

Automatisierung der Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glykan-Probenvorbereitung mit InstantDyes

Automatische Probenvorbereitung mit AdvanceBio Gly-X-Kits



Automatische N-Glykan-Probenvorbereitung mit Agilent AdvanceBio Gly-X

Durch die Automatisierung können manuelle Arbeitsschritte, Bedienfehler und Datenvariabilität reduziert werden. Jeder Schritt der Agilent Gly-X Glycan Probenvorbereitung mithilfe des InstantDye-Protokolls (ehemals ProZyme), einschließlich schneller Deglykosylierung, Markierung und Aufreinigung, wird in Platten im 96-Well-Format durchgeführt. Dadurch sind die Gly-X-Kits direkt und ohne Modifikationen mit den meisten Workstations zur Handhabung von Flüssigkeiten kompatibel, ohne dass spezielle Kit-Komponenten oder Kit-Formate erforderlich sind.

Die Probenvorbereitung mit Gly-X N-Glykan kann manuell oder an einer Automatisierungs-Workstation durchgeführt werden und sorgt somit für Flexibilität und effiziente Nutzung der Kitmodule je nach den Anforderungen an den Durchsatz und den Arbeitsablauf.

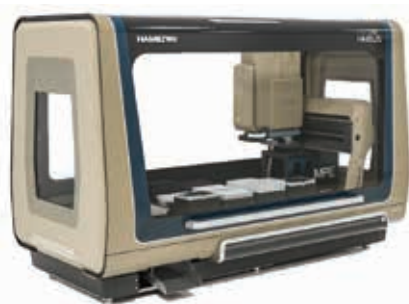


Gemeinsam Glycosciences voranbringen.

Mit Produkten und Services von ProZyme verfügt Agilent nun über ein zusätzliches Angebot von Geräten und Verbrauchsmaterialien aus einer Hand – von der Probe bis zu zuverlässigen Ergebnissen. Damit sind wir kompetenter Ansprechpartner für den gesamten Arbeitsablauf der Glykananalyse, so dass Sie schnell und einfach genau die zuverlässigen, reproduzierbaren Ergebnisse erhalten, die Sie brauchen.

Mehr Infos:

www.agilent.com/chem/better-together



So steigern Sie Ihre Produktivität:

- Gly-X-Kits unterstützen sowohl manuelle als auch automatisierte Methoden
- Das automatisierte Verfahren erzeugt Daten, die mit dem manuellen Arbeitsablauf korrelieren
- Flexibler Einsatz von Kit-Modulen zwischen den Verfahren
- Sowohl für LC/MS- als auch für CE-Marker nachgewiesen

40 µg Glycoprotein

3 Min. Denaturierung

5 Min. N-Glykanase-Verdau

Freigesetzte Glykane

1 Min. InstantPC-Markierung

Markierte Glykane

96-Well-Aufreinigungsplatte

UHPLC, LC/MS, CE

Datenanalyse

Allgemeine Anleitung

Die Gly-X N-Glykan-Deglykosylierung und InstantDye-Markierung erfolgen in einer 96-Wellplate. Die Aufreinigung wird in einer 96-Well-Vakuumplatte durchgeführt. Um die Gly-X-Kits zu automatisieren, werden zum Pipettieren auf der Automatisierungsplattform Volumen zwischen 4-400 µl benötigt. Die Plattform sollte Positionen für Probenfläschchen, Wannen und 96-Wellplates unterstützen. Die Plattform sollte auch den Transport der 96-Wellplates zwischen den Stationen auf dem Deck unterstützen.

Die Gly-X-Deglykosylierung und -Markierung erfordert zwei Inkubationstemperaturen (50 °C und 90 °C) und wird in einer 96-PCR-Wellplate durchgeführt. Diese Schritte werden in der Regel mit zwei Heizblöcken auf dem Deck oder einem Thermocycler auf dem Deck durchgeführt.

Die Gly-X-Aufreinigung erfolgt in einer 96-Well-Vakuumplatte, für die eine integrierte automatische Überdruckkammer empfohlen wird. Es kann auch ebenso eine integrierte Vakuumkammer verwendet werden.

Markierte N-Glykane werden von der Aufreinigungsplatte in eine PCR-Platte eluiert. Dieser Vorgang findet ebenfalls in der Überdruckkammer statt.

Arbeitsablauf der Automatisierung

Der Arbeitsablauf der Automatisierung (Abb. 1) beginnt damit, dass das System die erforderlichen Mengen von drei Stamm-Reagenzien (Gly-X-Denaturierungsmittel, N-Glykanase und ausgewähltes InstantDye) aus Fläschchen in eine 96-Well-Platte („Ausgangsplatte“) überträgt. Die Anzahl der Wells für jedes übertragene Reagens entspricht der Anzahl der zu verarbeitenden Proben. Die Glykoproteinproben werden dann von der Probenplatte in die Wells der Ausgangsplatte gebracht, welche überführte Reagenzien enthalten. Dort werden sie gemischt und wieder zurück in die Probenplatte geführt. Die Probenplatte wird dann bei der angegebenen Temperatur inkubiert.

Auf diese Weise werden alle Inkubationen in der Probenplatte durchgeführt und es können Mehrkanalpipetten verwendet werden, um die Proben von der Probenplatte zur Ausgangsplatte und zurück zur Probenplatte zu überführen.

Nach Zugabe von Gly-X-Denaturierungsmittel werden die Proben 3 Minuten lang bei 90 °C inkubiert. Nach der Übertragung von N-Glykanase wird die Probenplatte dann 5 Minuten bei 50 °C inkubiert. Nach der Deglykosylierung erfolgt die Zugabe von Markierungsreagenzien und die Inkubation für 1 Minute bei 50 °C. Die Proben werden anschließend in die Gly-X-Aufreinigungsplatte überführt und mit dem Hamilton[MPE]2-Überdruckmodul auf dem Nimbus-Deck mit einem Druckgradienten gewaschen. Elutionspuffer für InstantPC-markierte N-Glykane ist im Kit enthalten. Zur Elution für InstantQ-markierte Glykane wird deionisiertes Wasser verwendet. Markierte N-Glykane werden mit 100 µl Eluent in eine PCR-Platte eluiert und sind dann bereit für die Analyse mittels LC/MS (InstantPC) oder CE (InstantQ) mit dem Agilent Gly-Q Glykan-Analysesystem (ehemals ProZyme).

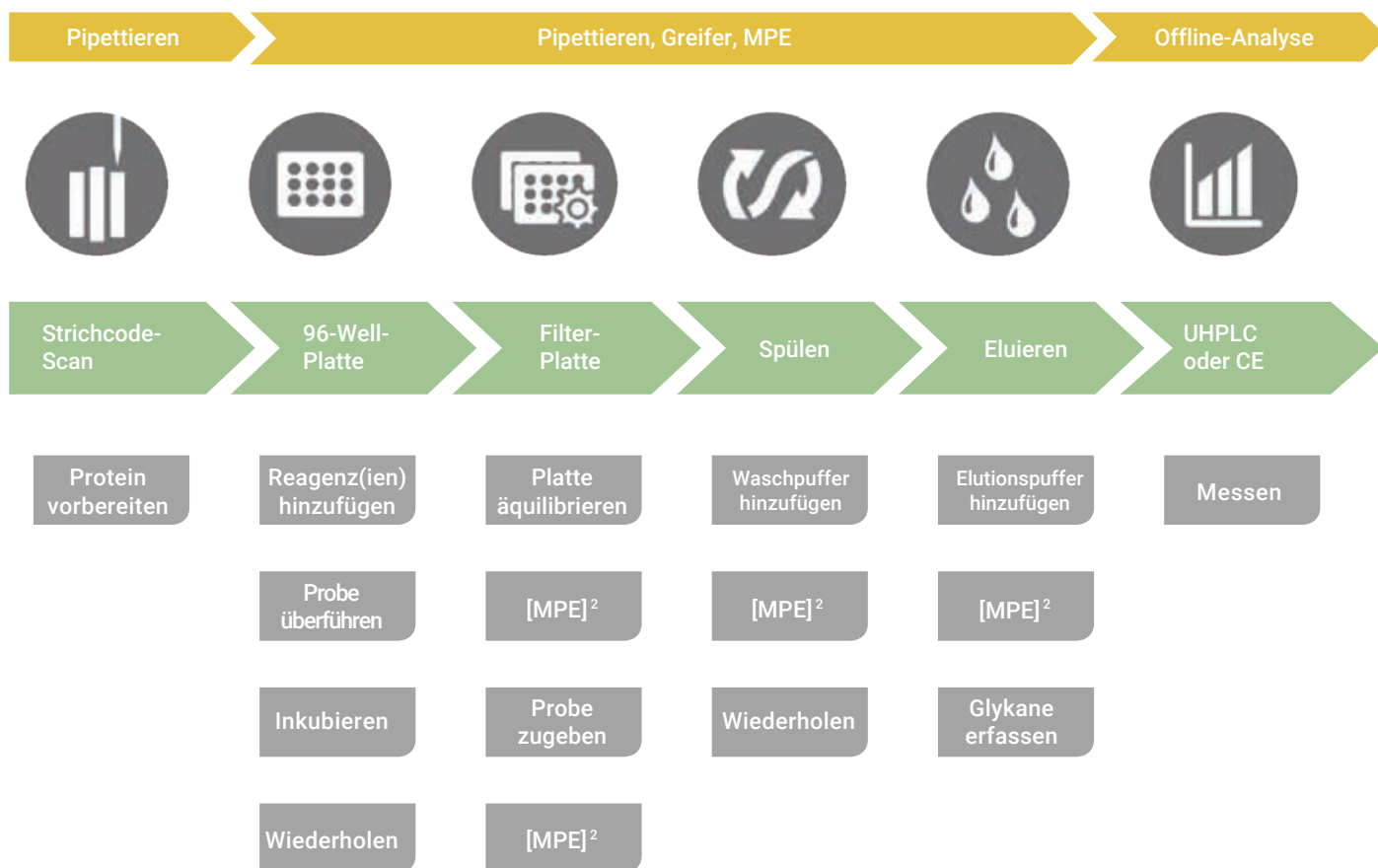


Abb. 1: Übersicht über die Automatisierung: Arbeitsablauf auf dem Hamilton NIMBUS für die Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glykan-Vorbereitung mit InstantPC- und InstantQ-Kits.

Deckkonfiguration

Verbrauchsmaterialien und Kit-Komponenten laden

- Spitzen laden, 50 µl und 1000 µl
- Reagens-Trägerplatte laden: PCR-Platte, halbumrandet
- Gly-X-Aufreinigungsplattenstapel laden
- Gly-X-Erfassungsplatte oder umrandete PCR-Platte laden

Kit-Reagenzien laden

Gly-X-Denaturierungsmittel –

Mit deionisiertem Wasser 1:1 in einem 0,5-ml-Probengefäß verdünnen

- In den Reagenzienblock setzen

N-Glykanase-Arbeitslösung – Mit Verdauungspuffer gemäß Kit-Anleitung vorbereiten, dann Mischung 1:1 mit deionisiertem Wasser in einem 0,5-ml-Probengefäß verdünnen

- In den Reagenzienblock setzen

InstantDyes – Nach den Kit-Anweisungen vorbereiten

- In ein 0,5-ml-Probengefäß im Reagenzienblock geben

Erforderliche Puffer laden

Lade-/Waschpuffer

- Für InstantPC 100 ml Lade-/Waschpuffer vorbereiten und in Wanne auf dem Deck geben
- Für InstantQ Ethanol in Wanne auf dem Deck geben

Elutionsreagenzien

- Für InstantPC Gly-X InstantPC-Lösemittel aus dem Kit in Wanne auf dem Deck geben
- Für InstantQ Wasser in Wanne auf dem Deck geben

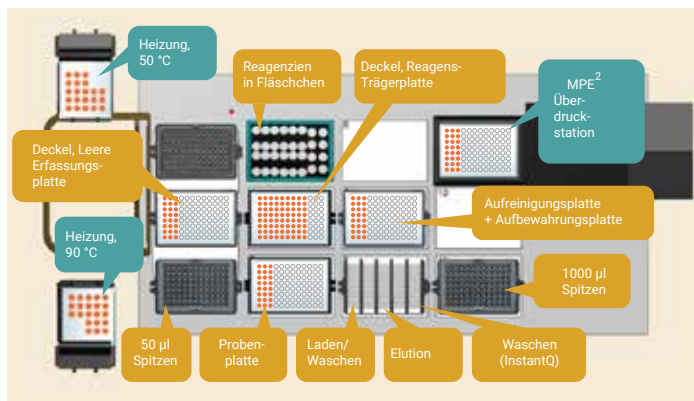


Abb. 2: Layout des Hamilton NIMBUS-Decks. Position der Platten, Fläschchen, Wannen, Heizungen und MPE-Überdruckkammer.

Zuverlässige Ergebnisse

Das Fusionsprotein Enbrel und Wasser-Blindlösungen wurden in einem Schachbrettlayout in die Probenplatte eingebracht, um die Leistung im Vergleich einzelner Wells zu verifizieren und auf mögliche Verschleppung zu prüfen. Der Test wurde sowohl für den InstantPC-Farbstoff (mit UHPLC) als auch für den InstantQ-Farbstoff (mit CE mit Gly-Q-System) durchgeführt. Das folgende Diagramm zeigt, dass unabhängig von der bei der Entwicklung des Automatisierungsprotokolls verwendeten Methode ähnliche Daten erhalten werden.

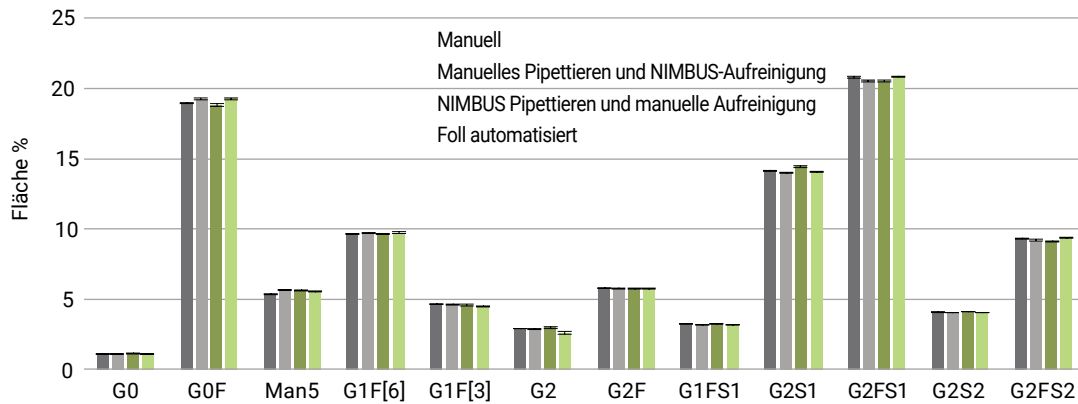


Abb. 3: Enbrel InstantPC-markierte N-Glykane nach Vorbereitung mit verschiedenen Methoden (n=8).

Bestellinformationen

AdvanceBio Gly-X mit InstantPC

Kits und Module

Beschreibung	Bestellnummer
AdvanceBio Gly-X mit InstantPC-Kit (96 St.)	GX96-IPC
AdvanceBio Gly-X mit InstantPC-Kit (24 St.)	GX24-IPC
AdvanceBio Gly-X mit InstantPC-Deglykosylierungs- und Markierungsmodul-Set (96 St.)	GX96-201PC
AdvanceBio Gly-X mit InstantPC-Deglykosylierungs- und Markierungsmodul-Set (24 St.)	GX24-201PC
AdvanceBio Gly-X InstantPC-Markierungsmodul (96 St.)	GX96-101
AdvanceBio Gly-X InstantPC-Markierungsmodul (24 St.)	GX24-101
AdvanceBio Gly-X InstantPC-Aufreinigungsmodul für InstantPC (96 St.)	GX96-102
AdvanceBio Gly-X-Vakuumkammer-Abstandshalter (2 St.)	GX100
AssayMAP PA50 Protein A-Affinität-Reinigungskit (96 St.)	G5524-60010 KIT

AdvanceBio Gly-X mit InstantQ

Kits und Module

Beschreibung	Bestellnummer
AdvanceBio Gly-X mit InstantQ-Kit (96 St.)	GX96-IQ
AdvanceBio Gly-X mit InstantQ-Kit (24 St.)	GX24-IQ
AdvanceBio Gly-X mit InstantQ-Deglykosylierungs- und Markierungsmodul-Set (96 St.)	GX96-302IQ
AdvanceBio Gly-X mit InstantQ-Deglykosylierungs- und Markierungsmodul-Set (24 St.)	GX24-302IQ
AdvanceBio Gly-X InstantQ-Markierungsmodul (96 St.)	GX96-301
AdvanceBio Gly-X InstantQ-Markierungsmodul (24 St.)	GX24-301
AdvanceBio Gly-X InstantPC-Aufreinigungsmodul für InstantPC (96 St.)	GX96-302
AdvanceBio Gly-X-Vakuumkammer-Abstandshalter (2 St.)	GX100
AssayMAP PA50 Protein A-Affinität-Reinigungskit (96 St.)	G5524-60010 KIT
Gly-Q Kartuschenmodul	GQ103
Sialidase A	GK80040
Sialidase S	GK80021

AdvanceBio Gly-X mit InstantPC

Mit InstantQ markierte individuelle Bestellnummer
N-Glykanstandards

G0-N		GKPC-401
G0		GKPC-301
G0F-N		GKPC-402
G0F		GKPC-302
G1		GKPC-317
G1F		GKPC-316
G2		GKPC-304
G2F		GKPC-305
G1F + 1aGal		GKPC-403
G2F + 1aGal		GKPC-404
G2F + 2aGal		GKPC-318
G1S1 (α 2,3)		GKPC-329
G1S1 (α 2,6)		GKPC-319
G1FS1 (α 2,3)		GKPC-330
G1S1 (α 2,6)		GKPC-320
G2S1 (α 2,3)		GKPC-321
G2S1 (α 2,6)		GKPC-311
G2FS1 (α 2,3)		GKPC-325
G2FS1 (α 2,6)		GKPC-315
G2S2 (α 2,3)		GKPC-322
G2S2 (α 2,6)		GKPC-312
G2FS2 (α 2,3)		GKPC-323
G2FS2 (α 2,6)		GKPC-313
Man5		GKPC-103
Man6		GKPC-104
Man7		GKPC-105
Man8		GKPC-106
Man9		GKPC-107

Bibliotheken mit InstantPC-markierten N-Glykanen	Bestellnummer

AdvanceBio Bibliothek N-verknüpfter Glykane aus humanem IgG	GKPC-005
Glucose-Homopolymer	GKPC-503
Bibliothek N-verknüpfter Glykane aus monoklonalen CHO-Antikörpern	GKPC-020
Bibliothek N-verknüpfter Glykane aus monoklonalen CHO-Antikörpern + Glycoprotein monoklonaler CHO-Antikörper	GKPC-020-P
Bibliothek $\alpha(2-3)$ -sialylierter triantennärer Glykane	GKPC-233
Bibliothek $\alpha(2-6)$ -sialylierter triantennärer Glykane	GKPC-263
Bibliothek $\alpha(2-3)$ -sialylierter tetraantennärer Glykane	GKPC-234
Bibliothek $\alpha(2-6)$ -sialylierter tetraantennärer Glykane	GKPC-264

Bestellinformationen

AdvanceBio Gly-X mit InstantQ

Standards und Kontrollen

Mit InstantQ markierte individuelle N-Glykanstandards

		Bestellnummer
G0-N		GKSQ-401
G0		GKSQ-301
G0F-N		GKSQ-402
G0F		GKSQ-302
G1		GKSQ-317
G1F		GKSQ-316
G2		GKSQ-304
G2F		GKSQ-305
G1F + 1aGal		GKSQ-403
G2F + 1aGal		GKSQ-404
G2F + 2aGal		GKSQ-318
A1 (α2,3)		GKSQ-321
A1 (α2,6)		GKSQ-311
A1F (α2,3)		GKSQ-325
A1F (α2,6)		GKSQ-315
A2 (α2,3)		GKSQ-322
A2 (α2,6)		GKSQ-312
A2F (α2,3)		GKSQ-323
A2F (α2,6)		GKSQ-313
A3 (α2,6)		GKSQ-314

Weitere Produkte für die Glykan-Analyse finden Sie unter:

www.agilent.com/chem/glycananalysis

Mehr Infos zu Agilent Lösungen für kritische Qualitätsmerkmale finden Sie unter:

www.agilent.com/chem/advancebio

Ausschließlich zu Forschungszwecken. Nicht für Diagnoseverfahren geeignet.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Veröffentlicht in den USA, 07. Juni 2019
5994-1003DEE

AdvanceBio Gly-X mit InstantQ

Standards und Kontrollen

Mit InstantQ markierte individuelle N-Glykanstandards

Man5		GKSQ-103
Man6		GKSQ-104
Man7		GKSQ-105
Man8		GKSQ-106
Man9		GKSQ-107

InstantQ N-Glykan-Bibliotheken

Bestellnummer

Human-IgG-N-Glykan-Bibliothek	GKSQ-005
Bibliothek N-verknüpfter Glykane aus RNase B	GKSQ-009
Bibliothek N-verknüpfter Glykane aus monoklonalen CHO-Antikörpern	GKSQ-020
Bibliothek N-verknüpfter Glykane aus monoklonalen CHO-Antikörpern + Glycoprotein monoklonaler CHO-Antikörper	GKSQ-020-P
Bibliothek α(2-3)-sialylierter triantennärer Glykane	GKSQ-233
Bibliothek α(2-3)-sialylierter triantennärer Glykane	GKSQ-234
Bibliothek α(2-6)-sialylierter triantennärer Glykane	GKSQ-263
Bibliothek α(2-6)-sialylierter tetraantennärer Glykane	GKSQ-264

InstantQ-Leiter und Migrationsstandards

Bestellnummer

Gly-Q Glucoseleiter	GKSQ-503
Gly-Q Migrationsstandards (oben und unten)	GKSQ-500
Gly-Q Standardset für die Zuordnung (GKSQ-500 & GKSQ-503)	GKSQ-505