

使用 AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒和 LC/FLD/MS 分析生物治疗性糖蛋白的唾液酸



简化和标准化唾液酸分析

生物治疗性糖蛋白上多聚糖的组成会影响免疫原性、药代动力学和药效学^[1]。多聚糖是由单糖组成的碳水化合物，根据组成和键合位置的不同可排列成多种不同的寡糖结构。根据分子和应用的不同，末端唾液酸可能会降低清除率，降低抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 活性或具有抗炎作用。生物治疗药物中的两种常见唾液酸是 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 和 N-羟乙酰神经氨酸 (Neu5Gc)。Neu5Ac 通常为主要形态，而 Neu5Gc 不能由人类合成，它存在于生物治疗药物中使其可能具有免疫原性。因此，监测唾液酸的绝对含量以及治疗性糖蛋白中不同唾液酸种类的水平都至关重要。

Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒 (部件号 GS24-SAP) 提高了对唾液酸化水平较低的蛋白质的分析灵敏度，例如在 Fc 区域具有单个 N-糖基化位点的单克隆抗体。该试剂盒包含对唾液酸样品进行荧光标记所需的所有试剂，可在约 5 小时内完成前处理。配合 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱，可通过 LC/FLD 或 LC/MS 快速轻松地完成唾液酸的分析 and 定量。

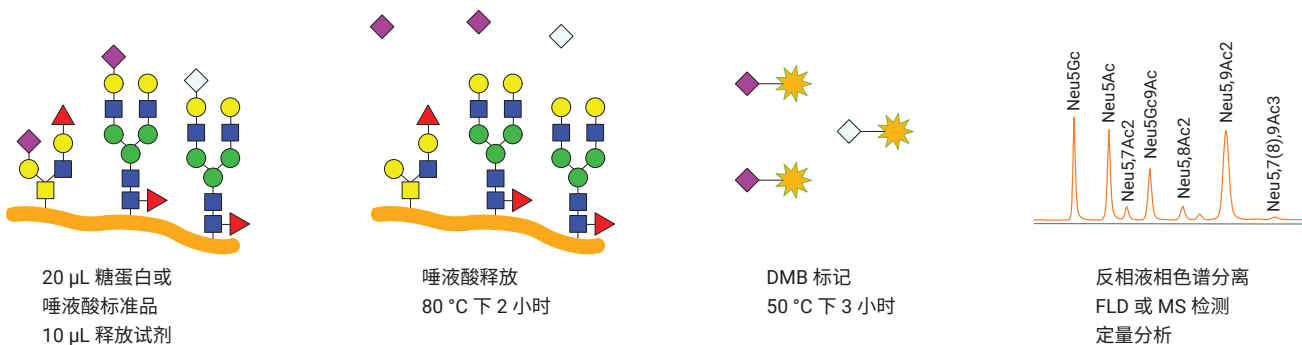


图 1. 唾液酸释放和 DMB 标记工作流程，然后使用 FLD 或 MS 进行分离和检测

安捷伦设计和制造的端到端唾液酸分析解决方案

在本指南中，您将找到进行唾液酸分析所需的消耗品。其中许多消耗品已用于评估利妥昔单抗（Rituxan，一种单克隆抗体或 mAb）、依那西普（恩利，一种 Fc 融合蛋白）、西妥昔单抗（爱必妥，一种单克隆抗体）和 NISTmAb 中存在的唾液酸^[2]。简化的工作流程提供了用于测定 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的绝对和相对含量的方法，涉及使用 LC/FLD 和 LC/MS 进行分析和定量。

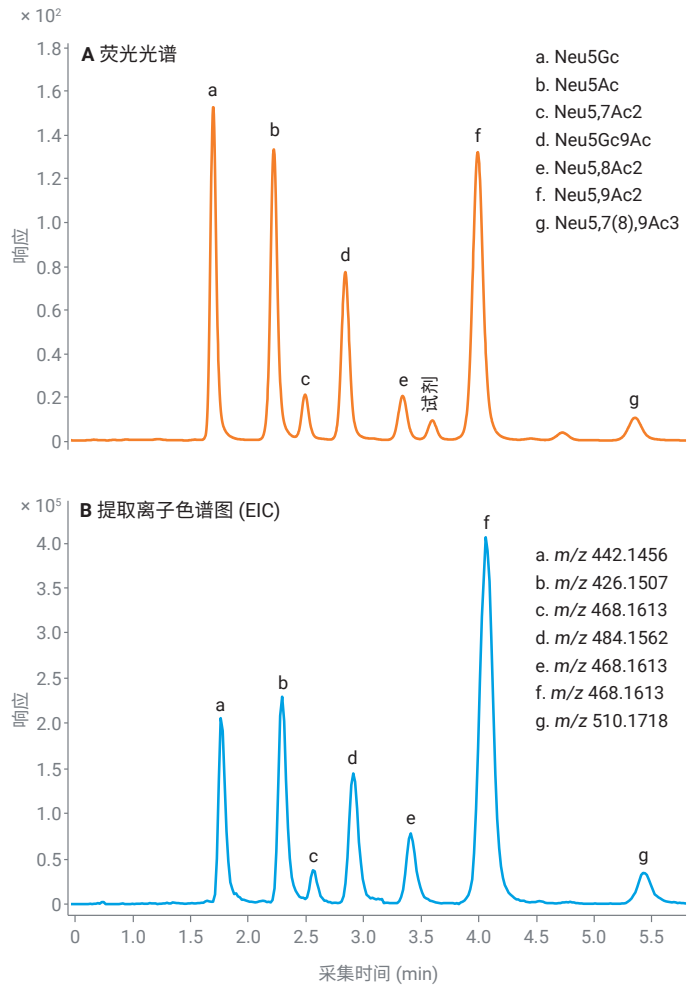
本 AdvanceBio 唾液酸分析工作流程指南提供了以下产品的订购信息：

- AdvanceBio 唾液酸分析与定量样品前处理试剂盒。该试剂盒包括释放和标记唾液酸所需的试剂，以及定性唾液酸参比组合和 NANA 和 NGNA 定量标准品
- 用于通过反相液相色谱 (RPLC) 分离多聚糖的液相色谱柱
- 溶剂和试剂
- 样品瓶和瓶盖

以下特性可帮助您提高唾液酸分析效率：

- 样品前处理仅需约 5 小时，然后便可进行 LC/FLD 或 LC/MS 分析
- 支持自动化的 96 孔板形式
- 不使用玻璃安瓿瓶，均为螺口盖容器
- 进样前无需样品干燥
- 使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱，只需 10 分钟即可通过 RPLC 分离唾液酸
- 应用广泛的 1,2-二氨基-4,5-亚甲基二氧基苯 (DMB) 染料

随附的唾液酸参比组合中所含唾液酸的 LC/FLD 和 LC/MS (EIC) 数据示例。如需了解 LC 和 MS 参数等更多信息以及生物治疗药物中唾液酸分析示例，请参见参考文献 2。



| | 平均相对峰面积 (%) | 标准偏差 | %CV |
|----------|-------------|------|-------|
| G0F-N | 0.75 | 0.01 | 1.55 |
| G0 | 1.47 | 0.02 | 1.18 |
| G0F | 46.82 | 0.07 | 0.15 |
| Man5 | 1.21 | 0.01 | 0.83 |
| G1[6] | 0.75 | 0.02 | 2.67 |
| G1F[6] | 31.21 | 0.11 | 0.35 |
| G1F[3] | 9.27 | 0.05 | 0.54 |
| G2F | 7.04 | 0.04 | 0.51 |
| G2FS1[6] | 0.67 | 0.02 | 2.29 |
| G2FS1[3] | 0.37 | 0.06 | 15.98 |
| G2FS2 | 0.45 | 0.03 | 6.67 |

图 2. DMB 标记 SARP 的 UHPLC 色谱图。DMB 标记的唾液酸参比组合的 (A) 荧光分析谱图和 (B) 提取离子色谱图 [M+H]¹⁺

表 1. Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD 条件

| 参数 | 值 | | | | |
|-------|--|-----|-----|-------------|-----|
| 仪器 | Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统 | | | | |
| 色谱柱 | Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 75 mm, 2.7 μm (部件号 697775-902) | | | | |
| 柱温 | 30 °C | | | | |
| 流动相 | A) 甲醇:乙腈:水 (4:8:88) B) 乙腈 | | | | |
| 梯度程序 | 时间 (min) | %A | %B | 流速 (mL/min) | |
| | 0.00 | 100 | 0 | 0.4 | 等度 |
| | 6.00 | 100 | 0 | 0.4 | 洗脱 |
| | 6.25 | 20 | 80 | 0.4 | |
| | 7.30 | 20 | 80 | 0.4 | 清洗 |
| | 7.50 | 100 | 0 | 0.4 | 再平衡 |
| 10.00 | 100 | 0 | 0.4 | | |
| 进样量 | 10 μL | | | | |
| 检测 | Agilent 1250 Infinity II FLD λ _{EX} 373 nm, λ _{EM} 448 nm | | | | |

表 2. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 参数

| 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF | |
|----------------------------|--------------|
| 离子源 | 双 AJS ESI |
| 气体温度 | 350 °C |
| 干燥气流速 | 11 L/min |
| 雾化器 | 15 psi |
| 鞘气温度 | 400 °C |
| 鞘气流速 | 12 L/min |
| 毛细管电压 | 1400 V |
| 喷嘴电压 | 1800 V |
| 碎裂电压 | 120 V |
| 锥孔电压 | 65 V |
| 质量数范围 (MS) | m/z 400–1000 |
| 质量数范围 (MS/MS) | m/z 100–500 |
| 采集模式 | 高分辨率 (4 GHz) |

AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒入门指南^[3]

唾液酸样品注意事项

- 本试剂盒适用的样品包括糖蛋白、糖肽、糖脂、聚唾液酸、血清、血浆、组织或全细胞
- 本方法的动态范围为 1–2000 pmol 唾液酸/孔。为确保信号处于有效范围内，可能需要调整样品浓度
- 可以干燥样品并在使用前用少量去离子水复溶来提高浓度。样品可以直接在分析孔中干燥，也可以在单独的试管中进行处理

孵育硬件

在使用 AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒 (GS24-SAP) 进行样品前处理时，在唾液酸释放步骤中将样品加热至 80 °C，并在 50 °C 下用 DMB 进行标记。如需在提供的 96 孔板中加热样品，我们建议使用热循环仪或两个单独的干式加热器模块。推荐的部件如下。

| 孵育硬件 (非安捷伦产品) | 部件号 |
|---------------------------------|-----------|
| 温度可设置为 50 °C 和 80 °C 的 96 孔热循环仪 | 不定 |
| 干式加热器模块，4 个模块 (2 个) (Troemner) | HB4DG |
| 模块化加热模块 (2 个) (VWR) | 13259-260 |

数据分析与报告

使用 Agilent OpenLab CDS 2.3 和 MassHunter 定性分析软件 10.0 进行数据分析。通过校准曲线对 Neu5Gc 和 Neu5Ac 定量。

注：安捷伦现在为 MassHunter 11 提供符合 21 CFR Part 11 法规要求的 OpenLab ECM XT 数据分析软件。

参考文献

1. Antibody Glycosylation and its impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *J. Pharm.Sci.* 2015, 104(6), 1866–1884
2. 用于生物治疗药物中唾液酸分析与定量的改进工作流程, [5994-2352ZHCN](#), 2020
3. Agilent AdvanceBio Sialic Acid Profiling and Quantitation Kit, User Manual (Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒用户手册), [5994-2800EN](#)

轻松挑选和订购信息

要从安捷伦网上商城订购下表中列出的商品，请通过单击标题中的“我的列表”链接将商品添加至您的“收藏产品”列表中。然后输入您需要的产品数量，添加至购物车并继续结算。您的列表便会保留在“收藏产品”下，供您将来订购时使用。

如果这是您首次使用“收藏产品”，系统会要求您输入电子邮件地址进行账户验证。如果您已有安捷伦账户，可以直接登录。但是，如果您尚未注册安捷伦账户，则需要注册账户。该功能仅在启用了电子商务功能的地区有效。您也可以单击各物品的部件号，或通过客户服务中心或经销商渠道订购所有物品。

“我的列表”中的 AdvanceBio 唾液酸分析与定量消耗品

| 描述 | 部件号 |
|--|------------|
| 样品前处理 | |
| AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒, 24 ct | GS24-SAP |
| 色谱柱 | |
| InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 75 mm, 2.7 μm, 窄径 | 697775-902 |
| InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 5 mm, 2.7 μm, 保护柱, 3/包 | 821725-911 |
| 标准品 | |
| 牛胎球蛋白, 热处理 (0.4 mg) [†] * | WS0021 |
| Agilent NISTmAb, 1 × 25 μL | 5191-5744 |
| Agilent NISTmAb, 4 × 25 μL | 5191-5745 |
| 样品瓶、瓶盖和试剂 | |
| 样品瓶, 螺口, 2 mL, 聚丙烯, 经认证可用于 PFAS 相关应用, 100/包 [‡] | 5191-8150 |
| 样品瓶内插管, 300 μL, 聚丙烯, 带聚合物支脚, 100/包 [‡] | 5182-0549 |
| 9 mm 螺口透明聚丙烯瓶盖 (100/包) [‡] | 5191-8151 |
| InfinityLab 超纯 LC/MS 乙腈 (1 L) | 5191-4496 |
| InfinityLab 超纯 LC/MS 水 (1 L) | 5191-4498 |
| InfinityLab 超纯 LC/MS 甲醇 (1 L) | 5190-6896 |

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

DE44509.431087963

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, 2021
2021 年 12 月 04 日, 中国出版
5994-4201ZHCN

其他备件

| 描述 | 部件号 |
|---|------------|
| “我的列表”中的微孔板封膜机可选部件[†]* | |
| 微孔板可撕铝膜 | 24210-001 |
| 滤板, 96 孔, 聚丙烯, 带 0.45 μm 聚偏氟乙烯膜, 300 μL/孔, 50/包 | 200981-100 |
| “我的列表”中的色谱柱接头 | |
| Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接接头 (用于色谱柱入口连接) | 5067-5965 |
| Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接毛细管, MP35N, 0.12 × 105 mm (用于 Quick Connect 快速连接接头) | 5500-1578 |
| Agilent InfinityLab Quick Turn 接头 (用于色谱柱出口连接) | 5067-5966 |
| Quick Turn 毛细管, MP35N, 0.12 × 280 mm (用于 Quick Turn 接头) | 5500-1596 |
| 用于 Quick Turn 接头的安装工具 | 5043-0915 |
| “我的列表”中的溶剂过滤备件^{**} | |
| InfinityLab 溶剂过滤组件 | 5191-6776 |
| InfinityLab 溶剂过滤烧瓶, 玻璃, 2 L | 5191-6781 |
| 尼龙滤膜, 47 mm, 孔径 0.2 μm, 100/包 | 5191-4341 |
| 再生纤维素滤膜, 47 mm, 孔径 0.2 μm, 100/包 | 5191-4340 |
| 溶剂瓶玻璃过滤器, 溶剂入口, 20 μm | 5041-2168 |
| “我的列表”中的溶剂处理备件 | |
| InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖起始工具包 | 5043-1222 |
| InfinityLab 溶剂瓶, 透明, 1 L | 9301-6524 |
| InfinityLab 溶剂瓶, 棕色, 1 L | 9301-6526 |
| 溶剂瓶, 透明, 2 L | 9301-6342 |
| 溶剂瓶, 棕色, 2 L | 9301-6341 |
| InfinityLab Stay Safe 吹扫瓶 | 5043-1339 |
| InfinityLab 废液瓶, GL45, 6 L, 带 Stay Safe 安全盖 (不包括活性炭过滤器 5043-1193) | 5043-1221 |
| 带时间标签的 InfinityLab 活性炭过滤器, 58 g (适用于 5043-1221) | 5043-1193 |

[†] 不支持在线购买。请联系当地安捷伦客户服务中心了解订购信息

* [点击此处](#) 了解有关 Agilent PlateLoc 微孔板热封膜机的更多信息

** 使用本表中未列出的溶剂时, 请在分析前使用 InfinityLab 溶剂过滤组件

[‡] 安捷伦建议 2 mL 聚丙烯样品瓶使用 250 μL 样品瓶内插管, 以尽可能减少死体积