

AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 시료 전처리 및 LC/FLD/MS를 사용한 바이오약품 당단백질의 N-글리칸 분석

간소화 되고, 표준화 되어있는 N-글리칸 분석

N-연결 글리칸의 구조와 위치는 치료용 단백질의 약리학에서 매우 중요한 역할을 담당하며 면역원성, 약물동태학 및 약력학에 잠재적인 영향을 끼칩니다.

2-AB(2-aminobenzamide)는 20년 이상 N-글리칸 데이터 생성에 사용되어온 잘 정립된 표지입니다. Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express는 고성능 N-글리칸 시료 전처리 플랫폼¹으로, 5분간의 용액 탈당화 단계 후 고체상 매트릭스에서 2-AB를 표지하는 간소화된 워크플로를 이용합니다. 잉여의 염료는 아세토니트릴로 씻어내고 시료 건조 없이 탈이온수로 표지된 시료를 용리합니다. 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피(HILIC)용 AdvanceBio Amide HILIC 컬럼을 사용하여 상대 정량을 수행하는 경우, 2시간 이내에 UHPLC/FLD/MS 분석을 위한 시료 준비를 완료할 수 있습니다. 또한 광범위한 2-AB 표지 N-글리칸 표준물질을 사용해 N-글리칸 분리를 교정하고 N-글리칸 종을 식별할 수 있습니다.



그림 1. LC/FLD/MS와 Gly-X 2-AB Express 시료 전처리를 사용한 유리 N-글리칸 분석 워크플로

애질런트가 설계하고 생산하는 엔드 투 엔드 N-글리칸 분석 워크플로 솔루션


이 안내서에서는 2-AB N-글리칸 시료 전처리 및 분석을 시작하기 위해 필요한 소모품에 대해 확인할 수 있습니다. 리툭시맙(Rituxan, 단일클론 항체 또는 mAb) 및 에타너셉트(Enbrel, Fc 융합 단백질)에서 N-글리칸을 분석하는 데 여러 소모품들이 사용되었으며, 이를 통해 시료 전처리, 분리 및 데이터 해석을 포함한 전체 워크플로를 제시한 바 있습니다.²

본 Gly-X 2-AB Express N-글리칸 분석 워크플로 안내서는 다음의 소모품에 대한 주문 정보를 포함하고 있습니다.

- 시료 전처리 키트 - AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 기술을 사용하여 2시간 내에 시료를 전처리하고 분석을 준비할 수 있습니다
- 2-AB 표지 N-글리칸 표준물질 - 특성 규명이 잘 되어 있는 이러한 개별 표준물질과 라이브러리 바이오횰약품의 안전성과 효능에 영향을 미칠 수 있는 N-글리칸 종 프로파일링에서 핵심적인 역할을 합니다
- HILIC를 사용한 글리칸 분리용 액체 크로마토그래피 컬럼
- 용매 및 시약
- 바이알 및 캡
- 희석할 준비가 된 농축 이동상

생산성을 높여주는 단계들:

- 5분간의 PNGase F 분해(50°C에서)로 무편향 N-글리칸 유리를 제공합니다
- 2-AB Express 표지 과정은 글리칸이 세척 매트릭스에 고정되어 있는 동안 수행되어 건조 필요성을 없애고 전체 시료 전처리 시간을 줄입니다
- 잘 정립된 2-AB 표지 염료를 사용하여 진행 중인 프로젝트 데이터의 연속성을 보장합니다
- 유연한 사용을 위해 모듈식 키트로 되어 있습니다



40µg 당단백질
3분간 변성
5분간 N-Glycanase 분해
유리 글리칸
60분간 2-AB Express 표지 (건조 불필요)
표지된 글리칸
96웰 세척 플레이트
UHPLC, MS/MS
데이터 분석

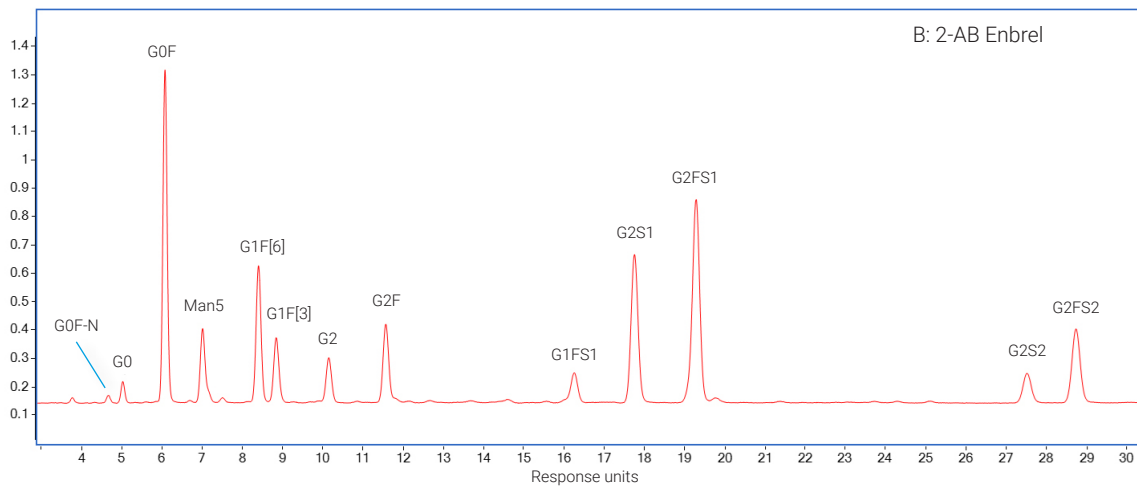
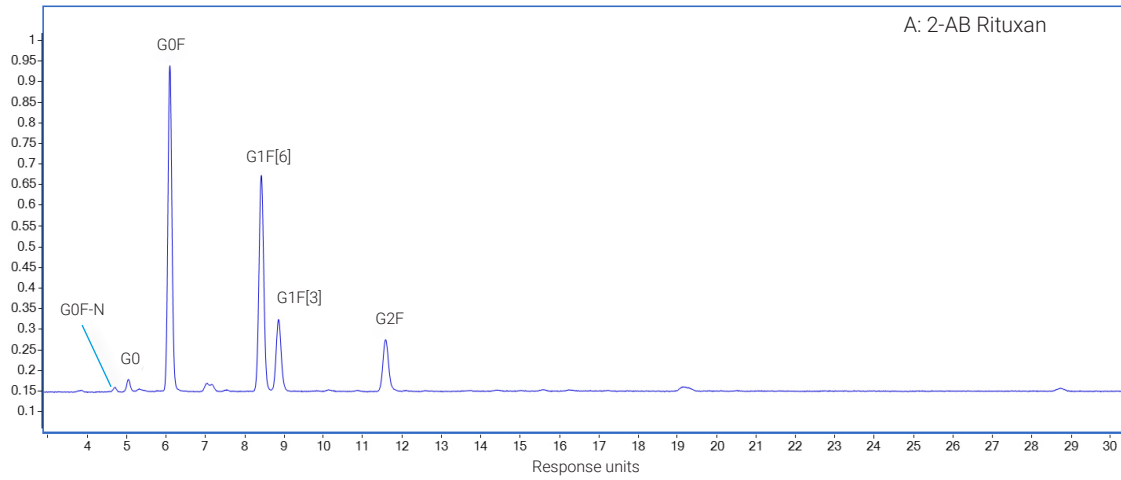


그림 2. HILIC-UHPLC 형광 프로파일, 2-AB로 표지된 N-글리칸, (A) Rituxan (B) Enbrel. 표 1과 2에는 N-글리칸의 상대 면적 백분율이 나타나 있습니다. n = 4. 표3과 4는 각각 UHPLC 및 Q-TOF의 파라미터입니다

표 1. 2-AB 표지 Rituxan N-글리칸에 대한 상대 면적 %, SD 및 %CV 값(n = 4).

	평균 상대 % 면적	표준편차	%CV
G0F-N	0.523	0.030	5.715
G0	1.423	0.041	2.891
G0F	42.780	0.052	0.122
G1F[6]	33.760	0.077	0.229
G1F[3]	11.853	0.040	0.340
G2F	9.660	0.140	1.447

표 2. 2-AB 표지 Enbrel N-글리칸에 대한 상대 면적 %, SD 및 %CV 값(n = 4).

	평균 상대 % 면적	표준편차	%CV
G0F-N	0.428	0.005	1.170
G0	1.155	0.006	0.500
G0F	19.783	0.026	0.133
Man5	5.225	0.034	0.654
G1F[6]	9.468	0.029	0.303
G1F[3]	4.663	0.056	1.193
G2	3.280	0.008	0.249
G2F	6.223	0.019	0.304
G1FS1	3.083	0.039	1.253
G2S1	14.400	0.029	0.204
G2FS1	20.523	0.039	0.188
G2S2	3.415	0.053	1.540
G2FS2	8.350	0.014	0.169

표 3. 2-AB 표지 N-글리칸을 위한 Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD 조건.

파라미터	값		
컬럼	Agilent AdvanceBio Amide HILIC, 2.1 × 150mm, 1.8µm (품번 859750-913)		
컬럼 온도	60°C		
이동상	A) 50mM 포름산 암모늄, pH 4.4 B) 아세트니트릴		
그라디언트 프로그램	시간(분)	%B	유속(mL/분)
	0	74	0.6
	50	54	0.6
	51	40	0.6
	52	40	0.6
	54	74	0.6
64	74	0.6	
주입량	1µL		
형광 검출	Agilent 1260 Infinity II FLD 2-AB: λEx 260nm, λEm 430nm		

Gly-X 2-AB Express 사용하기: 최적의 결과를 위한 팁

당단백질 시료 전처리 시 고려 사항

당단백질 시료는 계면활성제가 없는 저염의 중성 완충액 내에서 최대 2mg/mL의 농도로 준비해야 합니다. 이보다 높은 농도의 시료는 물 또는 50mM의 HEPES, pH 7.9로 희석해야 합니다.

- 최고 농도: 2mg/mL
- 반응당 단백질 최대량: 40µg(예: 각 2mg/mL 용액의 20µL). mAb의 경우 더 많은 단백질(최대 100 µg)을 사용할 수 있지만, 40µg 이상을 로드할 경우에는 데이터 직선성 평가가 필요합니다
- 완충액: 계면활성제가 없는 저염(약 150mM) 중성 완충액. 시료는 물 또는 50mM의 HEPES, pH 7.9로 희석할 수 있습니다
- 시료의 염 농도가 150 mM보다 높을 경우 **Agilent AdvanceBio 스피ن 컬럼**이나 10kDa 컷오프 필터를 사용하여 염을 제거하는 것이 좋습니다

인큐베이션 및 세척 하드웨어

Gly-X 2-AB Express 시료 전처리 워크플로 동안 시료는 단백질 변성을 위해 90°C, PNGase F 분해를 위해 50°C, 2-AB 표지를 위해 65°C로 가열됩니다. 제공된 96웰 플레이트 내에서 시료를 가열할 때에는 아래의 제안 사항에 따라 Thermocycler 또는 드라이 블록 히터를 사용하는 것이 좋습니다.

표 4. 2-AB 표지 N-글리칸을 위한 Agilent 6545XT Q-TOF 파라미터.

Agilent 6545XT Q-TOF	
소스	Dual AJS ESI
가스 온도	150°C
건조 가스 유속	9L/분
Nebulizer	35psi
Sheath 가스 온도	300°C
Sheath 가스 유속	10L/분
Vcap	2,500V
노출 전압	500V
Fragmentor	120V
Skimmer	65V
질량 범위	m/z 300-3,000
스캔 속도	1스펙트럼/초
수집 모드	확장된 측정 범위(2GHz)

해당 워크플로에는 단순한 진공 세척이 사용됩니다. 이 표에 제시된 모델 외에 이와 동등한 히터, 진공 매니폴드 또는 펌프를 사용하려는 경우, 검증이 필요할 수 있습니다. 추가적인 지원이 필요하신 경우 애질런트에 문의해 주세요.

가열 및 진공 하드웨어(타사)	부품 번호
96웰 Thermocycler(Corning)	THERM-1001, 110V THERM-1000, 230V
컴팩트 디지털 드라이 수조/블록 히터 (Thermo Fisher Scientific)	88871001
진공 매니폴드(Millipore)	MSVMHTS00
진공 펌프(Millipore)	WP6211560, 110V WP6122050, 220V

최적의 HILIC 수행 방법

- HILIC 분리에는 1µL(수용액) 표지 글리칸의 소량 주입 부피가 가장 편리합니다. 1µL를 초과하는 수용액 주입 부피는 피크 모양과 분리능을 손상시킬 수 있습니다. 1µL 초과하는 주입 부피에서 유기 용매를 이용한 시료 희석에 대한 안내는 Gly-X 2-AB 사용자 설명서를 확인해 주세요²
- Agilent AdvanceBio 포름산 암모늄 이동상 농축액(품번 G3912-00000)을 사용하여 pH 4.4의 50mM 포름산 암모늄 1L를 제조할 수 있습니다
- 사용자는 무효 부피 최소화를 위해 HPLC 시스템을 최적화해야 합니다. 최적의 컬럼 수명은 최고 압력의 80%까지만 사용할 때 유지될 수 있습니다
- 일반적인 작동 온도는 60°C입니다. 이보다 높은 온도에서도 작동은 가능하나, 컬럼 수명이 줄어들 수 있습니다

글리칸 표준물질

애질런트는 유리 글리칸 분석에 사용되는 LC/FLD/MS 시스템을 교정할 수 있도록 2-AB로 표지된 광범위한 유리 N-글리칸 표준물질 및 라이브러리를 제공합니다.³ 글리칸 표준물질은 글리칸 이성질체 및 동시용리 피크 식별을 위해 반드시 필요합니다. 잠재적인 동시용리 글리칸에는 G0F/Man5, Man5/G1, G1FS1/G2F 등이 포함됩니다.

데이터 분석 및 보고

개별 화합물 데이터베이스와 함께 Agilent MassHunter BioConfirm 정성 분석 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석했습니다.

참고: 애질런트는 현재 21 CFR Part 11을 준수하는 OpenLab ECM XT 데이터 분석 소프트웨어가 포함된 MassHunter 11을 제공합니다.

글리칸 피크 할당 도구(GPAT)

AdvanceBio Amide HILIC 컬럼 사용자를 위해 광범위한 InstantPC 및 2-AB 표지 글리칸에 대한 N-글리칸 머무름 시간을 예측하도록 설계된 무료 웹 기반 소프트웨어 도구가 제공됩니다. 자세한 내용은 응용 자료 [5994-7477EN](#)을 참조하세요. 해당 도구 이용하기: [글리칸 피크 할당 도구](#)

간편한 선택 및 주문 정보

애질런트 온라인 스토어에서 다음 표에 있는 부품을 주문하려면 헤더의 MyList 링크를 클릭하여 "내 즐겨찾기" 목록에 해당 부품을 추가하세요. 그런 다음 필요한 제품 수량을 기입하고 장바구니에 추가하면 결제를 진행할 수 있습니다. 향후 주문에 사용할 수 있도록 목록은 내 즐겨찾기에 저장되어 있습니다.

즐거찾기를 처음 사용하는 경우 계정 확인을 위해 이메일 주소를 입력하라는 메시지가 표시됩니다. 애질런트 계정이 있는 경우 바로 로그인할 수 있습니다. 등록된 애질런트 계정이 없는 경우 등록해 주세요. 이 기능은 전자상거래가 가능한 지역에서만 유효합니다. 모든 부품은 온라인에서 각각의 부품 번호를 클릭하여 주문할 수 있으며, 영업 담당자 및 대리점 채널을 통해서도 주문 가능합니다.

MyList 1 Gly-X 2-AB Express N-글리칸 시료 전처리, AdvanceBio Amid HILIC 컬럼, 용매 및 시료 용기.

설명	부품 번호
N-글리칸 시료 전처리	
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express kit, 96-ct	GX96-2AB
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express kit, 24-ct	GX24-2AB*
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express starter pack	GX400
AdvanceBio Gly-X deglycosylation and 2-AB Express labeling module set, 24-ct	GX24-401AB*
컬럼, 피팅 및 커넥터	
AdvanceBio Amide HILIC, 2.1 x 150mm, 1.8µm	859750-913
Agilent InfinityLab Quick Connect Fitting (column inlet)	5067-5965
Agilent InfinityLab Quick Turn Fitting (column outlet)	5067-5966
용매 및 시약	
InfinityLab ultrapure LC/MS acetonitrile, 1L	5191-4496
InfinityLab ultrapure LC/MS standard, water, 1L	5191-4498
AdvanceBio Ammonium Formate Mobile Phase concentrate, 10 mL	G3912-00000
MS solution, formic acid, 10mL	US-700002341
용매 여과 관련 공급품**	
InfinityLab solvent filtration assembly	5191-6776
InfinityLab solvent filtration flask, glass, 2L	5191-6781
Filter membrane, nylon 47mm, 0.2µm, 100/pk	5191-4341
Filter membrane, regenerated cellulose 47mm, 0.2µm, 100/pk	5191-4340
Solvent bottle glass filter, solvent inlet, 20µm	5041-2168
용매 관리 공급품	
InfinityLab Stay Safe cap starter kit	5043-1222
InfinityLab solvent bottle, clear, 1L	9301-6524
InfinityLab solvent bottle, amber, 1L	9301-6526
Solvent bottle, clear, 2L	9301-6342
Solvent bottle, amber, 2L	9301-6341
InfinityLab Stay Safe purging bottle	5043-1339
InfinityLab waste can, GL45, 6L with Stay Safe cap [§]	5043-1221
InfinityLab charcoal filter with time strip, 58g [§]	5043-1193
바이알 및 캡[†]	
Vial, screw style, 2mL, polypropylene, 100/pk [‡]	5191-8150
Vial insert, 300µL, polypropylene, polymer feet, 100/pk [‡]	5182-0549
9 mm, screw style clear polypropylene cap, 100/pk	5191-8151

* 24-ct 키트(GX24-2AB)는 96웰 세척 플레이트와 24-ct 2-AB 표지 모듈을 포함하고 있습니다. 세척 모듈은 실온에서 보관하고 Gly-X 2-AB Express Deglycosylation 및 표지 모듈 세트(GX24-401AB) 24-ct 리필을 주문하세요.

** 이 표에 포함된 것 이외의 용매를 사용하는 경우 분석 전에 InfinityLab 용매 여과 어셈블리를 사용하세요.

† 2-AB 표지 글리칸은 96웰 플레이트에 용리됩니다. 사용자는 플레이트를 그대로 LC에 직접 올리거나, 시료 바이알로 옮겨 시료를 주입할 수 있습니다.

‡ 무료 부피 최소화를 위해 250µL 바이알 인서트와 2mL 폴리프로필렌 바이알을 함께 사용하는 것을 권장합니다.

§ Charcoal 필터는 폐기물 캔에 포함되어 있지 않습니다. 5043-1221 및 5043-1193을 함께 주문하세요.

MyList 2 Gly-X 2-AB Express N-글리칸 시료 전처리 키트 및 모듈 추가 구성.

설명	부품 번호
AdvanceBio Gly-X deglycosylation module, 96-ct	GX96-100
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express labeling module, 96-ct	GX96-401
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express cleanup module, 96-ct	GB96-402
AdvanceBio Gly-X deglycosylation module, 24-ct	GX24-100
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express labeling module, 24-ct	GX24-401
AdvanceBio Gly-X deglycosylation and 2-AB Express labeling module set, 96-ct	GX96-401AB

글리칸 표준물질

애질런트 표지 N-글리칸 표준물질의 전체 목록은 글리칸 표준물질 참조 안내서를 확인해 주세요.³

MyList 3 리톡시맵과 에타너셉트에 나타나는 글리칸용 2-AB 표지 N-글리칸 표준물질.² 해당 표준물질은 N-글리칸 분리의 대조군 및 동시용리 피크 식별에 사용할 수 있습니다.

설명	CFG 구조	부품 번호
G0F-N / F(6)A1		GKSB-402
G0 / A2		GKSB-301
G0F / FA2		GKSB-302
Man5 / M5		GKSB-103
G1 / A2G1		GKSB-317
G1F / FA2G1		GKSB-316
G2F / FA2G2		GKSB-305
G2 / A2G2		GKSB-304*

* 에타너셉트 전용 GKSB-304 2AB 표지 N-글리칸 표준물질. 리톡시맵에서는 발생하지 않음.

MyList 4 추가적인 2-AB 표지 복합형 비변성(native) N-글리칸 표준물질.

설명	CFG 구조	부품 번호
G0-N		GKSB-401
G0FB		GKSB-303
G2FB		GKSB-306
G2S1 alpha(2,6)		GKSB-311
G2FS1 alpha(2,6)		GKSB-315
G2S2 alpha(2,6)		GKSB-312
G2FS2 alpha(2,6)		GKSB-313
G2F w/2 alpha-gal		GKSB-318
A3		GKSB-307
G3		GKSB-308
G3S3 alpha(2,6)		GKSB-314
A4		GKSB-309
G4		GKSB-310

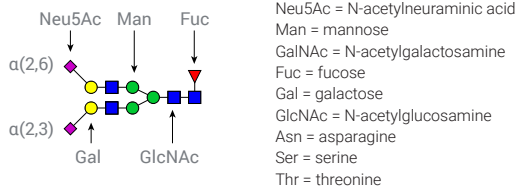


그림 3. 글리칸 카툰은 Consortium for Functional Glycomics (CFG)⁵의 권장사항을 따르며 GlycoWorkbench 2.14.10을 사용하여 도안했습니다

MyList 5 AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 표지 고 만노오스 N-글리칸 표준물질.

설명	CFG 구조	부품 번호
Man5 / M5		GKSB-103
Man6 / M6		GKSB-104
Man7 / M7		GKSB-105
Man8 / M8		GKSB-106
Man9 / M9		GKSB-107

MyList 6 2-AB 표지 비변성 N-글리칸 코어 및 하이브리드.

설명	CFG 구조	부품 번호
하이브리드		GKSB-111
NN		GKSB-100
Man3		GKSB-101
Man3F		GKSB-102

MyList 7 시알산화 당단백질 연구를 위한 2-AB 표지 bi-, tri- 및 tetraantennary N-글리칸 라이브러리. 글리칸 구조는 분석 인증서에 나와 있습니다.

설명	부품 번호
AdvanceBio 2-AB Biantennary and high Manose partitioned library	GKSB-520
AdvanceBio 2-AB $\alpha(2,3)$ Sialylated biantennary N-glycan library	GKSB-232
AdvanceBio 2-AB $\alpha(2,6)$ Sialylated biantennary N-glycan library	GKSB-262
AdvanceBio 2-AB $\alpha(2,3)$ Sialylated triantennary N-glycan library	GKSB-233
AdvanceBio 2-AB $\alpha(2,6)$ Sialylated triantennary N-glycan library	GKSB-263
AdvanceBio 2-AB $\alpha(2,3)$ Sialylated tetraantennary N-glycan library	GKSB-234
AdvanceBio 2-AB $\alpha(2,6)$ Sialylated tetraantennary N-glycan library	GKSB-264

MyList 8 2-AB 표지 N-글리칸 라이브러리 및 대조군 당단백질. 글리칸 구조는 분석 인증서에 나와 있습니다.

설명	부품 번호
AdvanceBio 2-AB Human IgG N-glycan library – 정상 인간 IgG의 N-글리칸과 일치하는 복합 biantennary oligosaccharide로 구성	GKSB-005
AdvanceBio 2-AB Human α-1-acid glycoprotein N-glycan library – 다양한 정도의 시알산화(NeuAc)와 일부 외부 팔 푸코스 잔기 및 락토사민 반복이 있는 코어 비-푸코실화 bi-, tri- 및 tetraantennary 글리칸의 이종 혼합물로 구성되어 있으며, 인간 α 1-acid 당단백질에 대해 이전에 보고된 N-글리칸과 일치함	GKSB-001
AdvanceBio 2-AB Bovine Fetuin N-glycan library – 소 페투인에 대해 이전에 보고된 N-글리칸과 일치하는 시알산화 N-연결 글리칸(코어 비-푸코실화)의 혼합물로 구성	GKSB-002
AdvanceBio 2-AB Glucose homopolymer standard	GKSB-503
Agilent-NISTmAb*, 25 μ L	5191-5744
Agilent-NISTmAb*, 4 x 25 μ L	5191-5745

MyList 9 AdvanceBio Amide HILIC 컬럼.

설명	부품 번호
1.8 μ m, 최대 압력 1200bar, 최대 온도 80°C	
AdvanceBio Amide HILIC 300Å, 2.1 x 150mm, 1.8 μ m	859750-913
AdvanceBio Amide HILIC 300Å, 2.1 x 100mm, 1.8 μ m	858750-913

참고 문헌

1. N-글리칸 분석: 함께하면 커지는 힘. 애질런트 브로셔 5994-1647KO.
2. Analysis of labeled Glycans User Manual 5994-1231EN, pg 14.
3. AdvanceBio 글리칸 표준물질 Instant PC, 2-AB, 2-AA, APTS, InstantAB, InstantQ, 비표지 5994-2202KO.
4. Varki A, et al. *Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans*. Glycobiology. 2015 Dec; 25(12): 1323-1324.
5. N-글리칸 유리 및 표지를 위한 빠른 2-AB 시료 전처리 워크플로 개발 5994-0945KO.
6. Glycan Peak Assignment Tool (GPAT) Novel glucose unit-based software enabling more accurate peak assignments for InstantPC and 2-AB N-glycan HILIC/FLD analysis using the AdvanceBio Amide HILIC column and mobile phase. 5994-7477EN
7. A Quick and Efficient Sample Cleanup for Biomolecule Analysis. 5994-7239EN

Agilent CrossLab: 성공을 위한 지원

CrossLab은 서비스와 소모품을 통합하여 워크플로 성공을 지원하고 생산성을 개선하며 운영 효율성을 향상시키는 애질런트 솔루션입니다. 애질런트는 모든 작업에 가치있는 정보를 제공하여 고객의 목표 달성을 지원합니다. 애질런트는 분석법 최적화와 교육부터 전체 실험실 재배치 및 운영 분석에 이르기까지 다양한 제품과 서비스를 제공하여 기기 및 실험실 관리에서 고객이 최상의 성과를 얻도록 도와줍니다.

www.agilent.com/crosslab에서 CrossLab에 대해 자세히 알아보세요.

추가 정보:

www.agilent.com/chem/glycoscience

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

국가별 애질런트 고객 센터 찾기:

www.agilent.com/chem/contactus

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

DE32022026

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 8월 7일, 한국에서 인쇄
5994-4158KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com