

Automatización de la preparación de glicanos Agilent AdvanceBio Gly-X con InstantDyes

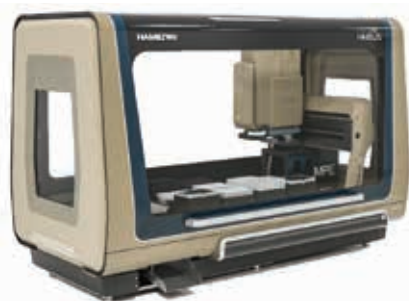
Preparación de muestras sin supervisión
con los kits AdvanceBio Gly-X



Preparación de muestras de N-glicanos sin supervisión con Agilent AdvanceBio Gly-X

La automatización puede reducir el tiempo de preparación manual, los errores de los usuarios y la variabilidad de los datos. Cada paso del protocolo de preparación de glicanos Agilent Gly-X con InstantDye (anteriormente ProZyme), incluida la desglicosilación, el marcado y la limpieza rápidos, se lleva a cabo en placas de 96 pocillos. Debido a ello, los kits Gly-X son compatibles directamente con la mayoría de las estaciones de trabajo de manipulación de líquidos, sin necesidad de modificaciones ni de utilizar componentes del kit o formatos especiales.

La preparación de muestras de N-glicanos Gly-X se puede realizar manualmente o en una estación de trabajo de automatización, lo que aporta flexibilidad y permite un uso flexible de los módulos del kit basándose en las necesidades de número de muestras analizadas y flujo de trabajo.



40 µg de glicoproteína

3 min de desnaturalización

5 min de digestión con
N-glicanasa

Los glicanos liberados

1 min de marcado con InstantPC

Glicanos marcados

Placa de limpieza de 96 pocillos

UHPLC, LC/MS, CE

Análisis de datos

Esta es la forma de mejorar la productividad:

- Los kits Gly-X admiten tanto el método manual como el automatizado.
- El método automatizado produce datos coherentes con el flujo de trabajo manual.
- Uso flexible de módulos del kit entre los métodos.
- Demostrado para los marcados tanto de LC/MS como de CE.



A la vanguardia de la glicociencia, juntos.

Gracias a la incorporación de los productos y servicios de ProZyme, la oferta de instrumentos y consumibles de Agilent puede dar respuesta a todas sus necesidades: desde la preparación de muestras hasta la obtención de resultados fiables. Nuestra experiencia abarca ahora todo el flujo de trabajo de análisis de glicanos, para que consiga de forma sencilla los resultados fiables y reproducibles que necesita.

**Para obtener más
información, visite:**
[www.agilent.com/chem/
better-together](http://www.agilent.com/chem/better-together)

Directrices generales

La desglicosilación de N-glicanos Gly-X y el marcado InstantDye se llevan a cabo en una placa de 96 pocillos. La limpieza se realiza en una placa de vacío de 96 pocillos. Con el fin de automatizar los kits Gly-X, de la plataforma de automatización requiere volúmenes de entre 4 y 400 µl para el pipeteado. La plataforma debe admitir ubicaciones para viales, surcos y placas de 96 pocillos. La plataforma también debe admitir el desplazamiento de las placas de 96 pocillos entre estaciones en la cubierta.

La desglicosilación y el marcado Gly-X precisan dos temperaturas de incubación (50 °C y 90 °C) y se llevan a cabo en una placa PCR de 96 pocillos. Estos pasos suelen llevarse a cabo con dos bloques calentadores en cubierta o un termociclador en cubierta.

La limpieza Gly-X se realiza en una placa de vacío de 96 pocillos para la cual se recomienda un colector de presión positiva automatizado incorporado. También se puede usar un colector de vacío incorporado.

Los N-glicanos marcados se eluyen desde la placa de limpieza en una placa de PCR; esta operación también se lleva a cabo en el colector de presión positiva.

Flujo de trabajo de automatización

El flujo de trabajo de automatización (Figura 1) comienza cuando el sistema transfiere los volúmenes requeridos de tres reactivos madre (desnaturalizante Gly-X, N-glicanasa y el InstantDye seleccionado) desde los viales a una placa de 96 pocillos "de origen". El número de pocillos para cada reactivo transferido coincide con el número de muestras que se va a procesar. Las muestras de glicoproteínas se mueven a continuación desde la placa de muestras a los pocillos de la placa de origen que contiene reactivos transferidos, se mezclan y se devuelven a la misma placa. A continuación se incuba la misma placa a la temperatura especificada.

De este modo, todas las incubaciones se realizan en la misma placa y las pipetas multicanal pueden usarse para transferir las muestras desde la placa de muestras a la de origen y de nuevo a la de muestras.

Después de la adición de desnaturalizante Gly-X, las muestras se incuban a 90 °C durante 3 minutos. Después de la transferencia de N-glicanasa, la placa de muestras se incuba a 50 °C durante 5 minutos. La desglicosilación es seguida de la adición de reactivos de marcado y de la incubación durante 1 min a 50 °C. Posteriormente, las muestras se transfieren a la placa de limpieza Gly-X y se lavan con el módulo de presión positiva Hamilton [MPE]² en la cubierta Nimbus con un gradiente de presión. El tampón de elución para los N-glicanos marcados con InstantPC se incluye en el kit; los glicanos marcados con InstantQ eluyen en agua desionizada. Los N-glicanos marcados eluyen con 100 µl de eluyente en una placa de PCR y están listos para su análisis mediante LC/MS (InstantPC) o CE (InstantQ) usando el sistema de análisis de glicanos Agilent Gly-Q (anteriormente ProZyme).

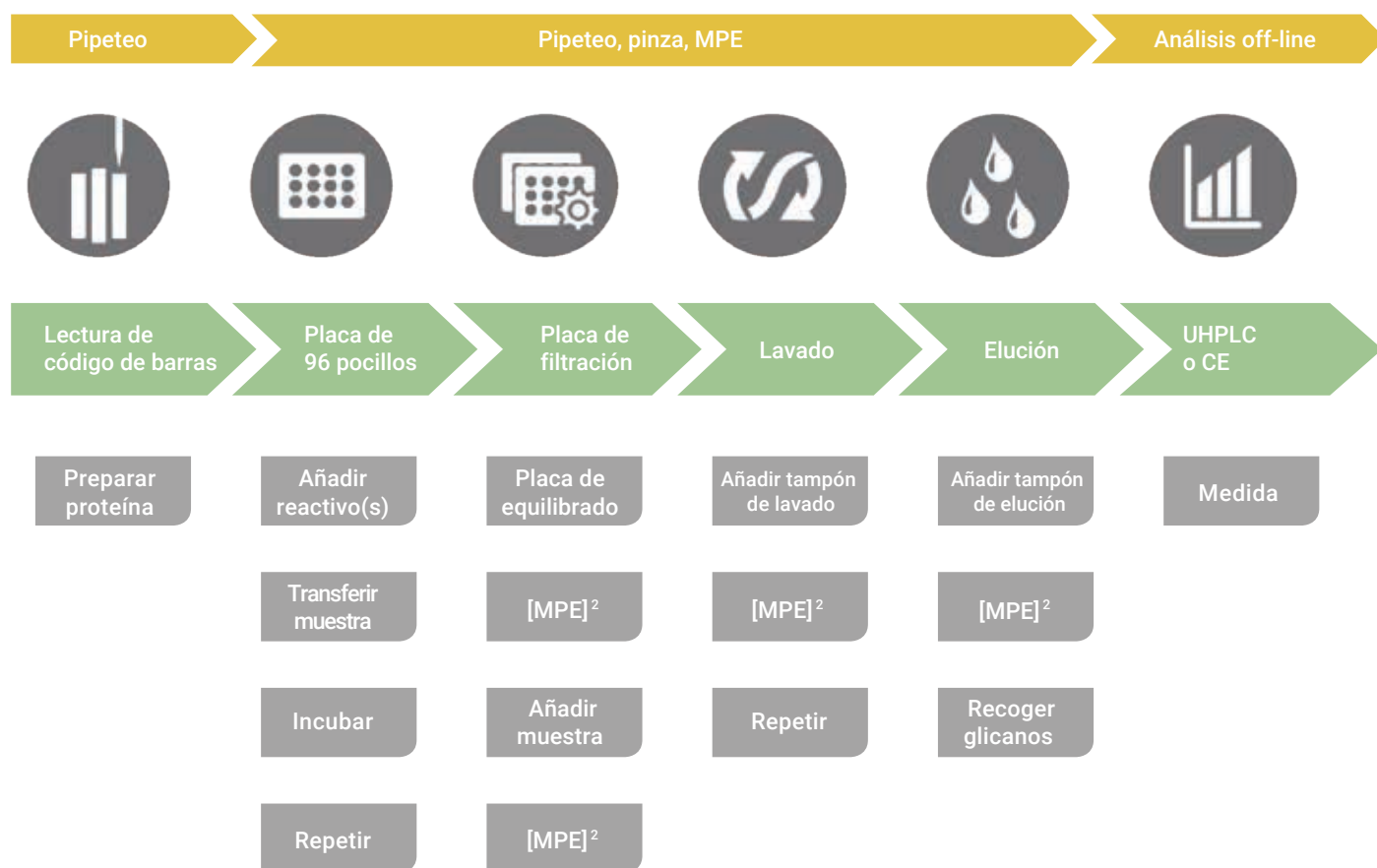


Figura 1: Visión general de la automatización: Flujo de trabajo en Hamilton NIMBUS para los kits de preparación de N-glicanos Agilent AdvanceBio Gly-X con InstantPC e InstantQ.

Configuración de la cubierta

Cargar consumibles y componentes del kit

- Cargar puntas, de 50 µl y de 1.000 µl
- Cargar placa de origen de reactivos: Placa de PCR, con semifaldón
- Cargar pila de placas de limpieza Gly-X
- Cargar placa de recogida Gly-X o placa de PCR con faldón

Cargar reactivos del kit

Desnaturalizante Gly-X:

Diluir 1:1 con agua desionizada en un vial de 0,5 ml

- Colocar en un bloque de reactivos

Solución de trabajo de N-glicanasa: preparar con tampón de digestión siguiendo las instrucciones del kit; después, diluir la mezcla 1:1 con agua desionizada en un vial de 0,5 ml

- Colocar en un bloque de reactivos

InstantDyes: preparar de acuerdo con las instrucciones del kit

- Colocar en un vial de 0,5 ml en el bloque de reactivos

Cargar los tampones necesarios

Tampón de carga/lavado

- Para InstantPC, prepare 100 ml de tampón de carga/lavado y coloque en surco en la cubierta
- Para InstantQ, colocar etanol en surco en la cubierta

Reactivos de elución

- Para InstantPC, añadir el eluyente Gly-X InstantPC proporcionado en el kit en surco en la cubierta
- Para InstantQ, colocar agua en surco en la cubierta

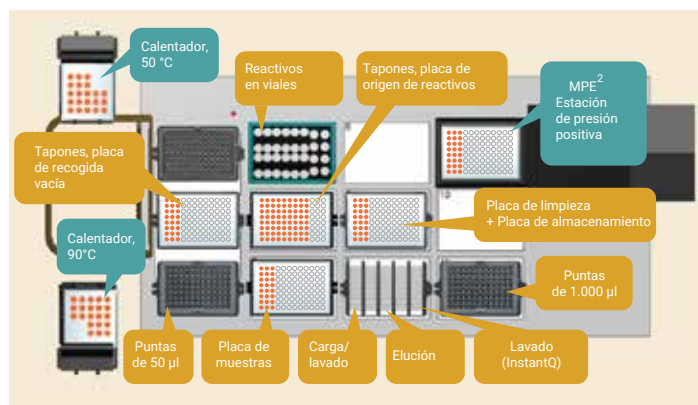


Figura 2: Disposición de la cubierta del Hamilton NIMBUS. Ubicación de placas, viales, surcos, calentadores y colector de presión positiva MPE.

Resultados fiables

Se colocaron la proteína de fusión Enbrel y blancos de controles con agua en la placa de muestras en una disposición de tablero de ajedrez con el fin de verificar el rendimiento entre pocillos y comprobar si había mezclas. La prueba se llevó a cabo tanto para el tinte InstantPC (mediante UHPLC) como para el tinte InstantQ (mediante CE con el sistema Gly-Q). En la gráfica siguiente se muestra cómo se obtuvieron datos similares independientemente del método usado durante el desarrollo del protocolo de automatización.

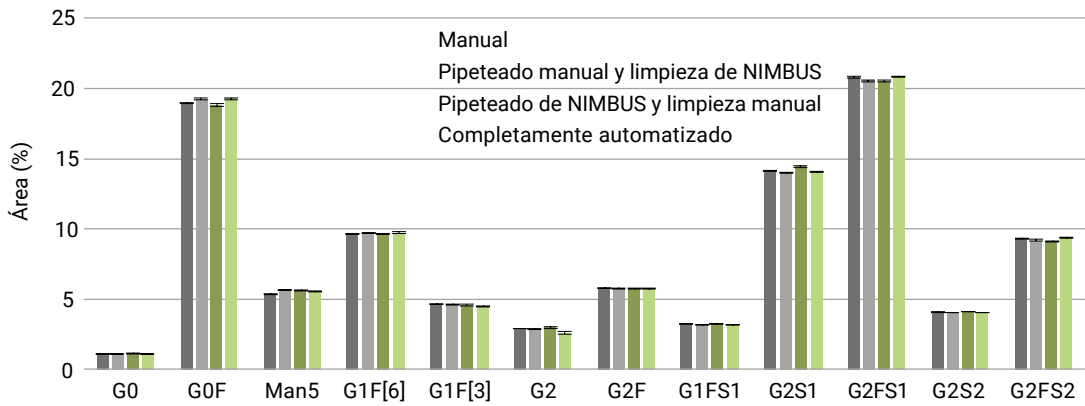


Figura 3: N-glicanos de Enbrel marcados con InstantPC preparados por distintos métodos (n=8).

Información para pedidos

AdvanceBio Gly-X con InstantPC

Kits y módulos

Descripción	Referencia
Kit AdvanceBio Gly-X con InstantPC (96 ct)	GX96-IPC
Kit AdvanceBio Gly-X con InstantPC (24 ct)	GX24-IPC
AdvanceBio Gly-X con conjunto de módulo de desglicosilación y marcado InstantPC (96 ct)	GX96-201PC
AdvanceBio Gly-X con conjunto de módulo de desglicosilación y marcado InstantPC (24 ct)	GX24-201PC
Módulo de marcado AdvanceBio Gly-X InstantPC (96 ct)	GX96-101
Módulo de marcado AdvanceBio Gly-X InstantPC (24 ct)	GX24-101
Módulo de limpieza AdvanceBio Gly-X InstantPC para InstantPC (96 ct)	GX96-102
Espaciador de colector de vacío AdvanceBio Gly-X (2/paq.)	GX100
Kit de purificación de afinidad de proteína A AssayMAP PA50 (96 ct)	Kit G5524-60010

AdvanceBio Gly-X con InstantQ

Kits y módulos

Descripción	Referencia
Kit AdvanceBio Gly-X con InstantQ (96 ct)	GX96-IQ
Kit AdvanceBio Gly-X con InstantQ (24 ct)	GX24-IQ
AdvanceBio Gly-X con conjunto de módulo de desglicosilación y marcado InstantQ (96 ct)	GX96-302IQ
AdvanceBio Gly-X con conjunto de módulo de desglicosilación y marcado InstantQ (24 ct)	GX24-302IQ
Módulo de marcado AdvanceBio Gly-X InstantQ (96 ct)	GX96-301
Módulo de marcado AdvanceBio Gly-X InstantQ (24 ct)	GX24-301
Módulo de limpieza AdvanceBio Gly-X InstantPC para InstantPC (96 ct)	GX96-302
Espaciador de colector de vacío AdvanceBio Gly-X (2/paq.)	GX100
Kit de purificación de afinidad de proteína A AssayMAP PA50 (96 ct)	Kit G5524-60010
Módulo de cartucho Gly-Q	GQ103
Sialidasa A	GK80040
Sialidasa S	GK80021

Información para pedidos
AdvanceBio Gly-X con InstantPC

Patrones y controles

Patrones de glicanos individuales con marcado InstantPC		Referencia
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

Patrones y controles

Bibliotecas de N-glicanos marcados 0,3462 calcon InstantPC	Referencia
Biblioteca AdvanceBio de N-glicanos IgG humanos	GKPC-005
Homopolímero de glucosa	GKPC-503
Biblioteca de N-glicanos CHO mAb	GKPC-020
Biblioteca de N-glicanos CHO mAb + glicoproteína CHO mAb	GKPC-020-P
Biblioteca de triantenarios sialilados $\alpha(2-3)$	GKPC-233
Biblioteca de triantenarios sialilados $\alpha(2-6)$	GKPC-263
Biblioteca de tetraantenarios sialilados $\alpha(2-3)$	GKPC-234
Biblioteca de tetraantenarios sialilados $\alpha(2-6)$	GKPC-264

Información para pedidos

AdvanceBio Gly-X con InstantQ

Patrones y controles

Patrones de N-glicanos individuales Referencia
con marcado InstantQ

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

AdvanceBio Gly-X con InstantQ

Patrones y controles

Patrones de N-glicanos individuales Referencia
con marcado InstantQ

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

Biblioteca de N-glicanos InstantQ

Referencia

Biblioteca de N-glicanos IgG humanos	GKSQ-005
Biblioteca de N-glicanos RNAsa B	GKSQ-009
Biblioteca de N-glicanos CHO mAb	GKSQ-020
Biblioteca de N-glicanos CHO mAb + glicoproteína CHO mAb	GKSQ-020-P
Biblioteca de triantenarios sialilados α(2-3)	GKSQ-233
Biblioteca de triantenarios sialilados α(2-3)	GKSQ-234
Biblioteca de triantenarios sialilados α(2-6)	GKSQ-263
Biblioteca de tetraantenarios sialilados α(2-6)	GKSQ-264

Patrones de migración y escala InstantQ

Referencia

Escalera Gly-Q GU	GKSQ-503
Patrones de migración Gly-Q (superior e inferior)	GKSQ-500
Conjunto de patrones de alineación Gly-Q (GKSQ-500 y GKSQ-503)	GKSQ-505

Encuentre más productos para el análisis de glicanos:
www.agilent.com/chem/glycananalysis

Obtenga más información sobre las soluciones de Agilent para
atributos de calidad críticos:
www.agilent.com/chem/advancebio

Exclusivamente para uso en investigación. Prohibido su uso en procedimientos diagnósticos.

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Publicado en EE. UU., 7 de junio de 2019
5994-1003ES