

使用 Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC 技术进行高通量人血清和免疫球蛋白 G 的 N-糖组谱图分析，以实现生物标志物发现

作者

Yongjing Xie,
Leticia Martins Mota,
Michael Butler
National Institute for
Bioprocessing Research &
Training (NIBRT)
Ireland

YashoNandini Singh,
Bethan Morgan,
Aled Jones
安捷伦科技有限公司

摘要

蛋白质糖基化是一种依赖宿主细胞和翻译后蛋白质形成糖谱的细胞内过程。所得的糖谱可以随细胞环境的任意改变而发生改变。对人血浆或血清进行定量糖组谱图分析，可以获得有关糖基化水平和模式的生物学信息，这对找到疾病诊断生物标志物和药物靶点至关重要。本应用简报介绍了使用 InstantPC 试剂盒的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，96 ct (GX96-IPC) 对人血清和纯化免疫球蛋白 G (IgG) 组分进行高通量 N-糖组谱图分析。实际的反应步骤只要 10 分钟，仅需 1 μ L 人血清或 40 μ g IgG。这一工作流程使样品前处理具有高通量效率和重现性，从而实现高灵敏度的 N-糖组谱图分析，在疾病诊断生物标志物的发现方面具有巨大潜力。

前言

蛋白质糖基化存在于许多生物过程，如受体相互作用、免疫反应、蛋白质分泌和转运等。它还在癌症、神经退行性疾病、肝脏疾病、感染性疾病、炎症性疾病，以及其他眼、肾或关节炎相关疾病等一系列生理和病理过程中发挥关键作用^[1-3]。因此，疾病的发展通常与蛋白质糖基化的改变相关。对目标体液或组织进行定量糖组谱图分析，可以获得大量关于样品中糖基化水平和模式的生物学信息。

除了非糖基化白蛋白外，人血浆或血清中的大多数蛋白质都呈高度糖基化状态，因此，血浆和血清是潜在的多聚糖库，能够反映人体的生理和病理状态^[4,5]。免疫球蛋白 G (IgG) 是人血浆或血清中含量最丰富的糖蛋白，也是适应性免疫系统的主要组成部分^[6]。此外，最近的研究表明，各种病理过程与 IgG 糖基化模式的改变相关^[7-9]。然而，不断开发快速、灵敏的策略对于人血清糖蛋白或纯化 IgG 组分的 N-糖组谱图分析，以及潜在的疾病诊断生物标志物鉴定至关重要。

大多数常用的多聚糖前处理方法均使用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 或其他荧光染料，这些方法相对耗时耗力，且结果灵敏度低、重现性差^[10,11]。本应用简报提出了一种创新、简化的工作流程，用于从人血清和 IgG 中配制 N-糖样品，然后采用亲水相互作用液相色谱与荧光检测联用 (HILIC/FLD) 技术进行分析。整个样品前处理过程不超过 1 小时，仅需 1 μ L 人血清或 40 μ g IgG。所有样品均用 96 孔板形式，并已准备好接受自动化分析^[12]。此工作流程可实现高通量和可重现的样品前处理，用于高灵敏度的 N-糖组谱图分析，并被认为在疾病诊断生物标志物的发现方面具有巨大潜力。

实验部分

材料

使用 InstantPC 试剂盒的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，96 ct (GX96-IPC) 由三个模块组成，包括 Gly-X 去糖基化模块 (GX96-100)、Gly-X InstantPC 标记模块 (GX96-101) 和 Gly-X InstantPC 净化模块 (GX96-102)。Agilent AdvanceBio InstantPC 麦芽糊精分子量标准品 (GKPC-503)。人血清 (H4522-100ml) 购自 Sigma-Aldrich。如前所述，使用 AKTA Avant 系统 (GE Healthcare) 通过 Protein A 亲和色谱从人血清 (H4522-100ml) 中纯化 IgGs^[12]。HPLC 级乙腈购自 Sigma，所有前处理均使用 Milli-Q 水。所有常用化学品均购自 Sigma-Aldrich。

样品前处理去糖基化

根据使用 InstantPC 试剂盒的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理 (GX96-IPC) 的说明书，对人血清或 IgG 进行溶液中酶促去糖基化。

1. 用 50 mmol/L 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES) 缓冲液 (pH 8.0) 稀释人血清 (1 μ L) 或 IgG (40 μ g)，使最终体积为 20 μ L
2. 将 2 μ L Gly-X 变性剂加入 20 μ L 人血清或 IgG 溶液中，充分混合
3. 在 90 °C 下孵育 3 分钟，室温下静置 2 分钟
4. 加入 2 μ L N-糖酶工作溶液，充分混合。
5. 在 50 °C 下孵育 5 分钟

使用 InstantPC 进行荧光衍生化

6. 配制 InstantPC 染料溶液：将一小瓶 InstantPC 染料溶于 150 μ L 附带溶剂中，混合均匀
7. 在上述配制样品中加入 5 μ L InstantPC 染料溶液，并充分混合
8. 在 50 °C 下孵育 1 分钟

InstantPC 标记多聚糖的纯化

9. 向每个样品加入 150 μ L 上样/清洗溶液 (2.5% 甲酸/97.5% 乙腈)
10. 将全部样品 (179 μ L) 转移到 Gly-X 净化板的孔中，每孔含 400 μ L 上样/清洗溶液
11. 施加真空使溶液通过净化板后，用 600 μ L 上样/清洗溶液清洗样品 3 次

12. 用 100 μL Gly-X InstantPC 洗脱液 (160 mmol/L 甲酸铵/10% (v/v) 乙腈, pH 4.4) 洗脱 InstantPC 标记的 N-糖
13. 立即分析收集的 N-糖溶液, 无需进一步处理, 或储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 待后续分析

InstantPC 标记 N-糖的 HILIC/FLD 分析

使用配备 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (120 \AA , $2.1 \times 150\text{ mm}$, $2.7\text{ }\mu\text{m}$, 部件号 683775-913) 的 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统, 对由人血清或 IgG 中提取的 InstantPC 标记 N-糖进行 HILIC/FLD 谱图分析, 系统由 Agilent OpenLab ChemStation 软件控制。色谱系统包括四元溶剂泵、自动进样器和荧光检测器。对于 InstantPC, 将检测器的激发和发射波

长分别设为 285 和 345 nm。InstantPC 标记的多聚糖样品无需进一步处理, 直接以 $1\text{ }\mu\text{L}$ 的体积进样。以 50 mmol/L 甲酸铵 (pH 4.4) 作为溶剂 A, 乙腈作为溶剂 B 分离 N-糖。使用 50 mmol/L 甲酸铵 (pH 4.4) 和乙腈 (27/73, v/v) 平衡 HPLC 系统 1.5 分钟, 流速为 0.5 mL/min 。然后, 以 73%–62% 乙腈 (v/v) 的线性梯度进行分离, 分析运行时间为 35 分钟, 流速为 0.5 mL/min 。进样前将样品存放在 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 柱温设为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。系统使用 AdvanceBio InstantPC 麦芽糊精分子量标准品 (GKPC-503) 进行校准。将葡萄糖单元 (GU) 值和保留时间 T (分钟) 数据拟合为五阶多项式曲线, 得到标准曲线。

结果与讨论

用于快速多聚糖前处理的 AdvanceBio Gly-X 技术

如图 1 所示, 本研究采用使用 InstantPC 试剂盒的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理, 可在 96 孔板形式的创新工作流程中简化 N-糖样品前处理。该试剂盒可在 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行 3 分钟的糖蛋白变性, 然后在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行 5 分钟的去糖基化, 从而以有效方式从靶标糖蛋白中完全释放多聚糖。

此外, 随着 InstantPC 荧光标记 (普鲁卡因的一种活性形式) 的引入, 释放的糖胺中间体通过活化氨基甲酸酯的化学作用连接在 InstantPC 上, 形成稳定的脲键。这一创新的多聚糖前处理工作流程从糖蛋白前处理到多聚糖谱图分析仅 10 分钟即可完成, 且仅需 $1\text{ }\mu\text{L}$ 人血清或 $40\text{ }\mu\text{g}$ IgG。因此, 它确保了定量和定性糖组分析的完整性。

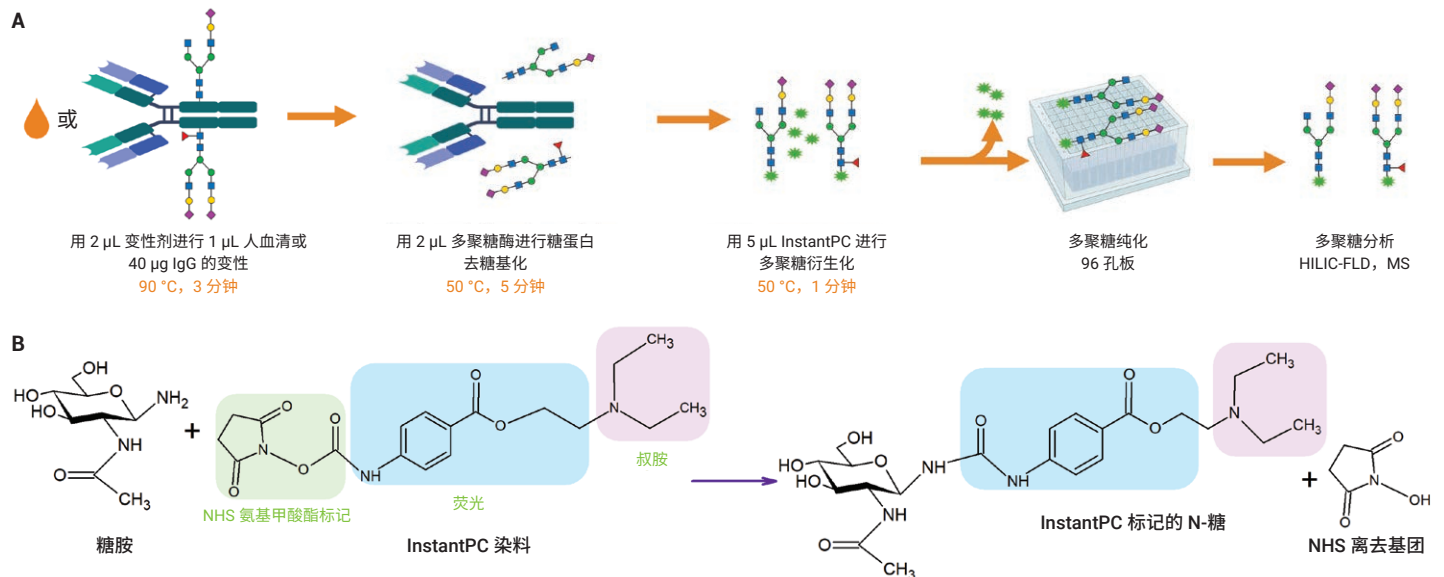


图 1. 用于糖胺释放和 InstantPC 衍生化的 Agilent AdvanceBio Gly-X 技术。(A) 从人血清或 IgG 释放糖胺、InstantPC 衍生化和纯化的工作流程。(B) 基于活化氨基甲酸酯化学作用的糖胺 InstantPC 标记。通过 ACD/ChemSketch 和 BioRender.com 绘制

使用 HILIC/FLD 进行人血清 IgG 中 InstantPC 标记多聚糖的谱图分析

人血清和 IgG 的 N-糖组谱图已得到广泛研究，因为它与疾病生物标志物的发现有关。在本应用简报中，使用 InstantPC 标记人血清和 IgG 释放的糖胺中间体，用于 HILIC/FLD 的定性和定量分析。在开发的色谱条件下（表 1），来自 IgG 和人血清的 InstantPC 标记 N-糖结果显示所有主要 N-糖类型的峰分离良好（图 2 和图 3）。开发的用于多聚糖谱图分析的 HILIC/FLD 方法显示出良好的重现性（数据未显示）。

如图 2 和表 2 所示，人血清 IgG 中含有多种 N-糖类型。这些 N-糖主要包含高岩藻糖多聚糖、唾液酸多聚糖、GlcNAc 二分支多聚糖、某些中性半乳糖及含 GlcNAc 的多聚糖。丰度最高的多聚糖是 FA2G1 (24.95%)，其次是 FA2 (18.36%)、FA2G2 (13.01%)、FA2G2S1 (11.13%)。

使用 HILIC/FLD 进行人血清中 InstantPC 标记多聚糖的谱图分析

图 3 和表 2 显示了典型的人血清 N-糖组谱图，A2G2S2 为主要的多聚糖峰，相对丰度占 41.90%。此外，还有三个主要的多聚糖峰，丰度相对较低，分别为 A3G3S3 (7.65%)、A2G2S1 (6.13%) 和 FA2G1 (5.35%)。其他多聚糖峰归属于相对丰度低于 5% 的多种 N-糖类型，包括岩藻糖多聚糖、唾液酸多聚糖、GlcNAc 二分支多聚糖、某些中性半乳糖及含 GlcNAc 的多聚糖。

表 1. 用于 InstantPC 标记 N-糖谱图分析的 HILIC/FLD 参数

参数	值			
仪器	Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统			
色谱柱	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 120 Å, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm (部件号 683775-913)			
柱温	60 °C			
流动相	A) 50 mmol/L 甲酸铵 (pH 4.4) B) 乙腈			
梯度程序	时间 (min)	A (%)	B (%)	流速 (mL/min)
	0	27	73	0.5
	1.5	27	73	0.5
	36.5	38	62	0.5
	45.0	47	53	0.5
	46	70	30	0.4
	47	27	73	0.25
	60	27	73	0.5
进样量	1 μL (相当于 0.01 μL 人血清或 0.4 μg IgG 中的多聚糖)			
检测	Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统 FLD λ _{激发} 285 nm, λ _{发射} 345 nm			

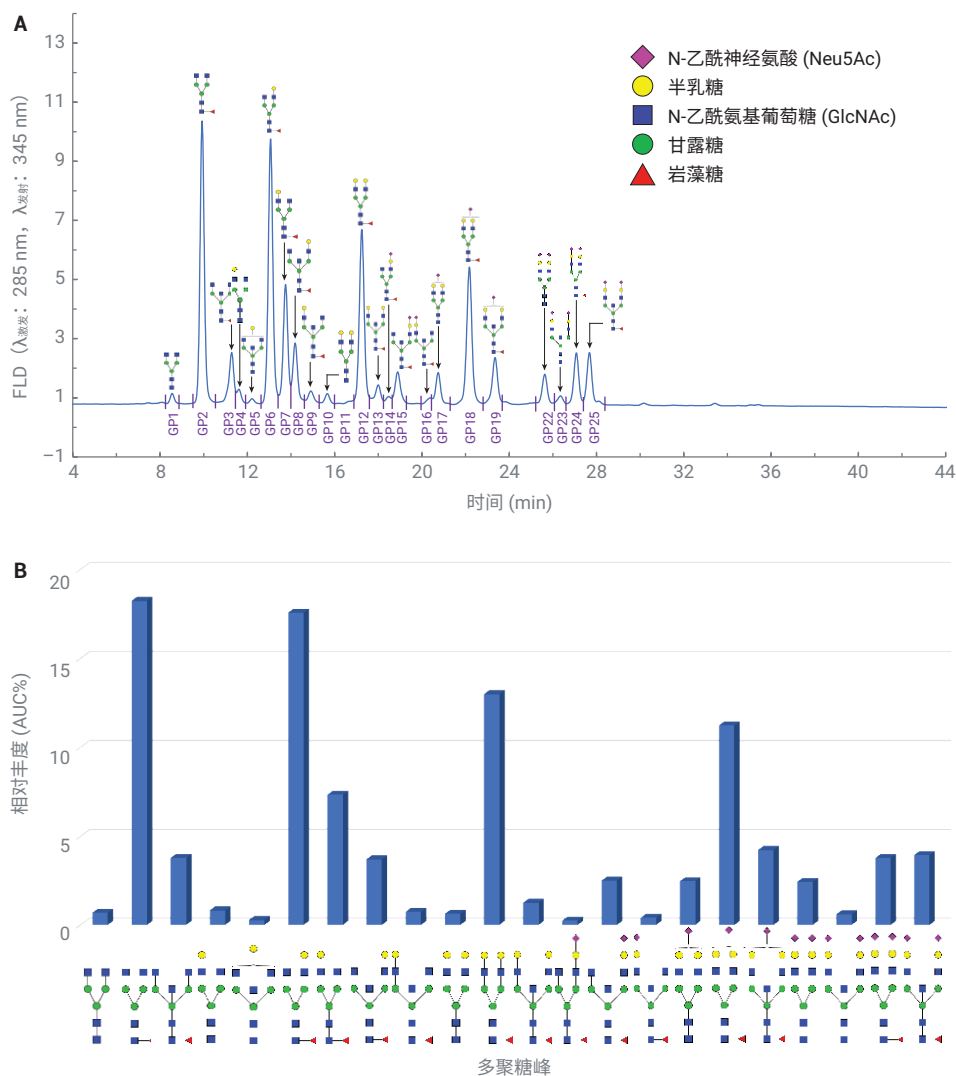


图 2. InstantPC 标记 IgG N-糖的 HILIC/FLD 色谱图 (A)，以及主要 N-糖类型的相对丰度 (B)。仅显示主要的多聚糖峰

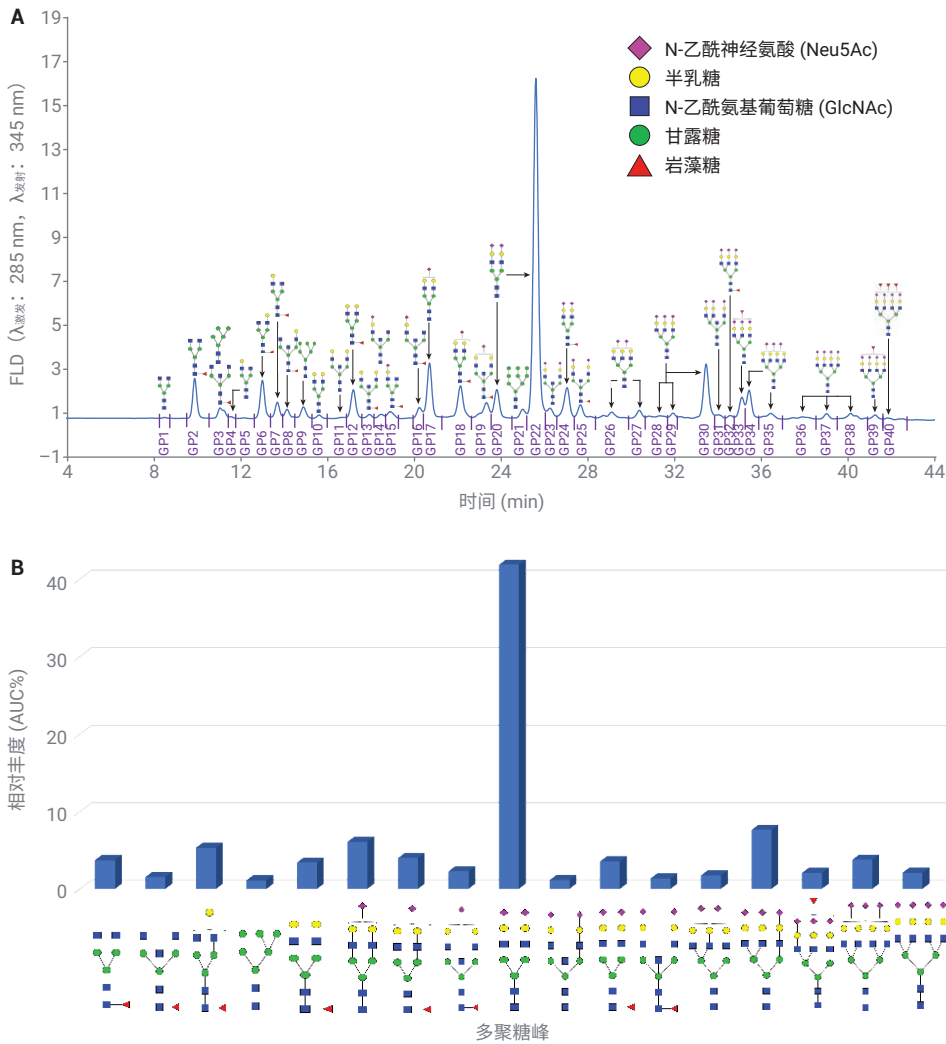
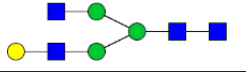
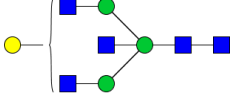
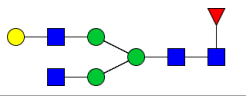
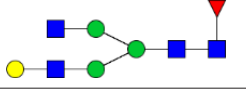
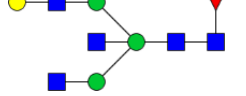
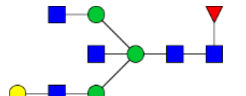
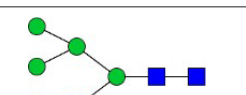
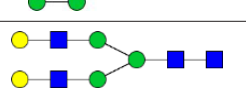
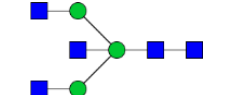
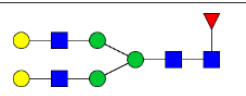
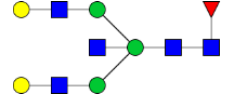
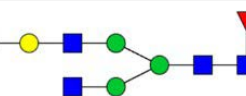
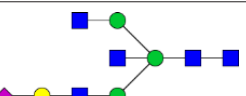
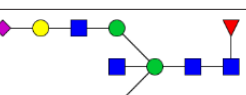

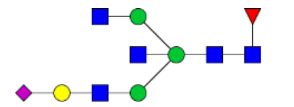
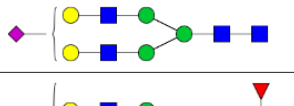
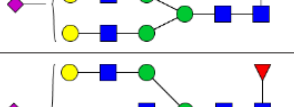
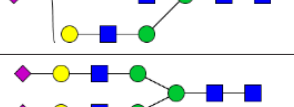

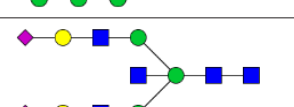

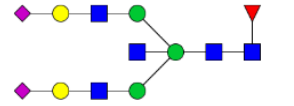
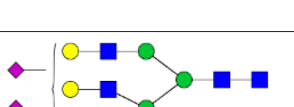
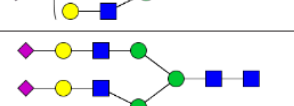
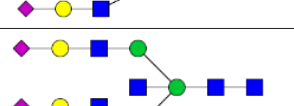
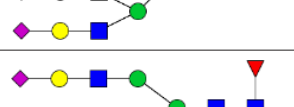




图 3. InstantPC 标记人血清 N-糖组的 HILIC/FLD 色谱图 (A), 以及主要 N-糖类型的相对丰度 (B)。仅显示主要的多聚糖峰

表 2. 用 InstantPC 标记的人血清和 IgG N-糖组的谱图分析

标记	Oxford 标记名称	GU	N-糖结构	IgG		人血清	
				AUC	AUC (%)	AUC	AUC (%)
GP1	A2	5.441		5.008	0.690	0.566	0.086
GP2	FA2	5.946		133.363	18.362	24.686	3.766
GP3	FA2B	6.368		28.313	3.898	10.262	1.565
	M5	6.368		-	-		

标记	Oxford 标记名称	GU	N-糖结构	IgG		人血清	
				AUC	AUC (%)	AUC	AUC (%)
GP4	A2[3]G1	6.501		6.169	0.849	0.793	0.121
GP5	A2BG1	6.690		2.128	0.293	0.356	0.054
GP6	FA2[6]G1	6.951		127.747	17.589	25.302	3.859
GP7	FA2[3]G1	7.159		53.461	7.361	9.759	1.488
GP8	FA2[6]BG1	7.291		26.905	3.705	5.334	0.813
GP9	FA2[3]BG1	7.510		5.401	0.744	7.613	1.161
	M6	7.510		-	-		
GP10	A2G2	7.729		4.616	0.636	2.182	0.333
GP11	A2BG2	7.973		-	-	0.200	0.031
GP12	FA2G2	8.196		94.452	13.005	22.588	3.446
GP13	FA2BG2	8.420		9.196	1.266	3.331	0.508
GP14	FA2[6]G1S1	8.570		1.833	0.252	3.541	0.540
	A2[3]BG1S1	8.570		-	-		
GP15	FA2[6]BG1S1	8.695		18.217	2.508	6.925	1.056
	FA2[3]G1S1	8.695		-	-		

标记	Oxford 标记名称	GU	N-糖结构	IgG		人血清	
				AUC	AUC (%)	AUC	AUC (%)
GP16	FA2[3]BG1S1	9.126		3.007	0.414	7.325	1.117
GP17	A2G2S1	9.252		17.917	2.467	40.173	6.128
GP18	FA2G2S1	9.692		80.837	11.130	26.382	4.024
GP19	FA2BG2S1	10.064		29.300	4.035	15.114	2.306
GP20	A2G2S2	10.217		-	-	274.665	41.898
GP22		10.773		17.728	2.441		
GP21	M9	10.588		-	-	6.234	0.951
GP23	AA2BG2S2	10.988		4.526	0.623	7.718	1.177
GP24	FA2G2S2	11.222		27.512	3.788	23.509	3.586
GP25	FA2BG2S2	11.410		28.651	3.945	9.084	1.386
GP26	A3G3S2	11.863		-	-	11.642	1.776
GP27	12.256						
GP28	A3G3S3	12.550		-	-	50.139	7.648
GP29		12.739					
GP30		13.218					
GP31	A3BG3S3	13.406		-	-	2.779	0.424
GP32	FA3G3S3	13.581		-	-	1.165	0.178
GP33	A3F1G3S3	13.760		-	-	13.765	2.100

标记	Oxford 标记名称	GU	N-糖结构	IgG		人血清	
				AUC	AUC (%)	AUC	AUC (%)
GP34	A4G4S3	13.873		-	-	24.941	3.805
GP35		14.220					
GP36	A4G4S4	14.770		-	-	13.857	2.113
GP37		15.232					
GP38		15.734					
GP39	A4F1G4S4	16.315		-	-	3.631	0.554

1. InstantPC 标记的麦芽糊精分子量标准品标准曲线: $GU = -0.0215 + 1.109T - 0.07722T^2 + 0.003524T^3 - 0.00007714T^4 + 0.0000006543T^5$

2. 每种 N-糖的相对丰度用以下等式计算: $FLR\ AUC(\%) = FLR\ AUC_{多聚糖} / \sum(FLR\ AUC_{多聚糖}) \times 100$

3. 通过平均两个不同测量值计算 GU、曲线下面积 (AUC) 和相对丰度 (AUC%)

4. 仅显示丰度最高的多聚糖峰

结论

蛋白质糖基化是一种翻译后的细胞内过程, 在疾病发展过程中可能会发生改变, 并导致糖谱发生变化。对人血清和 IgG 进行糖组谱图分析可以获得有关糖基化水平和模式的生物学信息, 这些信息最终可帮助找到用于揭示疾病进展的诊断

性生物标志物。本应用简报表明, 使用 InstantPC 试剂盒的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理可实现用于人血清和 IgG N-糖组谱图分析的高通量多聚糖前处理。反应步骤需要 10 分钟左右, 创新荧光染料 InstantPC 以“即时”方式标记糖胺中间体, 具有高荧光信号。此外, 使用

InstantPC 试剂盒的 Gly-X N-糖前处理仅需 1 μ L 人血清即可制备用于 HILIC 分离的标记 N-糖。用于多聚糖前处理的简化 96 孔板形式可靠而稳定。最后, 开发的 HILIC/FLD 方法将 InstantPC 标记的 N-糖从人血清和 IgG 中分离, 得到充分分离的峰。

参考文献

1. Reily, C. *et al.* Glycosylation in Health and Disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2019**, *15*, 346–366.
2. Ohtsubo, K.; Marth, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* **2006**, *126*, 855–67.
3. Varki, A.e. Essentials of Glycobiology.
4. Clerc, F. *et al.* Human Plasma Protein N-glycosylation. *Glycoconj. J.* **2016**, *33*, 309–43.
5. Anderson, N. L.; Anderson, N. G. The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. *Mol. Cell Proteomics* **2002**, *1*, 845–67.
6. Arnold, J. N. *et al.* The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25*, 21–50.
7. Gudelj, I.; Lauc, G.; Pezer, M. Immunoglobulin G Glycosylation in Aging and Diseases. *Cell Immunol.* **2018**, *333*, 65–79.
8. Quast, I. *et al.* Sialylation of IgG Fc Domain Impairs Complement-Dependent Cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 4160–70.
9. Zhong, A. *et al.* Diagnostic Significance of Serum IgG Galactosylation in CA19-9-Negative Pancreatic Carcinoma Patients. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 114.
10. Melmer, M. *et al.* HILIC Analysis of Fluorescence-Labeled N-Glycans from Recombinant Biopharmaceuticals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 905–14.
11. Ruhaak, L. R. *et al.* Glycan Labeling Strategies and Their Use in Identification and Quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 3457–81.
12. Xie, Y. *et al.* High-Throughput and High-Sensitivity N-Glycan Profiling: A Platform for Biopharmaceutical Development and Disease Biomarker Discovery. *Anal. Biochem.* **2021**, *623*, 114205.

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44495.55345606481

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2022
2022年1月24日，中国出版
5994-4349ZHCN