

# 使用 AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 样品前处理和 LC/FLD/MS 对生物治疗性糖蛋白进行 N-糖分析

## 简化和标准化的 N-糖分析

N-糖的位点和结构在治疗性蛋白质的药理学中发挥着重要作用，可能会影响免疫原性、药代动力学和药效学。

2-AB (2-氨基苯甲酰胺) 是一种历史悠久的 N-糖分析标记物，用于获得 N-糖数据已有 20 多年的历史。Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 是一款高效的 N-糖样品前处理平台<sup>[1]</sup>，工作流程简单，先完成 5 分钟的溶液内去糖基化步骤，然后在固态基质上进行 2-AB 标记。用乙醇洗去多余染料后，无需干燥，即可用去离子水洗脱经过标记的样品。在 2 小时或更短的时间内即可处理好样品，以备 UHPLC/FLD/MS 分析，使用 AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱进行亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 分离，然后进行相对定量。此外，还提供各种 2-AB 标记的 N-糖标准品，用于校准 N-糖分离并帮助鉴定 N-糖类型。



图 1. 使用 Gly-X 2-AB Express 样品前处理与 LC/FLD/MS 的游离 N-糖分析工作流程

## 安捷伦设计和制造的端到端 N-糖分析工作流程解决方案

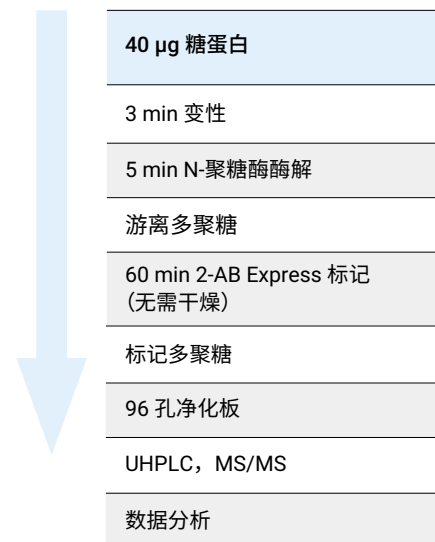
在本指南中，您将找到使用 2-AB 开始 N-糖样品前处理和分析所需的消耗品。其中许多已用于分析利妥昔单抗（Rituxan，一种单克隆抗体或 mAb）和依那西普（恩利，一种 Fc 融合蛋白）上的 N-糖，展示了包括样品前处理、分离和数据解析在内的整个工作流程<sup>[2]</sup>。

本 Gly-X 2-AB Express N-糖分析工作流程指南包括以下订购信息：

- 样品前处理试剂盒 — 使用 AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 技术，在 2 小时内即可完成样品前处理，以备后续分析
- 2-AB 标记的 N-糖标准品 — 特征明确的糖型单标和文库对于 N-糖类型的分析至关重要，这些 N-糖可能影响生物治疗药物的安全性和有效性
- 用于通过 HILIC 分离多聚糖的液相色谱柱
- 溶剂和试剂
- 样品瓶和瓶盖
- 可供稀释的浓缩流动相

### 提高效率的步骤：

- 在 50 °C 下进行 5 分钟 PNGase F 酶解，可提供无偏差 N-糖释放
- 先将多聚糖固定在净化基质上，然后进行 2-AB Express 标记，可省去干燥步骤，缩短样品前处理总时长
- 使用已有的 2-AB 标记染料可确保正在进行的项目的数据连续性
- 模块化试剂盒，使用灵活



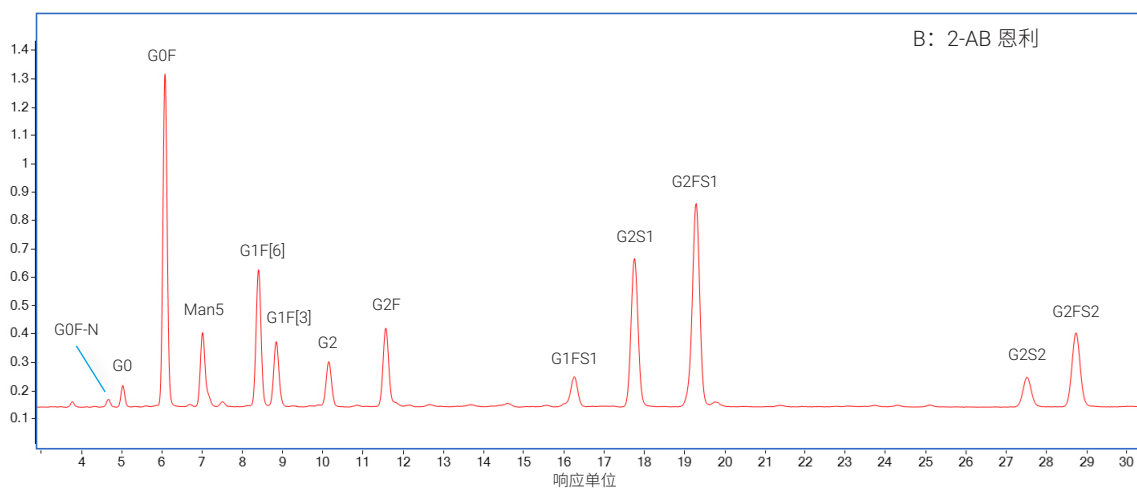
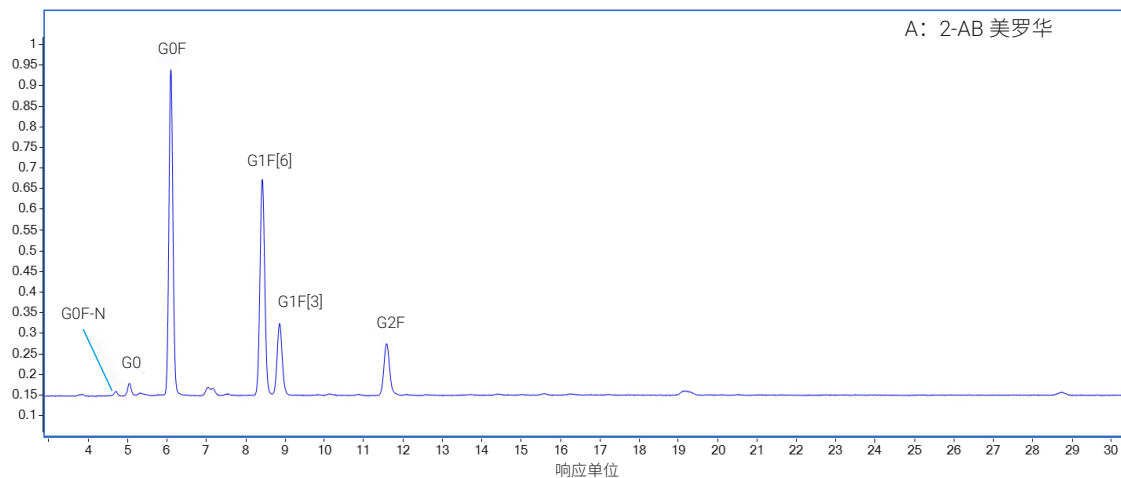


图 2. 用 2-AB 标记的 (A) 美罗华和 (B) 恩利 N-糖 HILIC-UHPLC 荧光谱图。N-糖相对面积百分比如表 1 和表 2 所示, n = 4。UHPLC 条件和 Q-TOF 参数列于表 3 和表 4 中

表 1. 用 2-AB 标记的美罗华 N-糖的相对峰面积百分比、SD 和 %CV, n = 4

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%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

表 2. 用 2-AB 标记的恩利 N-糖的相对峰面积百分比、SD 和 %CV, n = 4

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%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

**表 3.** 用于 2-AB 标记的 N-糖分析的 Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD 条件

参数	值		
色谱柱	Agilent AdvanceBio Amide HILIC, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859750-913)		
柱温	60 °C		
流动相	A) 50 mM 甲酸铵, pH 4.4 B) 乙腈		
梯度程序	时间 (min)	%B	流速 (mL/min)
	0	74	0.6
	50	54	0.6
	51	40	0.6
	52	40	0.6
	54	74	0.6
64	74	0.6	
进样量	1 μL		
荧光检测	Agilent 1260 Infinity II FLD 2-AB: λ激发 260 nm, λ发射 430 nm		

## Gly-X 2-AB Express 入门: 获得出色结果的窍门

### 糖蛋白样品前处理的注意事项

应用不含去垢剂的低盐中性缓冲液，配制最大浓度为 2 mg/mL 的糖蛋白样品。应用水或 50 mM HEPES (pH 7.9) 稀释浓度较高的样品。

- 最大浓度：2 mg/mL
- 每次反应的最大蛋白质含量：40 μg（例如，各 2 mg/mL 溶液 20 μL）。mAbs 可使用更高含量的蛋白质（最高达 100 μg），但当载样量大于 40 μg 时应应对数据线性进行评估
- 缓冲液：不含去垢剂的低浓度盐（约 150 mM）中性缓冲液。可用水或 50 mM HEPES (pH 7.9) 稀释样品
- 当样品盐浓度高于 150 mM 时，推荐使用 [Agilent AdvanceBio 离心色谱柱](#) 或 10 kDa 的截止过滤器进行脱盐

### 孵育和净化硬件

在 Gly-X 2-AB Express 样品前处理工作流程中，需将样品加热至 90 °C 进行蛋白质变性，50 °C 进行 PNGase F 酶解，65 °C 进行 2-AB 标记。我们推荐使用下方建议的热循环仪或干式加热器模块来加热 96 孔板中的样品。

**表 4.** 用于 2-AB 标记的 N-糖分析的 Agilent 6545XT Q-TOF 参数

Agilent 6545XT Q-TOF	
离子源	双 AJS ESI
气体温度	150 °C
干燥气流速	9 L/min
雾化器	35 psi
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	10 L/min
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	120 V
截取锥	65 V
质量数范围	m/z 300–3000
扫描速率	1 质谱图/秒
采集模式	扩展动态范围 (2 GHz)

本工作流程采用一种简单的真空净化。如果未使用表中的建议型号，而是使用其他同等的加热装置、真空装置或者泵，需先进行验证。如需更多帮助，请联系安捷伦。

加热和真空硬件（非安捷伦）	部件号
96 孔热循环仪 (Corning)	THERM-1001, 110 V THERM-1000, 230 V
紧凑型数字干式金属浴/加热器模块 (赛默飞世尔科技)	88871001
真空装置 (Millipore)	MSVMHTS00
真空泵 (Millipore)	WP6211560, 110 V WP6122050, 220 V

### HILIC 最佳实践

- 小体积进样量（1 μL，水溶液）的标记多聚糖最适合 HILIC 分离。水溶液进样量大于 1 μL 将影响峰形和分离度。有关使用有机溶剂稀释样品以实现大于 1 μL 的进样量的说明，请参阅 Gly-X 2-AB 用户手册<sup>[2]</sup>
- Agilent AdvanceBio 甲酸铵流动相浓缩液（部件号 G3912-00000）可用于配制 1 L 50 mM 甲酸铵溶液，pH 4.4
- 用户应优化其 HPLC 系统以尽可能减小死体积。仅在不超过最大压力的 80% 的条件下运行时，可实现更长的色谱柱使用寿命
- 典型操作温度为 60 °C。可使用更高的温度，但是将缩短色谱柱寿命

## 多聚糖标准品

安捷伦提供 2-AB 标记的各种游离 N-糖标准品和文库，用于校准进行游离多聚糖分析的 LC/FLD/MS 系统<sup>[3]</sup>。多聚糖标准品对于鉴定多聚糖异构体和共洗脱峰至关重要。潜在的共洗脱物包括 G0F/Man5、Man5/G1、G1FS1/G2F。

## 数据分析与报告

使用 Agilent MassHunter BioConfirm 定性分析软件和个人化合物数据库进行数据分析。

**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。

## 多聚糖峰归属工具 (GPAT)

为 AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱用户提供基于网页的免费软件工具，用于预测各种 InstantPC 和 2-AB 标记多聚糖的 N-糖保留时间。如需了解更多信息，请参见应用简报 [5994-7477EN](#)。可单击此处访问此工具：[多聚糖峰归属工具](#)。

## 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，将产品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 1** Gly-X 2-AB Express N-糖样品前处理、AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱、溶剂和样品容器。

说明	部件号
<b>N-糖样品前处理</b>	
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 试剂盒, 96-ct	<a href="#">GX96-2AB</a>
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 试剂盒, 24-ct	<a href="#">GX24-2AB*</a>
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 启始工具包	<a href="#">GX400</a>
AdvanceBio Gly-X 去糖基化和 2-AB Express 标记模块组, 24-ct	<a href="#">GX24-401AB*</a>
<b>色谱柱、接头和转接头</b>	
AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm	<a href="#">859750-913</a>
Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接接头 (色谱柱入口)	<a href="#">5067-5965</a>
Agilent InfinityLab Quick Turn 接头 (色谱柱出口)	<a href="#">5067-5966</a>
<b>溶剂和试剂</b>	
InfinityLab 超纯 LC/MS 乙腈, 1 L	<a href="#">5191-4496</a>
InfinityLab 超纯 LC/MS 级水, 1 L	<a href="#">5191-4498</a>
AdvanceBio 甲酸铵流动相浓缩液, 10 mL	<a href="#">G3912-00000</a>
MS 溶液, 甲酸, 10 mL	<a href="#">US-700002341</a>
<b>溶剂过滤备件**</b>	
InfinityLab 溶剂过滤组件	<a href="#">5191-6776</a>
InfinityLab 溶剂过滤烧瓶, 玻璃, 2 L	<a href="#">5191-6781</a>
尼龙滤膜, 47 mm, 0.2 μm, 100/包	<a href="#">5191-4341</a>
再生纤维素滤膜, 47 mm, 0.2 μm, 100/包	<a href="#">5191-4340</a>
溶剂瓶玻璃过滤器, 溶剂入口, 20 μm	<a href="#">5041-2168</a>
<b>溶剂处理备件</b>	
InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖启始工具包	<a href="#">5043-1222</a>
InfinityLab 溶剂瓶, 透明, 1 L	<a href="#">9301-6524</a>
InfinityLab 溶剂瓶, 棕色, 1 L	<a href="#">9301-6526</a>
溶剂瓶, 透明, 2 L	<a href="#">9301-6342</a>
溶剂瓶, 棕色, 2 L	<a href="#">9301-6341</a>
InfinityLab Stay Safe 吹扫瓶	<a href="#">5043-1339</a>
InfinityLab 废液瓶, GL45, 6 L, 带 Stay Safe 安全盖 <sup>§</sup>	<a href="#">5043-1221</a>
InfinityLab 活性炭过滤器, 带时间标签, 58 g <sup>§</sup>	<a href="#">5043-1193</a>
<b>样品瓶和瓶盖<sup>†</sup></b>	
样品瓶, 螺口, 2 mL, 聚丙烯, 100/包 <sup>‡</sup>	<a href="#">5191-8150</a>
样品瓶内插管, 300 μL, 聚丙烯, 带聚合物支脚, 100/包 <sup>‡</sup>	<a href="#">5182-0549</a>
9 mm 螺口透明聚丙烯瓶盖, 100/包	<a href="#">5191-8151</a>

\* 24 ct 试剂盒 (GX24-2AB) 包含一块 96 孔净化板以及 24-ct 2-AB 标记模块。将净化模块储存于室温下，并订购 24 ct 重新填充的 Gly-X 2-AB Express 去糖基化和标记模块组 (GX24-401AB)

\*\* 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

† 将 2-AB 标记的多聚糖洗脱到 96 孔板中。用户可以将样品从板上直接注入 LC，也可转移至样品瓶中

‡ 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

§ 废液瓶不包含活性炭过滤器，请同时订购 5043-1221 和 5043-1193

**我的列表 2** Gly-X 2-AB Express N-糖样品前处理试剂盒和模块的更多配置。

说明	部件号
AdvanceBio Gly-X 去糖基化模块, 96 ct	GX96-100
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 标记模块, 96-ct	GX96-401
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 净化模块, 96-ct	GB96-402
AdvanceBio Gly-X 去糖基化模块, 24 ct	GX24-100
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 标记模块, 24-ct	GX24-401
AdvanceBio Gly-X 去糖基化和 2-AB Express 标记模块组, 96-ct	GX96-401AB

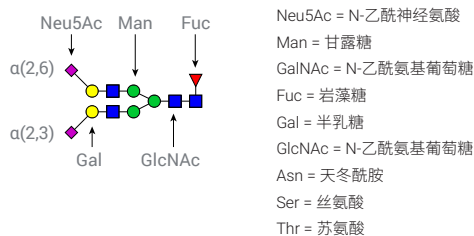
### 多聚糖标准品

有关安捷伦标记的 N-糖标准品的完整列表, 请参见安捷伦多聚糖标准品技术宣传单页<sup>[3]</sup>。

**我的列表 3** 用于分析利妥昔单抗和依那西普中多聚糖的 2-AB 标记的 N-糖标准品<sup>[2]</sup>。这些标准品可用作 N-糖分离的对照品并区分共洗脱峰。

说明	CFG 结构	部件号
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*

\* GKSB-304 2AB 标记的 N-糖标准品仅用于分析依那西普。请勿用于利妥昔单抗。



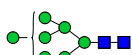
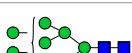
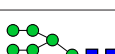


**图 3.** 多聚糖结构动画遵循功能性糖组学协会 (CFG) 的建议<sup>[5]</sup>, 并使用 GlycoWorkbench 2.14.10 绘制





**我的列表 4** 其他 2-AB 标记的复合型天然 N-糖标准品。

说明	CFG 结构	部件号
G0-N		GKSB-401
G0FB		GKSB-303
G2FB		GKSB-306
G2S1 α(2,6)		GKSB-311
G2FS1 α(2,6)		GKSB-315
G2S2 α(2,6)		GKSB-312
G2FS2 α(2,6)		GKSB-313
G2F w/2 α-gal		GKSB-318
A3		GKSB-307
G3		GKSB-308
G3S3 α(2,6)		GKSB-314
A4		GKSB-309
G4		GKSB-310

**我的列表 5** AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 标记的高甘露糖 N-糖标准品。

说明	CFG 结构	部件号
Man5/M5		GKSB-103
Man6/M6		GKSB-104
Man7/M7		GKSB-105
Man8/M8		GKSB-106
Man9/M9		GKSB-107

**我的列表 6** 2-AB 标记的天然 N-糖核心和杂合型。

说明	CFG 结构	部件号
杂合型		GKSB-111
NN		GKSB-100
Man3		GKSB-101
Man3F		GKSB-102

**我的列表 7** 用于研究唾液酸化糖蛋白的 2-AB 标记的二天线型、三天线型和四天线型 N-糖文库。多聚糖结构见分析证书。

说明	部件号
AdvanceBio 2-AB 二天线型与高甘露糖分区文库	GKSB-520
AdvanceBio 2-AB $\alpha(2,3)$ 唾液酸化二天线型 N-糖文库	GKSB-232
AdvanceBio 2-AB $\alpha(2,6)$ 唾液酸化二天线型 N-糖文库	GKSB-262
AdvanceBio 2-AB $\alpha(2,3)$ 唾液酸化三天线型 N-糖文库	GKSB-233
AdvanceBio 2-AB $\alpha(2,6)$ 唾液酸化三天线型 N-糖文库	GKSB-263
AdvanceBio 2-AB $\alpha(2,3)$ 唾液酸化四天线型 N-糖文库	GKSB-234
AdvanceBio 2-AB $\alpha(2,6)$ 唾液酸化四天线型 N-糖文库	GKSB-264

**我的列表 8** 2-AB 标记的 N-糖文库和对照糖蛋白。多聚糖结构见分析证书。

说明	部件号
AdvanceBio 2-AB 人 IgG N-糖文库 — 由与正常人 IgG 上的 N-糖一致的复杂二天线型寡糖组成	GKSB-005
AdvanceBio 2-AB 人 $\alpha$ -1-酸糖蛋白 N-糖文库 — 由核未岩藻糖基化的二、三和四天线型多聚糖的异质混合物组成，这些多聚糖的唾液酸化 (NeuAc) 程度不同，部分还具有外臂岩藻糖残基和乳糖胺重复基团，与先前报道的人 $\alpha$ 1-酸糖蛋白的 N-糖相一致	GKSB-001
AdvanceBio 2-AB 牛胎球蛋白 N-糖文库 — 由唾液酸化的 N-糖（核未岩藻糖基化）混合物组成，与先前报道的牛胎球蛋白 N-糖一致	GKSB-002
AdvanceBio 2-AB 葡萄糖均聚物标准品	GKSB-503
Agilent-NISTmAb*, 25 $\mu$ L	5191-5744
Agilent-NISTmAb*, 4 $\times$ 25 $\mu$ L	5191-5745

**我的列表 9** AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱。

说明	部件号
1.8 $\mu$ m, 最大压力 1200 bar, 最高温度 80 $^{\circ}$ C	
AdvanceBio 酰胺 HILIC 300 $\text{\AA}$ , 2.1 $\times$ 150 mm, 1.8 $\mu$ m	859750-913
AdvanceBio 酰胺 HILIC 300 $\text{\AA}$ , 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 $\mu$ m	858750-913

## 参考文献

1. N-糖分析：更胜一筹的组合，安捷伦产品样本 5994-1647ZHCN
2. 标记多聚糖的分析，用户手册 5994-1231ZHCN，第 14 页
3. AdvanceBio 多聚糖标准品 Instant PC、2-AB、2-AA、APTS、InstantAB、InstantQ 和未标记的标准品 5994-2202ZHCN
4. Varki A, et al. *Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans*. *Glycobiology*. 2015 Dec; 25(12): 1323-1324.
5. 开发用于 N-糖释放和标记的快速 2-AB 样品前处理工作流程 5994-0945ZHCN
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 (多聚糖峰归属工具 (GPAT): 基于葡萄糖单元的新型软件，可使用 AdvanceBio 酰胺 HILIC 柱和流动相对 InstantPC 和 2-AB N-糖 HILIC/FLD 分析实现更准确的峰归属)。5994-7477EN
7. A Quick and Efficient Sample Cleanup for Biomolecule Analysis (用于生物分子分析的快速高效的样品纯化)。5994-7239EN

## Agilent CrossLab：助力客户成功

CrossLab 代表了安捷伦集服务和消耗品于一体的独特解决方案，以支持客户获得工作流程的成功、提高生产力和运营效率。我们在每一次互动中为您提供深刻见解，助您实现业务目标。我们提供从方法优化和培训到实验室整体移机和操作分析的一系列产品和服务，帮助您管理仪器和实验室，确保实现理想性能。

如需了解有关 CrossLab 的更多信息，请访问 [www.agilent.com/crosslab](http://www.agilent.com/crosslab)

了解更多信息：

[www.agilent.com/chem/glycoscience](http://www.agilent.com/chem/glycoscience)

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

DE32022026

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。