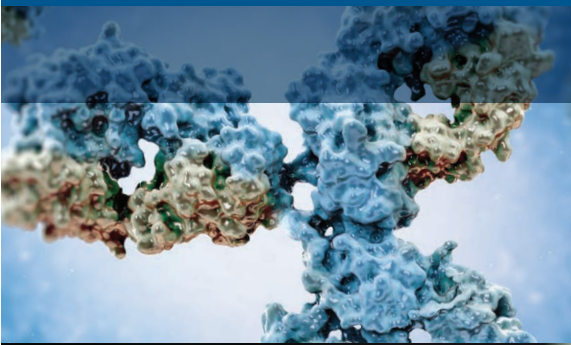


N-糖分析： 更胜一筹的组合

安捷伦和 ProZyme 样品前处理工作流程





将糖蛋白分析性能提升到前所未有的水平

N-糖的结构可影响单克隆抗体 (mAbs) 和 Fc 融合蛋白等治疗性蛋白质的免疫原性、药代动力学和药效学。因此，N-糖表征对生物治疗开发过程至关重要^[1,2]。

常见的 N-糖表征方法包括酶促游离多聚糖的标记，以实现荧光检测 (FLD) 并增强质谱 (MS) 的电离。这些标记的多聚糖由液相色谱 (LC) 或毛细管电泳色谱 (CE) 进行分离，并借助 FLD 进行相对定量分析，利用 MS 检测进行质量测定。亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 是标记 N-糖最常用的分离技术。

用于 N-糖样品前处理和分析的端到端工作流程

整合了 ProZyme 糖分析产品后，安捷伦现提供几种 N-糖样品前处理选项来支持您的 LC/FLD/MS 和 CE 工作流程 (图 1)：

- 最新产品 Gly-X。该产品可将样品前处理时间缩短至 1 小时，采用 5 分钟的 PNGase F 酶解以及具有高 FLD 和 MS 信号的糖胺标记染料 InstantPC。另外可用 2-AB 和 APTS 进行标记，工作流程时间约为 2 小时
- 前一代离心型试剂盒 GlykoPrep。该产品基于 2012 年推出的 AssayMAP 小柱，工作流程时间为 3-5 小时
- 用于传统标记方法的产品

这些模块化工作流程可提供几种多聚糖标记物，并具备种类丰富的标记和未标记多糖标准品和文库（混标）作为支持。

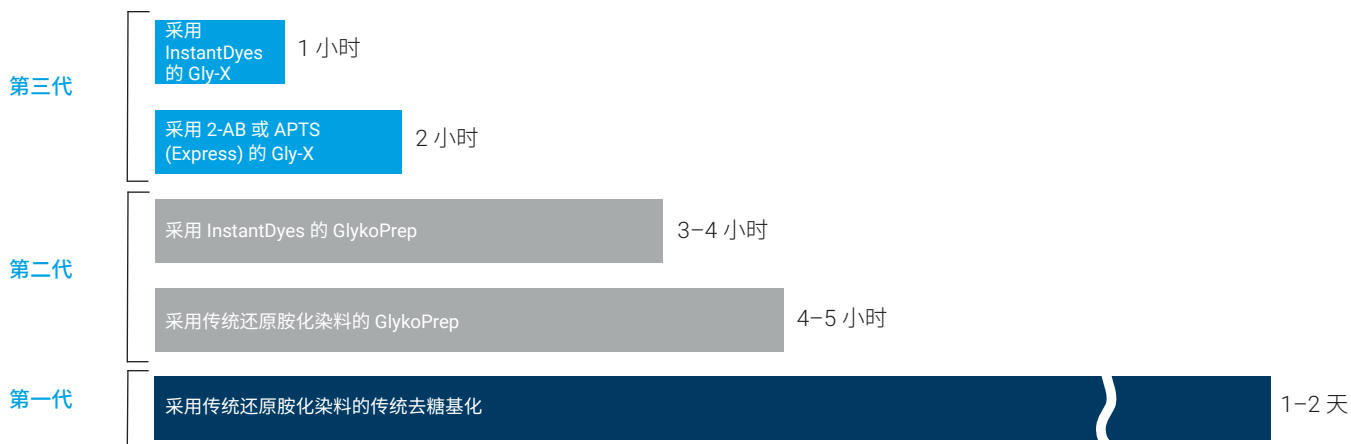


图 1. N-糖样品前处理技术的演化 (右侧显示代数)

结合 AdvanceBio 糖谱分析 HILIC 色谱柱与液相色谱仪/质谱仪，安捷伦可为您的整个游离多聚糖工作流程提供支持。



图 2. 安捷伦游离 N-糖工作流程要素

Gly-X N-糖链样品前处理

Gly-X 是新一代 N-糖前处理平台，可提供快速简化的溶液内工作流程。平台采用 5 分钟的 PNGase F 酶解，结合 InstantPC 染料及高效的真空板净化步骤，可去除多余的标记物和变性剂。帮助您在 60 分钟或更短的时间内准备用于 UHPLC 的样品，具有高强度 FLD 和/或 MS 检测信号（图 3）。

您是否想继续使用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 标记，以便与历史数据进行比较？Gly-X 平台支持使用 2-AB Express 进行 2-AB 标记，多聚糖在标记前将固定在净化基质上，因此无需干燥。

平台还支持使用 APTS (8-氨基苊-1,3,6-三磺酸) Express 试剂盒进行 N-糖的 CE 分离。由于经加热还原胺化反应进行标记额外需要 1 小时，因此 2-AB Express 和 APTS Express 工作流程大约需要 2 小时。

Gly-X N-糖样品前处理工作流程

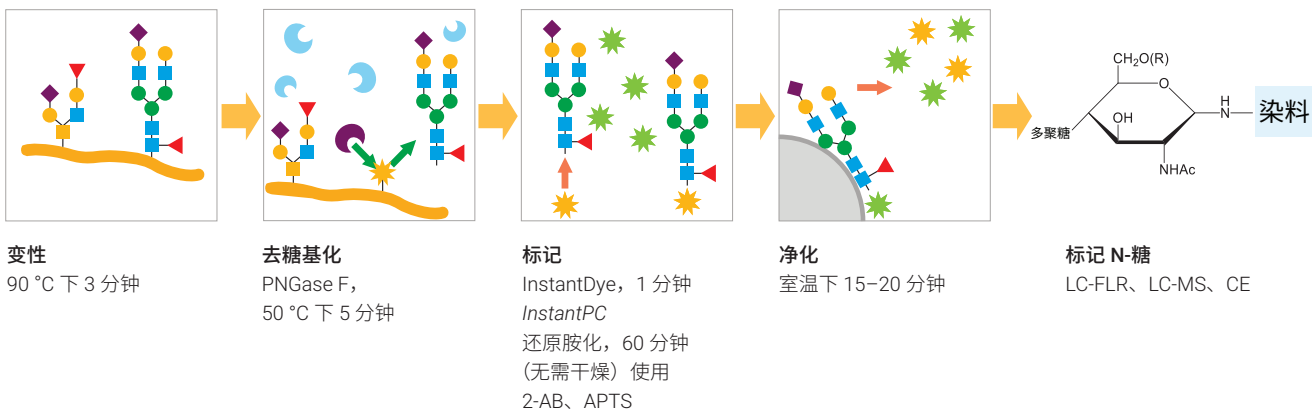


图 3. Gly-X N-糖样品前处理工作流程。推荐的初始样品量为 1-40 µg，最大样品量高于类似工作流程。可能还可使用更多蛋白质，具体取决于分子。如需了解更多的样品考虑因素，请参阅具体的 Gly-X 产品手册

Gly-X 样品前处理稳定可重现

除乙腈、甲酸和水等常用试剂外，产品包括 N-糖酶 (PNGase F) 在内的所有试剂。在真空条件下使用的 96 孔净化板，每次运行可处理 1–96 个样品。将净化板用过的孔密封并在室温下储存。用过部分的试剂可能会在适当储存条件下重新封存，以供重新使用（详细信息请参阅说明书）。图 4 显示了 InstantPC 标记的 N-糖从利妥昔单抗中的分离以及相对峰面积百分比数据。

用 InstantPC 标记的利妥昔单抗 N-糖的相对峰面积百分比、SD 和 %CV，n = 4。

	平均相对峰面积百分比	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

利妥昔单抗 N-糖，Gly-X InstantPC

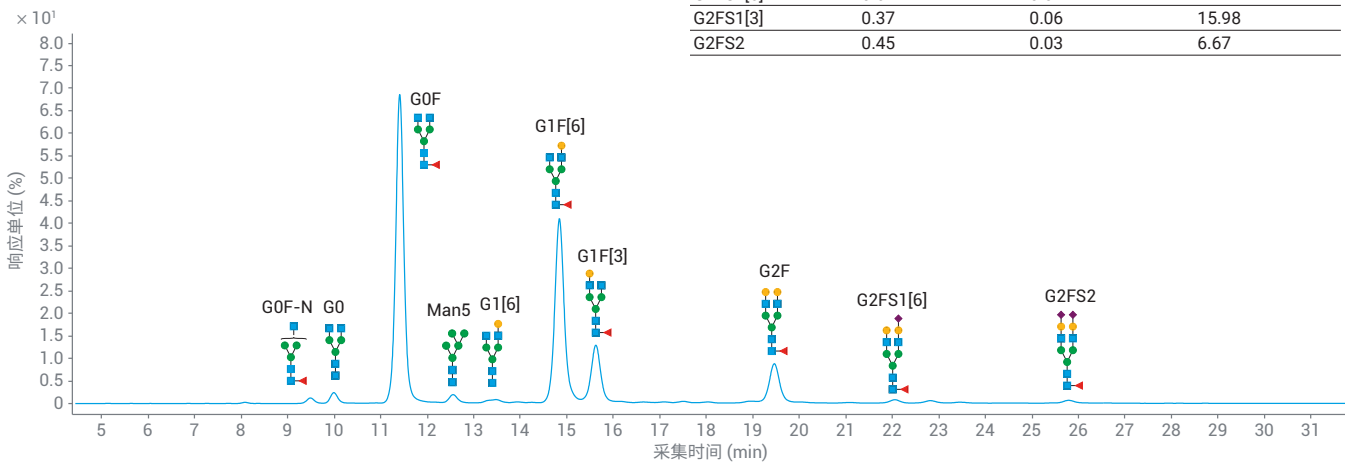


图 4. 用 Gly-X InstantPC 前处理的利妥昔单抗 N-糖的 HILIC-UHPLC 荧光分析谱图。表中显示 N-糖的相对峰面积百分比。数据来自应用简报 [5994-1348EN](#)。

如需了解有关 Gly-X 的更多信息，请查阅以下资源或访问 [Gly-X 产品网页](#)。

出版物	文件类型	标题
5994-1348EN	应用简报	使用 Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC 和 2-AB Express 样品前处理与 LC/FLD/MS 简化生物治疗药物的 N-糖分析工作流程
5994-0682ZHCN	应用简报	Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 由单克隆抗体进行用于液相色谱-荧光分析的释放 N-糖样品前处理
5994-0944EN	应用简报	开发用于 N-糖释放和标记的快速 APTS 样品前处理工作流程
5994-1231EN	用户手册	使用 InstantPC 试剂盒的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理 (部件号 GX24-IPC 和 GX96-IPC)
5994-1228EN	用户手册	使用 2-AB Express 试剂盒的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理 (部件号 GX24-2AB 和 GX96-2AB)
5994-1229EN	用户手册	使用 APTS Express 试剂盒的 Agilent Gly-X N-糖快速释放和标记 (部件号 GX96-APTS)

GlykoPrep N-糖样品前处理

ProZyme GlykoPrep 固相小柱于 2012 年推出，为安捷伦首个使用“即时”多聚糖标记的平台（图 5）。这款小柱实现了离心和自动化 (AssayMAP Bravo) 形式的 N-糖样品前处理流程的简化和标准化。使用 LC^[3] 和 CE^[4] 的两项实验室间研究证明了小柱的重现性。尽管 GlykoPrep 已被 Gly-X 代替，但我们将继续为现有的 GlykoPrep 客户提供支持。

GlykoPrep N-糖样品前处理工作流程

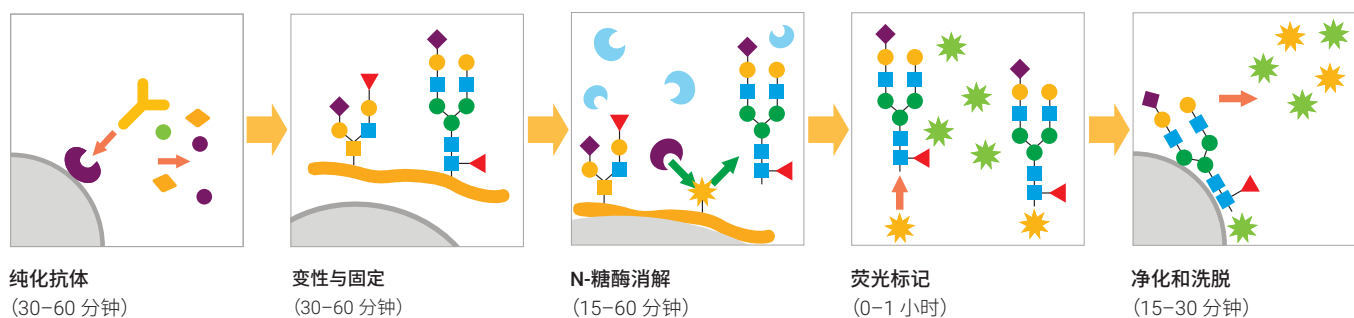


图 5. GlykoPrep N-糖样品前处理工作流程。提供多种标记选项，包括 InstantPC、2-AB 和 InstantAB、APTS

如需了解有关 GlykoPrep 的更多信息，请查阅以下资源或访问 [GlykoPrep 产品网页](#)。

出版物	文件类型	标题
5994-0942EN	应用简报	游离 N-糖的 LC/MS 分析中常用荧光标记的比较
5991-8550ZHCN	应用简报	从样品前处理到数据分析的单克隆抗体 N-糖全面分析方法
5991-6958EN	应用简报	使用荧光检测和质谱检测对单克隆抗体 N-糖相对定量结果的比较
5991-8071EN	应用简报	使用荧光检测器和可靠的安捷伦 LC/MSD XT 质量选择检测器进行单克隆抗体的 N-糖分析



传统 N-糖样品前处理方法

较早的 N-糖样品前处理工作流程包括使用 PNGase F 进行天然或变性剂驱动的酶解、游离多聚糖纯化、荧光团标记以及纯化标记的多聚糖。此类工作流程需要 1–2 天，不适用于高通量应用或自动化。

随着 Gly-X 的推出，安捷伦可以帮助您从 2-AB 工作流程换用更高通量的快速样品前处理技术。而我们仍将继续提供多种多聚糖标记和净化工具，来支持传统的工作流程。

如需了解有关安捷伦传统多聚糖前处理产品的更多信息，请查阅以下资源或访问[传统多聚糖前处理网页](#)。

出版物	文件类型	标题
5994-1056EN	产品说明	AdvanceBio N-糖酶 (PNGase F) ≥ 2.5 U/mL (部件号 GKE-5006)
GKK-804	用户指南	2-AB-plus 标记试剂盒 (部件号 GKK-804)
GKI-4756	用户指南	GlycoClean R 小柱 (部件号 GKI-4756)
GKI-4025	用户指南	GlycoClean H 小柱 (部件号 GKI-4025)
GKI-4726	用户指南	GlycoClean S 小柱 (部件号 GKI-4726)
5991-9561	用户指南	AdvanceBio N-糖样品前处理试剂盒 (部件号 5190-8005)



多聚糖标记

您可以用 InstantPC 等 InstantDyes 或 2-AB 等传统染料标记 N 糖，用 HILIC 模式分析；或用 APTS 标记，在 CE 上分析，如图 6 所示。请注意，还原胺化需要 1 小时或更长的时间进行加热标记反应，因此样品前处理将花费更长的时间。尽管不同多聚糖标记染料的保留顺序保持相对一致，但其 UHPLC-HILIC 保留时间和选择性存在差异^[5]。

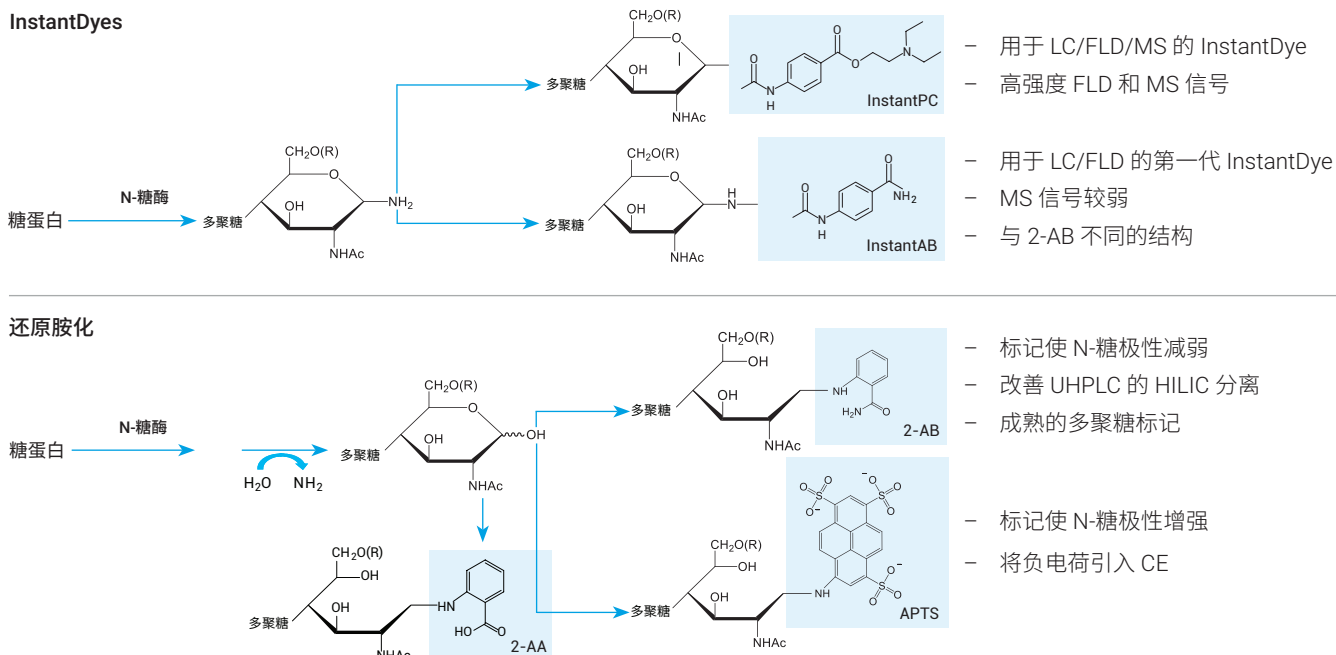


图 6. 多聚糖标记选项

InstantPC 不仅在液相色谱分析中具有高 FLD 信号，结构中的叔胺还可在正离子模式下产生高质量信号。未标记多聚糖以及多聚糖分析传统标记（例如 2-AB 和 2-AA）在 MS 中难以电离。

InstantPC 在多聚糖标记中具有非常强的 FLD 信号，如图 7 所示。普鲁卡因胺是仅次于 InstantPC 的荧光标记，它通过还原胺化反应制得，这一工作流程更加耗时。

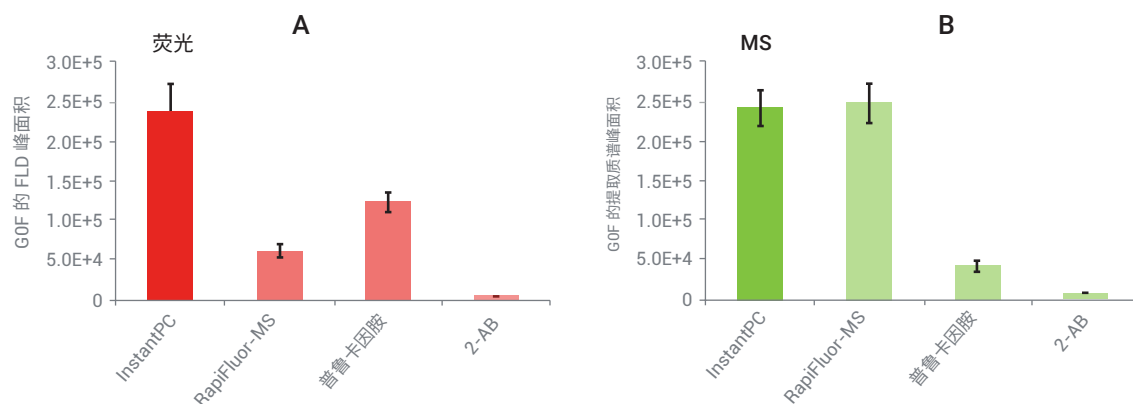


图 7. 多聚糖标记的 FLD (A) 和 MS (B) 响应对比。根据制造商说明，使用 InstantPC、RapiFluor-MS、普鲁卡因胺和 2-AB 对从相同数量的糖蛋白样品中获得的多聚糖进行标记，并使用 UHPLC 进行测量。条形图表示 GOF N-糖类物质的峰面积



N-糖标准品

我们提供标记和未标记形式的高度纯化多糖标准品。支持的标记物包括 InstantPC、2-AB、2-AA 和 APTS。所有这些均可用于 LC/FLD、LC/MS、CE/LIF 和 CE/MS 等流程的定性标准品。

涵盖了生物治疗药物中多种常见多聚糖类型，包括复杂二天线中性型与唾液酸化型、高甘露糖型以及 α -Gal 型。还可选择以下糖蛋白的多糖文库：

- 人 IgG
- 牛 RNA 酶 B
- 牛胎球蛋白
- 人 α 1-酸糖蛋白 (AGP)
- 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生的重组单克隆 IgG (mAb)
- 三天线和四天线唾液酸化 N-糖文库

此外，我们在这些标准品中同时提供 α (2,3) 和 α (2,6) 唾液酸化标准品。

- 在 CHO 细胞产生的糖蛋白上发现了 α (2,3) 唾液酸键^[6]。带有 α (2,3) 唾液酸键的多聚糖比具有 α (2,6) 唾液酸键的异构 N-糖在 HILIC 上的保留时间更短^[7]
- 在静脉注射用人免疫球蛋白 (IVIG) 等糖蛋白上发现有 α (2,6) 唾液酸键^[8]



不同 N-糖标准品、文库和葡萄糖单元 (GU) 分子量标准品以及结构和替代命名法的列表，请参见出版物 [5994-0999ZH-CN](#)。

如需了解所有安捷伦 N-糖标准品，请访问[安捷伦网站](#)。



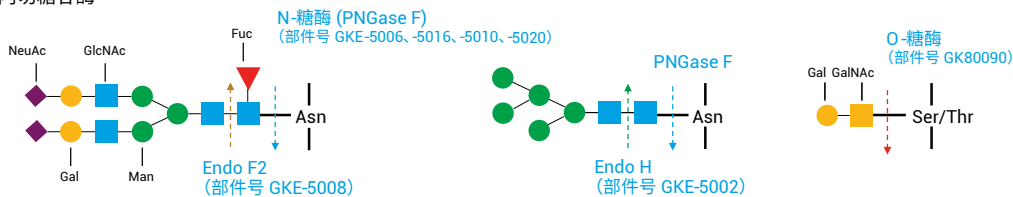
糖酶

安捷伦现提供多种糖酶来支持您的游离聚糖和其他分析工作流程。部分可选糖酶如图 8 所示。请访问[安捷伦网站](#)了解所有产品。

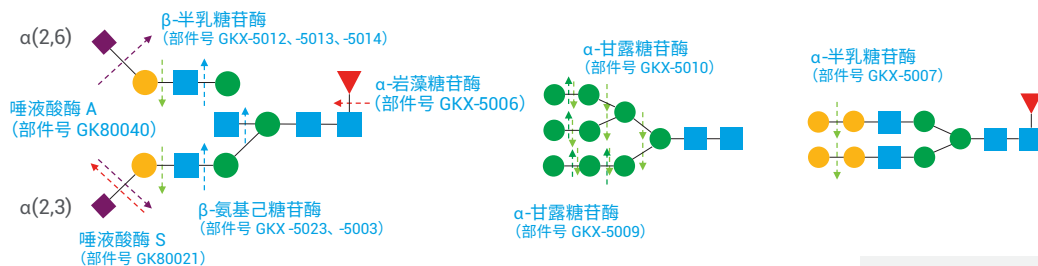
- 内切糖苷酶可在多聚糖结构内裂解。N-糖酶（PNGase F，实际上为天冬酰胺酰胺酶）因具备释放大多数完整 N-糖的功能而广泛用于研究游离多聚糖及生成去 N-糖基蛋白质
- 外切糖苷酶可从多聚糖上裂解暴露或“末端”的单糖残基。常用的糖苷外切酶包括用于去半乳糖基化的半乳糖苷酶，以及用于游离多聚糖、糖蛋白或细胞去唾液酸化的唾液酸酶（神经氨酸酶）
- 糖基转移酶通过催化将特定单糖（游离态或附着于蛋白质、糖或脂质上）添加到现有的多聚糖结构中。每种酶类型可添加特定的单糖。应用包括将聚糖体外修饰为糖蛋白，以将所需的多糖谱图进行“糖基化工程”。安捷伦的唾液酸转移酶和半乳糖基转移酶也包括合适的唾液酸或半乳糖供体底物

选定糖苷内切酶 (A)、糖苷外切酶 (B) 和糖基转移酶 (C) 的特异性

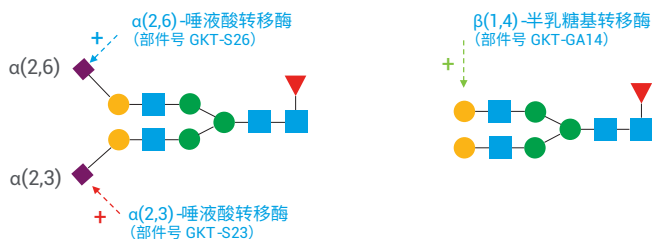
A. 内切糖苷酶



B. 外切糖苷酶



C. 糖基转移酶



多聚糖结构图示

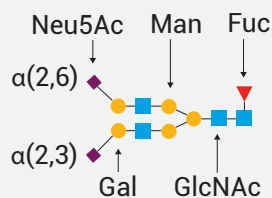


图 8. 选定糖苷内切酶 (A)、糖苷外切酶 (B) 和糖基转移酶 (C) 的特异性

多聚糖结构动画遵循功能性糖组学协会 (CFG) 的建议^[9], 并使用 GlycoWorkbench 2.14.^[10] 绘制。

Neu5Ac = N-乙酰神经氨酸

GalNAc = N-乙酰基半乳糖胺

Gal = 半乳糖

Asn = 天冬酰胺

Man = 甘露糖

Ser = 丝氨酸

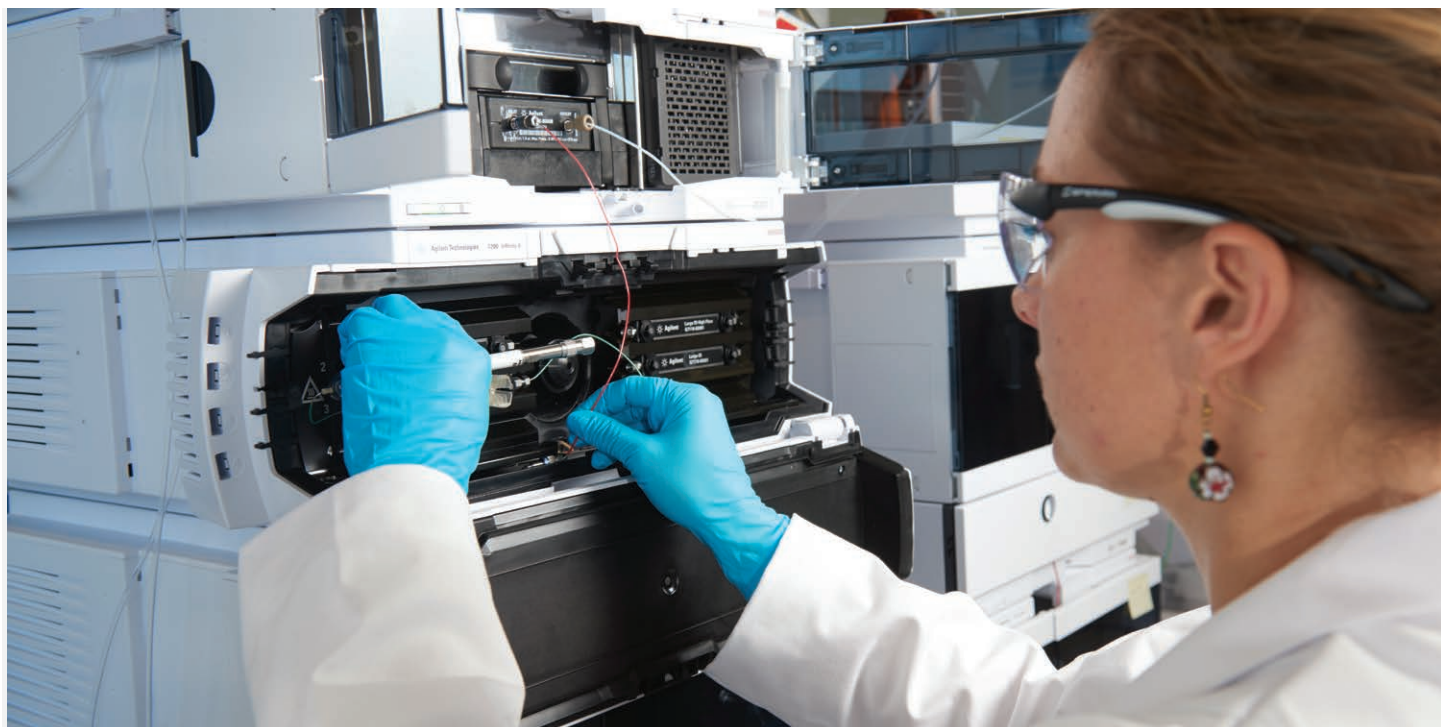
GlcNAc = N-乙酰氨基葡萄糖

Thr = 苏氨酸

Fuc = 岩藻糖

如需了解有关糖酶的更多信息, 请查阅以下资源或访问[糖生物学酶网页](#)。

出版物	文件类型	标题
5994-1225EN	产品说明	唾液酸酶 A (部件号 GK80040)
GKT-S23	产品说明	$\alpha(2,3)$ -唾液酸转移酶 (部件号 GKT-S23)
GKT-S26	产品说明	$\alpha(2,6)$ -唾液酸转移酶 (部件号 GKT-S26)
GKT-GA14	产品说明	$\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶 (部件号 GKT-GA14)



AdvanceBio 糖谱分析色谱柱可实现快速高分离度分离

在下一个具有前景的生物治疗药物的研发与等效生物仿制药的开发角逐中，分析准确性和分析效率都是不可或缺的。缩短过程开发时间、更改程序以及控制成本都只是每天需要面对的挑战中的一小部分。

使用 Gly-X 样品前处理生成标记 N-糖样品后，即可使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱进行标记 N-糖的 HILIC 分离。这款胺基型色谱柱具有独特的亲水性键合技术，并提供两种配置：

- 1.8 μm 全多孔填料，速度更快、性能更优 (1200 bar)
- 2.7 μm 表面多孔填料，在更低压力下提供更高分离度 (600 bar)

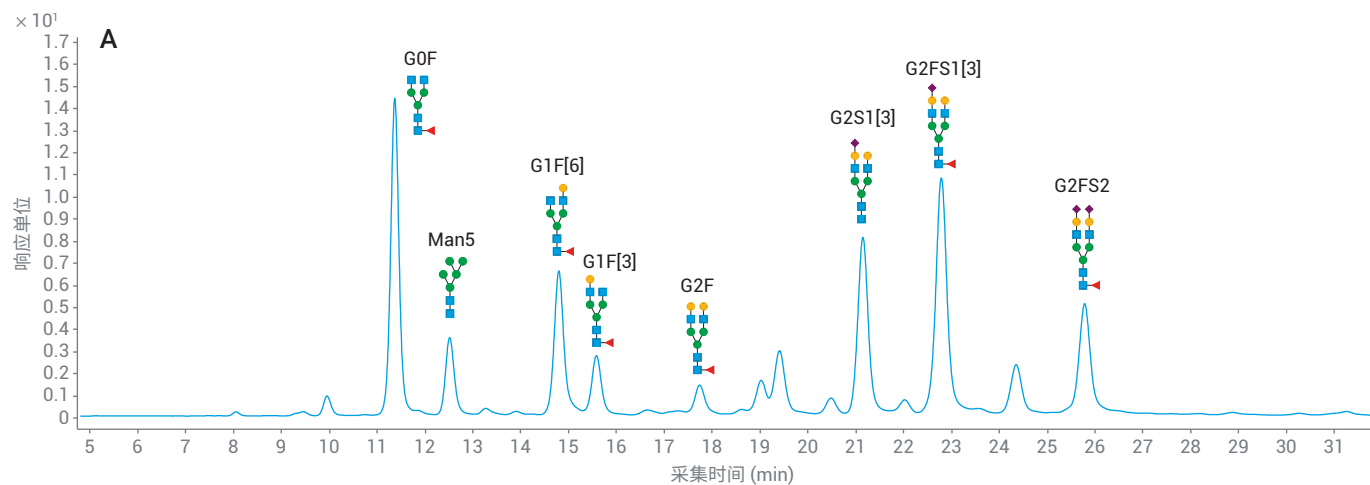
表 1 和表 2 展示了使用 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱进行 N-糖分离的 HILIC 方法；图 9 展示了使用 60 分钟方法在 2.1 \times 150 mm, 1.8 μm 色谱柱（部件号 859700-913）上分离恩利中 InstantPC 标记的 N-糖。



AdvanceBio 糖谱分析色谱柱在分离和表征多肽和蛋白质、抗体、抗体偶联物、新生物体和生物制药方面具有一致、卓越的性能。提供多种柱长。

AdvanceBio 糖谱分析 HILIC 色谱柱可帮助您克服困难的多聚糖分析挑战

恩利, InstantPC FLD



恩利, InstantPC TIC

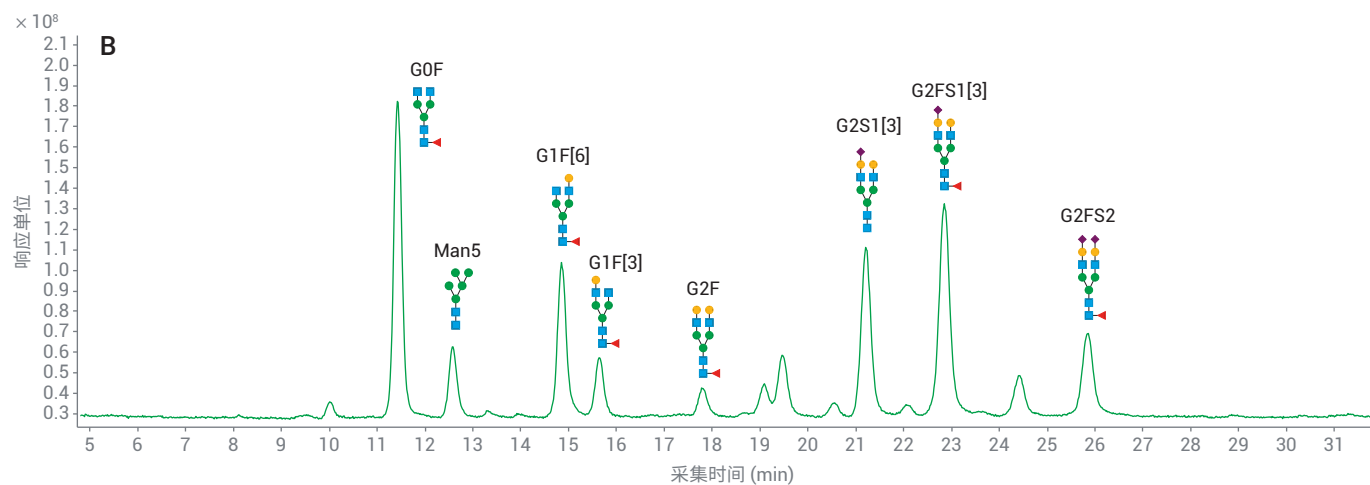


图 9. 使用 60 分钟方法在 2.1×150 mm, $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱 (部件号 859700-913) 上分离恩利 (依那西普) 中的 InstantPC N-糖。A) 荧光检测, B) MS 检测

如需了解有关 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱的更多信息, 请查阅以下资源或访问[糖谱分析色谱柱网页](#)。

出版物	文件类型	标题
5994-1469EN	应用简报	使用质量源于设计 (QbD) 方法分离关键 N-糖对
5994-0372EN	应用简报	利用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 对多种单克隆抗体进行糖肽表征
5991-8796ZHCN	应用简报	采用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 对单克隆抗体进行三个不同层次的糖基化分析
5991-8550ZHCN	应用简报	从样品前处理到数据分析的单克隆抗体 N-糖全面分析方法



支持 N-糖分析的服务

专家见解可帮助确保您的药物开发计划获得成功。安捷伦提供游离多聚糖分析服务，包括以下报告选项：

- LC/FLD 获得相对峰面积百分比
- LC/MS 获得多聚糖峰归属
- 使用标准品和糖苷外切酶确认多聚糖峰归属
- 使用外切糖苷酶和糖基转移酶生成满足研究需求的糖基变异

如果您的仪器或人员有限或时间紧迫，也没有问题。我们可以与您合作，以较短的数据周转时间开发并实施多聚糖分析方法。此外，我们可利用现成产品提供多种分析服务，以便在选择将分析引入实验室时，可以更轻松地进行方法转移。

如需讨论您的具体项目需求，请发送邮件至 advancebio.glycan@agilent.com。



参考文献

1. Jones, A. *N-Glycan Analysis of Biotherapeutic Proteins*. BioPharm International. 2017, 30(6), 20–25
2. Planinc, A. et al. *Glycan characterization of biopharmaceuticals: Updates and perspectives*. Anal Chim Acta. 2016, 921, 13–27
3. Szekrényes, Á. et al. *Multi-site N-Glycan Mapping study 2: UHPLC*. Electrophoresis. 2018, 39(7), 998–1005
4. Szekrényes, Á. et al. *Multi-site N-Glycan Mapping study 1: Capillary electrophoresis - laser induced fluorescence*. MAbs. 2016, 8(1), 56–64
5. Yan, J. et al. *Comparison of Common Fluorescent Labels for LC/MS Analysis of Released N-Linked Glycans (游离 N-糖的 LC/MS 分析中常用荧光标记的比较)*, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-0942EN](#), 2019
6. Lee, E.U. et al. *Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase*. J Biol Chem. 1989, 264(23), 13848–55
7. Anthony, R.M. et al. *Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc*. Science. 2008, 320(5874), 373–6
8. Raymond C. et al. *Production of α 2,6-sialylated IgG1 in CHO cells*. MAbs. 2015, 7(3), 571–83
9. Varki, A. et al. *Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans*. Glycobiology. 2015, 25(12), 1323–4
10. Ceroni, A. et al. *GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans*. J Proteome Res. 2008, 7(4), 1650–9

Agilent CrossLab 服务

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以及更高的生产力和运行效率等重要成果。安捷伦通过 CrossLab 在每一次互动中为您提供深刻见解，助您实现业务目标。CrossLab 提供方法优化、灵活的服务计划以及针对各种技能水平的培训。我们还有许多其他产品和服务来帮助您管理仪器和实验室，确保实现理想性能。

如需了解关于 Agilent CrossLab 的更多信息，以及洞察敏锐、成就超群的示例，请访问 www.agilent.com/crosslab

了解更多信息：

www.agilent.com/chem/glycananalysis

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

安捷伦客户服务中心：

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。DE.9254398148

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，2020
2020年5月21日，中国出版
5994-1647ZHCN