

# Automatisation de la préparation AdvanceBio Gly-X Glycan d'Agilent avec les marqueurs rapides InstantDyes

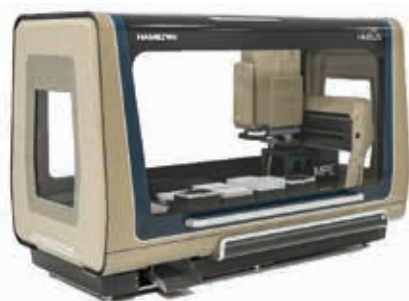
Gagnez du temps dans la préparation d'échantillons avec les kits AdvanceBio Gly-X



## Préparation d'échantillons de N-Glycanes sans surveillance avec AdvanceBio Gly-X d'Agilent

L'automatisation permet de réduire le temps de manipulation, les erreurs d'utilisateur et la variabilité des données. Chaque étape du protocole de la préparation Gly-X Glycan d'Agilent avec InstantDye (anciennement ProZyme), y compris la déglycosylation, le marquage et le nettoyage rapides, s'effectue dans des plaques à 96 puits. Les kits Gly-X sont donc directement compatibles avec la plupart des stations de pipetage, sans rien modifier et sans nécessiter de composants ou formats de kit particuliers.

Les échantillons de N-glycanes Gly-X peuvent être préparés manuellement ou sur une station automatique permettant une utilisation souple et efficace des modules du kit en fonction des besoins en matière de cadence et d'analyse.



40 µg de glycoprotéines

3 min. de dénaturation

5 min. de digestion N-Glycanase

Glycanes libérés

1 min. de marquage InstantPC

Glycanes marqués

Plaque de nettoyage à 96 puits

UHPLC, LC/MS, CE

Traitement des données

## Voici comment décupler votre productivité :

- Les kits Gly-X conviennent aux méthodes manuelles et automatisées
- La méthode automatisée produit des données cohérentes avec celles d'une procédure manuelle
- Utilisation souple des modules du kit d'une méthode à l'autre
- Démontré pour les marquages LC/MS et CE



## Ensemble, faisons avancer les glycosciences.

Avec l'intégration des produits et services ProZyme, Agilent propose une offre unique d'instruments et de consommables, allant de l'échantillon à la réponse fiable. Notre expertise couvre désormais l'ensemble du processus de l'analyse des glycanes afin que vous puissiez facilement et rapidement obtenir les résultats fiables et reproductibles dont vous avez besoin.

### Pour en savoir plus :

[www.agilent.com/chem/better-together](http://www.agilent.com/chem/better-together)

## Recommandations générales

La déglycosylation Gly-X des N-glycanes et le marquage avec InstantDye s'effectuent dans une plaque à 96 puits. Le nettoyage a lieu dans une plaque d'extraction à 96 puits. Pour utiliser les kits Gly-X sur une plateforme de pipetage automatique, les volumes doivent se situer entre 4 et 400 µL. La plateforme doit prévoir des emplacements pour les flacons, les réservoirs et les plaques à 96 puits. Elle doit également permettre le déplacement des plaques à 96 puits entre les différentes stations du plateau.

La déglycosylation Gly-X et le marquage nécessitent deux températures d'incubation (50 °C et 90 °C) et sont réalisés dans une plaque de PCR à 96 puits. Ces étapes s'effectuent généralement au moyen de deux blocs chauffants ou d'un thermocycleur sur le plateau.

Le nettoyage Gly-X est réalisé dans une plaque d'extraction à 96 puits pour laquelle on recommande un manifold automatique à pression positive intégré. Il est également possible d'utiliser un manifold d'extraction sous vide à la place.

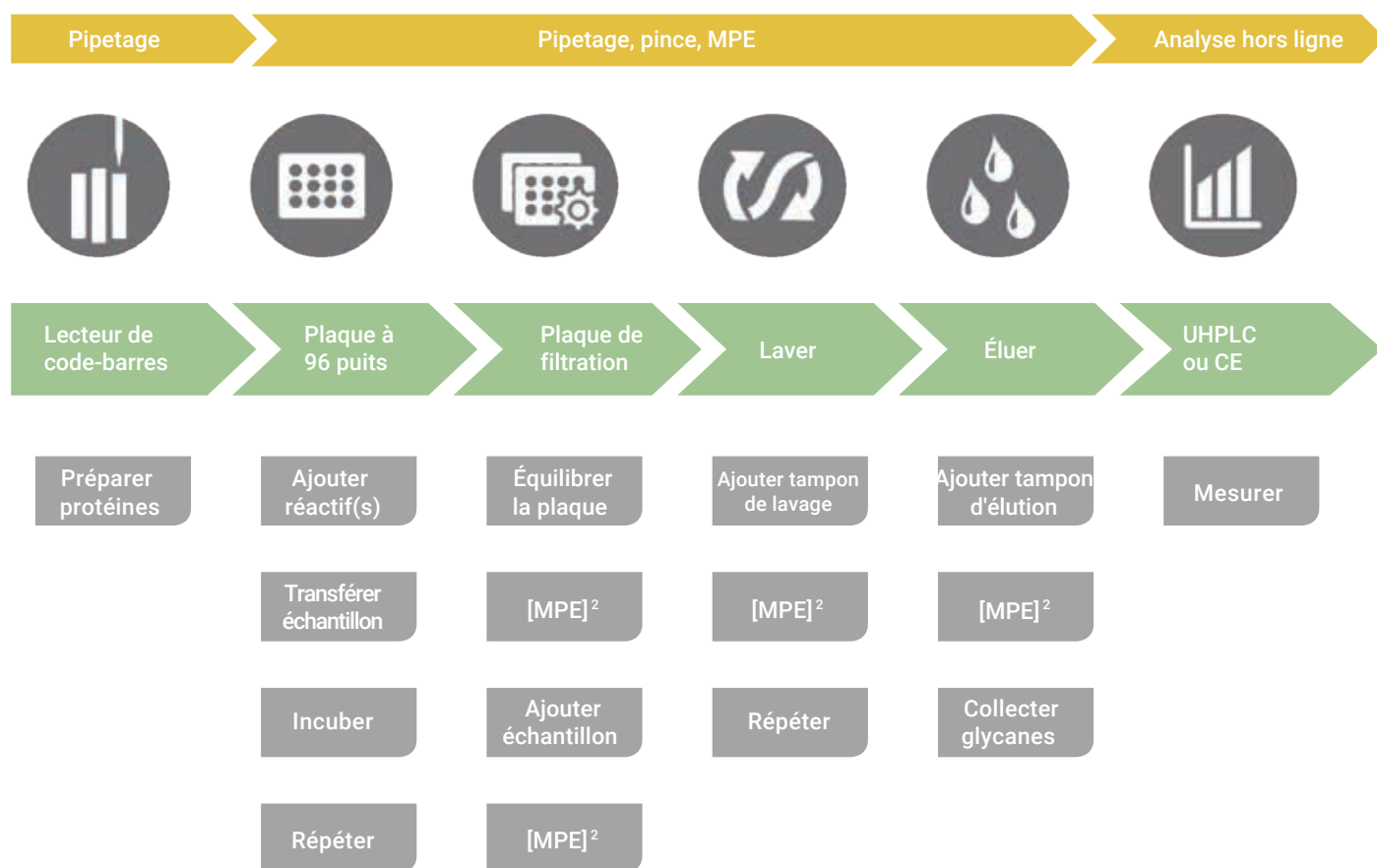
Après la plaque de nettoyage, les N-glycanes marqués sont élués dans une plaque de PCR à l'aide du manifold à pression positive.

## Procédure d'automatisation

La procédure d'automatisation (Figure 1) commence par le transfert des volumes requis des trois réactifs de base (dénaturant Gly-X, N-Glycanase et InstantDye choisis) des flacons vers une plaque à 96 puits « source ». Pour chaque réactif transféré, le nombre de puits correspond au nombre d'échantillons à analyser. Les échantillons de glycoprotéines sont ensuite ajoutés dans les puits de la plaque source contenant les réactifs, ils sont mélangés et remis dans la plaque à échantillons. Cette plaque est alors incubée à la température indiquée.

Toutes les incubations sont ainsi effectuées dans la plaque à échantillons, et il est possible d'utiliser des pipettes multi-canaux pour transférer les échantillons de la plaque à échantillons à la plaque source, avant de les remettre dans la plaque à échantillons.

Après ajout de dénaturant Gly-X, les échantillons sont incubés à 90 °C pendant 3 minutes. Une fois la N-Glycanase transférée, la plaque à échantillons est incubée à 50 °C pendant 5 minutes. La déglycosylation est suivie par l'ajout des réactifs de marquage et une minute d'incubation à 50 °C. Les échantillons sont alors transférés dans la plaque de nettoyage Gly-X, puis lavés à l'aide du module à pression positive Hamilton [MPE]2 sur le plateau Nimbus en utilisant un gradient de pression. Le tampon d'élution des N-glycanes marqués InstantPC est inclus dans le kit ; l'élution des N-glycanes marqués InstantQ est réalisée dans de l'eau déionisée. Les N-glycanes marqués sont élués avec 100 µL d'éluant dans une plaque de PCR et prêts à être analysés par les méthodes LC/MS (InstantPC) ou CE (InstantQ) à l'aide du système d'analyse des glycanes Gly-Q d'Agilent (anciennement ProZyme).



**Figure 1 :** Automatisation – vue d'ensemble : Protocole avec l'Hamilton NIMBUS pour les kits de préparation des N-glycanes AdvanceBio Gly-X d'Agilent avec InstantPC et InstantQ.

## Configuration du plateau

### Chargement des consommables et des composants du kit

- Charger les pointes, 50  $\mu$ L et 1 000  $\mu$ L
- Charger la plaque source avec les réactifs : plaque source, semi-jupée
- Charger une pile de plaques de nettoyage Gly-X
- Charger la plaque de récupération Gly-X ou la plaque de PCR semi-jupée

### Chargement des réactifs du kit

Dénaturant Gly-X –

Diluer 1:1 avec de l'eau déionisée dans un flacon de 0,5 mL

- Mettre un bloc de réactif

Solution de travail N-Glycanase – Préparer avec le tampon de digestion selon les instructions du kit, puis diluer le mélange 1:1 avec de l'eau déionisée dans un flacon de 0,5 mL

- Mettre un bloc de réactif

InstantDyes – Préparer selon les instructions du kit

- Mettre un flacon de 0,5 mL dans le bloc de réactif

### Chargement des tampons requis

Charger/laver les tampons

- Pour InstantPC, préparer 100 mL de tampon de chargement/lavage et placer dans un réservoir sur le plateau
- Pour InstantQ, mettre de l'éthanol dans un réservoir sur le plateau

Réactifs d'élution

- Pour InstantPC, ajouter l'éluant Gly-X InstantPC fourni avec le kit dans un réservoir sur le plateau
- Pour InstantQ, mettre de l'eau dans un réservoir sur le plateau

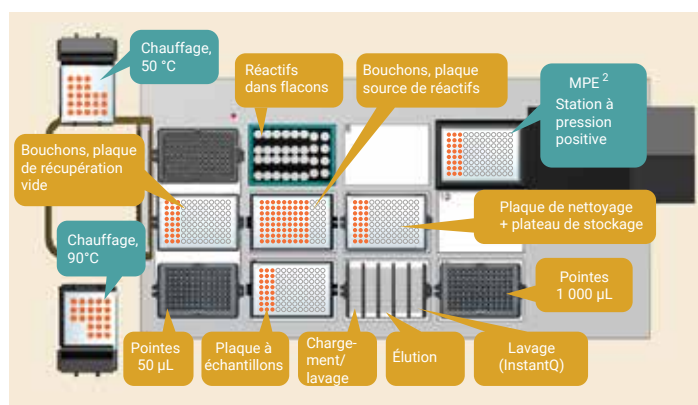


Figure 2 : Agencement du plateau Hamilton NIMBUS. Emplacement des plaques, flacons, réservoirs, blocs chauffants et manifold à pression positive MPE.

Des résultats fiables

La protéine de fusion Enbrel et les blancs d'eau ont été placées dans la plaque à échantillons selon une configuration en damier pour vérifier la performance entre les puits et toute réaction croisée éventuelle. Le test a été réalisé à la fois pour les colorants InstantPC (par UHPLC) et InstantQ (par CE, avec le système Gly-Q). Le tableau ci-dessous indique les données similaires obtenues, indifféremment de la méthode utilisée lors du développement du protocole d'automatisation.

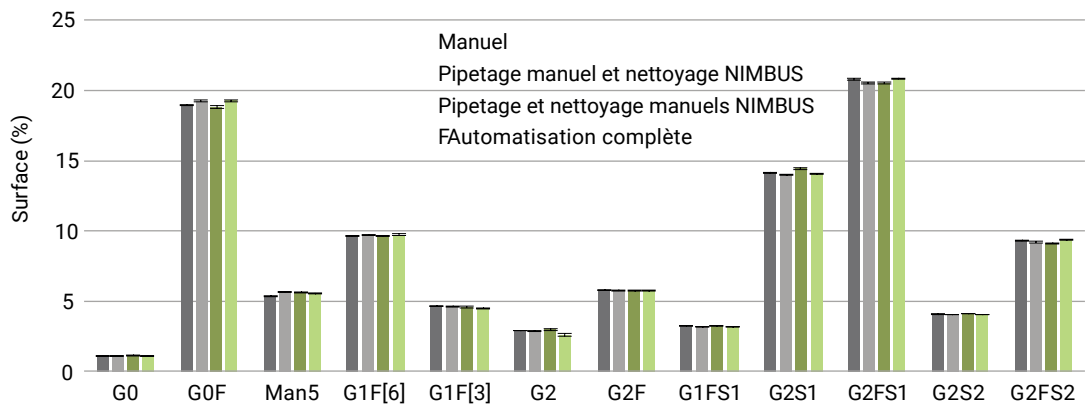


Figure 3 : N-glycanes d'Enbrel marqués InstantPC et préparés selon diverses méthodes (n=8).

## Informations pour commander

### AdvanceBio Gly-X avec InstantPC

#### Kits et modules

| Description                                                                            | Référence       |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Kit AdvanceBio Gly-X avec InstantPC (96 ct)                                            | GX96-IPC        |
| Kit AdvanceBio Gly-X avec InstantPC (24 ct)                                            | GX24-IPC        |
| Ensemble AdvanceBio Gly-X avec déglycosylation InstantPC et module de marquage (96 ct) | GX96-201PC      |
| Ensemble AdvanceBio Gly-X avec déglycosylation InstantPC et module de marquage (24-ct) | GX24-201PC      |
| Module de marquage AdvanceBio Gly-X InstantPC (96-ct)                                  | GX96-101        |
| Module de marquage AdvanceBio Gly-X InstantPC (24-ct)                                  | GX24-101        |
| Module de nettoyage AdvanceBio Gly-X InstantPC pour InstantPC (96-ct)                  | GX96-102        |
| Entretoise de manifold sous vide AdvanceBio Gly-X (2 paquets)                          | GX100           |
| Kit de purification par affinité avec protéine A AssayMAP PA50 (96 ct)                 | KIT G5524-60010 |

### AdvanceBio Gly-X avec InstantQ

#### Kits et modules

| Description                                                                           | Référence       |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Kit AdvanceBio Gly-X avec InstantQ (96 ct)                                            | GX96-IQ         |
| Kit AdvanceBio Gly-X avec InstantQ (24 ct)                                            | GX24-IQ         |
| Ensemble AdvanceBio Gly-X avec déglycosylation InstantQ et module de marquage (96 ct) | GX96-302IQ      |
| Ensemble AdvanceBio Gly-X avec déglycosylation InstantQ et module de marquage (24-ct) | GX24-302IQ      |
| Module de marquage AdvanceBio Gly-X InstantQ (96-ct)                                  | GX96-301        |
| Module de marquage AdvanceBio Gly-X InstantQ (24-ct)                                  | GX24-301        |
| Module de nettoyage AdvanceBio Gly-X InstantPC pour InstantPC (96-ct)                 | GX96-302        |
| Entretoise de manifold sous vide AdvanceBio Gly-X (2 paquets)                         | GX100           |
| Kit de purification par affinité avec protéine A AssayMAP PA50 (96 ct)                | KIT G5524-60010 |
| Module de cartouche du Gly-Q                                                          | GQ103           |
| Sialidase A                                                                           | GK80040         |
| Sialidase S                                                                           | GK80021         |

## Informations pour commander

### AdvanceBio Gly-X avec InstantPC

#### Étalons et contrôles

##### Étalons de glycanes individuels marqués InstantPC

##### Référence

|              |                                                                                     |          |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 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 (α2,3)  |    | GKPC-329 |
| G1S1 (α2,6)  |   | GKPC-319 |
| G1FS1 (α2,3) |  | GKPC-330 |
| G1S1 (α2,6)  |  | GKPC-320 |
| G2S1 (α2,3)  |  | GKPC-321 |
| G2S1 (α2,6)  |  | GKPC-311 |
| G2FS1 (α2,3) |  | GKPC-325 |
| G2FS1 (α2,6) |  | GKPC-315 |
| G2S2 (α2,3)  |  | GKPC-322 |
| G2S2 (α2,6)  |  | GKPC-312 |
| G2FS2 (α2,3) |  | GKPC-323 |
| G2FS2 (α2,6) |  | GKPC-313 |
| Man5         |  | GKPC-103 |
| Man6         |  | GKPC-104 |
| Man7         |  | GKPC-105 |
| Man8         |  | GKPC-106 |
| Man9         |  | GKPC-107 |

#### Étalons et contrôles

##### Bibliothèque de N-glycanes marqués InstantPC

##### Référence

|                                                                        |            |
|------------------------------------------------------------------------|------------|
| Bibliothèque de N-glycanes d'IgG humaines AdvanceBio                   | GKPC-005   |
| Homopolymère de glucose                                                | GKPC-503   |
| Bibliothèque de glycanes N-glycosylés mAb CHO                          | GKPC-020   |
| Bibliothèque de glycanes N-glycosylés mAb CHO + glycoprotéines mAb CHO | GKPC-020-P |
| Bibliothèque de tri-antennés sialylés α(2-3)                           | GKPC-233   |
| Bibliothèque de tri-antennés sialylés α(2-6)                           | GKPC-263   |
| Bibliothèque de tétra-antennés sialylés α(2-3)                         | GKPC-234   |
| Bibliothèque de tétra-antennés sialylés α(2-6)                         | GKPC-264   |

## AdvanceBio Gly-X avec InstantQ

| Étalons de N-glycanes individuels<br>marqués InstantQ | Référence |
|-------------------------------------------------------|-----------|
|-------------------------------------------------------|-----------|

|             |  |          |
|-------------|--|----------|
| 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 |

Pour en savoir plus sur les solutions Agilent destinées aux attributs de qualité essentielles :

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

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

## AdvanceBio Gly-X avec InstantQ

| Étalons de N-glycanes individuels<br>marqués InstantQ | Référence |
|-------------------------------------------------------|-----------|
|-------------------------------------------------------|-----------|

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

| Banques de N-glycanes InstantQ                                         | Référence  |
|------------------------------------------------------------------------|------------|
| Bibliothèque de N-glycanes d'IgG humaines                              | GKSQ-005   |
| Bibliothèque de glycanes N-glycosylés RNase B                          | GKSQ-009   |
| Bibliothèque de glycanes N-glycosylés mAb CHO                          | GKSQ-020   |
| Bibliothèque de glycanes N-glycosylés mAb CHO + glycoprotéines mAb CHO | GKSQ-020-P |
| Bibliothèque de tri-antennés sialylés $\alpha(2-3)$                    | GKSQ-233   |
| Bibliothèque de tri-antennés sialylés $\alpha(2-3)$                    | GKSQ-234   |
| Bibliothèque de tri-antennés sialylés $\alpha(2-6)$                    | GKSQ-263   |
| Bibliothèque de tétra-antennés sialylés $\alpha(2-6)$                  | GKSQ-264   |

| Dosage InstantQ et étalons de migration                | Référence |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| Dosage des unités de glucose Gly-Q                     | GKSQ-503  |
| Étalons de migration Gly-Q (supérieurs et inférieurs)  | GKSQ-500  |
| Jeu d'étalons d'alignement Gly-Q (GKSQ-500 & GKSQ-503) | GKSQ-505  |

