛋白和伴清蛋白均只有一个糖基化位点，而 mAb 有两个糖基化位点。需根据糖链的量调整 PNGase F 的用量。蛋白的去糖基化过程依据西格玛奥德里奇提供的说明书，在 37 °C 下反应 3 小时。然后停止反应，在真空下干燥样品以进行进一步处理。

利用 AB-标记进行荧光检测及样品纯化

利用荧光团 2-AB (2-氨基苯甲酰胺) 标记干燥的糖链样品，这里使用 GlycoProfil 2-AB 标记试剂盒，依据西格玛奥德里奇提供的处理方案，在 65 °C 下反应 3 小时。标记完成后，使用西格玛奥德里奇的 GlycoProfil 糖链纯化柱，根据说明书中介绍的方法进行样品纯化。HILIC 纯化完成后，样品在真空下干燥，并加入 15 µL 超纯水复溶以进行液相色谱分析。

溶剂和样品

缓冲液 A： 100 mM 甲酸铵， pH 4.5

缓冲液 B： 乙腈

所有试剂均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。所使用的单克隆抗体标准品来自 mAb-Glyco 芯片套装（部件号 G4240 64026）。甲酸铵、卵清蛋白和伴清蛋白、Elizabethkingia miricola 源 PNGase F、GlycoProfil 2-AB 标记试剂盒和 GlycoProfil 糖链纯化柱均购自西格玛奥德里奇公司（美国圣路易斯）。

结果和讨论

分析源自单克隆抗体的 N-糖链

采用 HILIC-UHPLC 分析源自单克隆抗体标准品（包含在 Agilent mAb-Glyco 芯片套装中）的 N-糖链，并在分析前进行了 AB 标记。图 4 中显示了 mAb 糖链的分离情况。将所得的 HILIC 糖链模式与 Melmer 等人¹⁰ 生成的 mAb 糖链模式进行比较，并将单独的色谱峰分配至相应的糖链结构。对于峰标记，同时使用了各种出版物中^{4, 5, 10} 的命名法及 Agilent mAb-Glyco 芯片说明书中的命名法。对 mAb 糖链模式实现了最佳分离，可分离 mAb 中出现的所有主要 N-糖链：G0，G0F，Man5，(1,6)G1F 及 (1,3)G1F。此外，还可检测到两个色谱峰，代表两个含有 N-乙酰神经氨酸 (NANA) 的唾液酸化糖链 (G2FS1，G2FS2)。

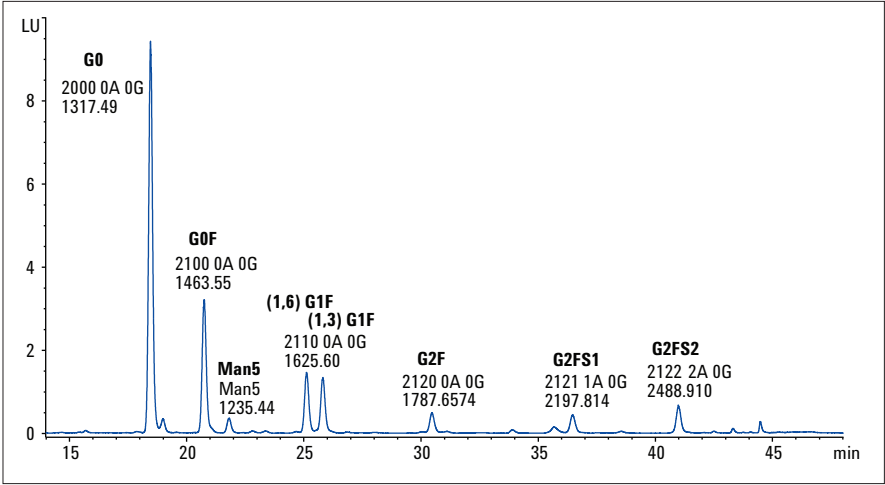


图 4
mAb N-糖链的分离情况

名称	计算所得 质量数	质量数 + AB	单糖组成	结构
G0	1317.5	1437.6	GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂	
G0F	1463.6	1583.6	GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	
Man5	1235.4	1355.5	Man ₅ GlcNAc ₂	
(1,6)G1F	1625.6	1745.7	GalGlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	
(1,3)G1F	1625.6	1745.7	GalGlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	
G2F	1787.6	1907.7	GalGlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	
G2FS1	2077.8	2197.8	NeuNAcGal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	
G2FS2	2368.9	2488.9	NeuNAc ₂ Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	

表 1
该表概述了检出的单克隆抗体糖链结构

mAb 标准品的糖链模式 (图 3) 显示其中含有大量的糖链 G0, 它是在系统测试时所加入的内标。表 1 中总结了所检测到的糖链结构。

通过设置 1260 Infinity 荧光检测器的最佳糖链检测波长, 可检测到高强度的标记后糖链, 其中激发波长为 260 nm, 发射波长为 430 nm。通常认为 330 nm 的激发波长较适用于分析 2-AB 标记的糖链¹¹。我们使用更低的 260 nm, 这是由于更高的强度可获得更好的信噪比, 如 Melmer 等人¹⁰所述。

另两种糖蛋白 (卵清蛋白和伴清蛋白) 也被去糖基化, 然后进行糖链衍生化, 之后利用 HILIC-UHPLC 进行分析。图 5 中显示了卵清蛋白糖链的分离情况。卵清蛋白只在一个位点上 (Asn 292) 发生 N-糖基化, 但是与该位点相关的糖基化模式非常复杂¹¹。由于该糖链模式的复杂性, 需要调整梯度以获取更高的分离度。采用 ESI-QTOF 检测并通过与 Harvey 等人于 2000 年¹² 发表的糖链数据库进行质量数匹配, 共鉴定出六种糖链, 详细的糖链信息请见表 2。在释放自卵清蛋白的糖链样品中, 可分离出超过 35 个色谱峰。

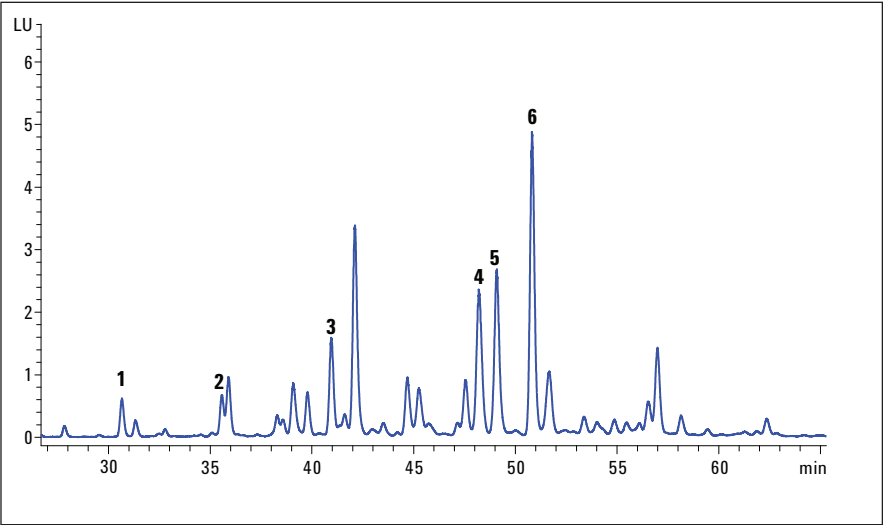


图 5
释放自卵清蛋白的 N-糖链分离情况

色谱峰	保留时间	计算所得 质量数	质量数 + AB	名称	结构
1	30.66	1114.5	1234.5	GlcNAcMan ₃ GlcNAc ₂	
2	35.59	1317.6	1437.6	GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂	
3	40.95	1235.5	1355.5	Man ₃ GlcNAc ₂	
4	48.21	1397.6	1517.6	Man ₆ GlcNAc ₂	
5	49.09	1438.6	1558.6	GlcNAcMan ₅ GlcNAc ₂	
6	50.81	1927.8	2047.8	GlcNAc ₆ Man ₃ GlcNAc ₂	

表 2
所鉴定的卵清蛋白 N-糖链的详细信息

图 6 中展示了伴清蛋白（又名：卵铁传递蛋白）的糖基化模式。与卵清蛋白类似，每分子伴清蛋白也只有一个 N-连接糖基化位点¹³。尽管其糖链模式具有复杂性，但是仍可成功获得高分离度的糖链分离，且峰形良好。利用 ESI-QTOF 检测可鉴定出三种糖链，详细的糖链信息请见表 3。总的来说，在释放自伴清蛋白的糖链样品中，可检测到超过 30 个色谱峰，且均具有良好信噪比。

与 mAb 相对简单的糖链模式相比，虽然两种卵清糖蛋白均只有一个糖基化位点，但是它们有着更多更复杂的糖链结构。与 mAb 糖链不同的是，在卵清蛋白和伴清蛋白中均未检测到任何岩藻糖化的糖链，这是由于所有鸟类卵糖蛋白均是非岩藻糖化的¹⁴。

结论

本应用简报证实了对于 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 衍生化的蛋白质释放糖链，Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵液相色谱及 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器联用系统是一种理想的分析解决方案。对单克隆抗体标准品及两种鸟类卵清糖蛋白的样品处理使用 PNGase F 以释放 N-连接糖链，然后利用 2-AB 进行衍生化，再进行 HILIC 样品纯化。

对单克隆抗体标准品的糖链模式实现了最佳分离，可分离 mAb 中出现的所有主要 N-糖链：G0, G0F, Man5, (1,6)G1F, (1,3)G1F, G2F, 甚至 G2FS1 及 G2FS2 也可被检测，且具有良好信噪比。

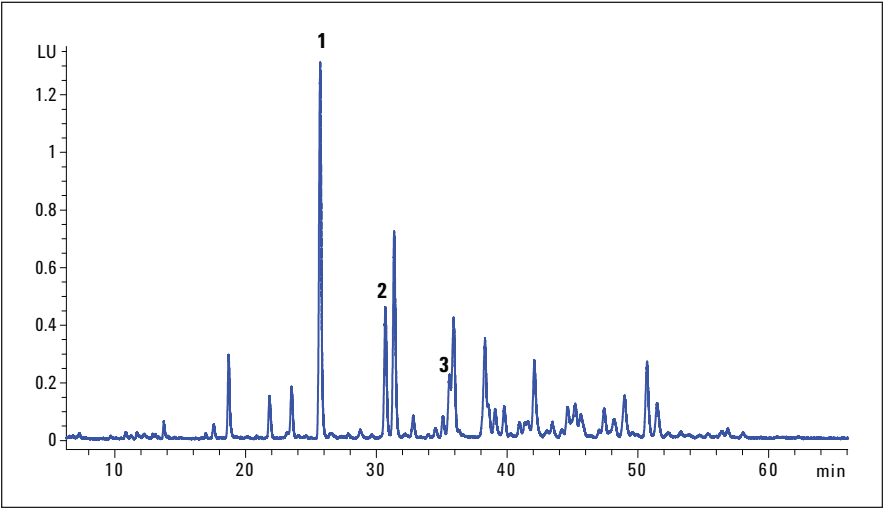


图 6
释放自伴清蛋白的 N-糖链分离情况

色谱峰	保留时间	计算所得 质量数	质量数 + AB	名称	结构
1	25.6	911.4	1031.4	Man ₃ GlcNAc ₂	
2	30.66	1114.5	1234.5	GlcNAcMan ₃ GlcNAc ₂	
3	35.59	1317.6	1437.6	GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂	

表 3
所鉴定的伴清蛋白糖链的保留时间、质量数、单糖组成和结构

为我们的系统优化荧光波长后，可使用 1260 Infinity 荧光检测器获得更高的强度，从而获得更好的信噪比。其中使用了更低的 260 nm 激发波长，而非 330 nm (Anumula 2005¹¹ 推荐值)。

此外，两种鸟类卵糖蛋白（卵清蛋白和伴清蛋白）的复杂糖链模式均得到了很好的分离，结果检测出超过 30 至 35 个色谱峰，

且峰形和信噪比良好。后续的 ESI-QTOF 分析可鉴定不同质量数的糖链和相关的单糖组成。

1260 Infinity 生物惰性四元泵液相色谱与荧光检测技术联用，是分析 mAb 及其它 2-AB 衍生化的糖蛋白释放糖链的最优化系统，具有高灵敏度和高分离度的特点。

参考文献

1. Rademacher T.W., Williams P. and DwekMark R.A. **(1994)**. Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(13): 6123–6127.
2. Peracaula R. *et al* **(2003)**. Glycosylation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumor states. *Glycobiology*, 13 (4): 227-244.
3. Jefferis R. **(2005)**. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology Progress*, 21: 11-16.
4. Arnold *et al* **(2005)**. Human immunoglobulin glycosylation and the lectin pathway of complement activation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 564: 27-43.
5. Fernandes D. **(2005)**. Demonstrating comparability of antibody glycosylation during biomanufacturing. *European Biopharmaceutical Review*, Summer 2005: 106-110.
6. R. Abès and J.L. Teillaud **(2010)**. Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG. *Pharmaceuticals*, 3: 146-157.
7. Ruhaak L. R. *et al* **(2009)**. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397: 3457-3481.
8. Royle L. *et al* **(2008)**. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Analytical biochemistry*, 376: 1–12
9. Huhn C. *et al* **(2009)**. IgG glycosylation analysis. *Proteomics*, 9: 882–913.
10. Melmer *et al* **(2010)**. HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398: 905-914.
11. Anumula K.R. **(2006)**. Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, 350:1-23
12. Harvey D.J *et al* **(2000)**. Composition of N-linked carbohydrates from ovalbumin and co-purified glycoproteins. *American Society of Mass Spectrometry*, 11:564-571.
13. Iwase H. and Hotta K. **(1977)**. Ovotransferrin subfractionation dependent upon carbohydrate chain differences. *The Journal of biological chemistry*, 252, No.15:5437-5443.
14. Montreuil, J., Vliegthart, J. F. G., and Schachter, H. **(1997)**. Glycoproteins II. Elsevier.

**www.agilent.com/chem/
bio-inert**

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2012
2012年3月1日, 中国出版
5990-9774CHCN



Agilent Technologies