

Automazione della preparazione dei glicani mediante Agilent AdvanceBio Gly-X con InstantDye

Preparazione del campione automatizzata con i kit AdvanceBio Gly-X

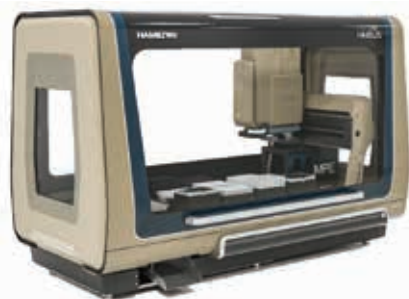


Preparazione dei campioni di N-glicani automatizzata con Agilent AdvanceBio Gly-X

L'automazione può ridurre il tempo di manipolazione, gli errori dell'operatore e la variabilità dei dati.

Tutte le fasi del protocollo di preparazione dei glicani Agilent Gly-X con InstantDye (precedentemente ProZyme), incluse la deglicosilazione rapida, la marcatura e la purificazione, sono eseguite in piastre a 96 pozzetti. Ciò rende i kit Gly-X direttamente compatibili con la maggior parte delle postazioni per la manipolazione dei liquidi, senza alcuna modifica e senza il bisogno di speciali componenti o formati dei kit.

La preparazione dei campioni di N-glicani Gly-X può essere effettuata manualmente o utilizzando una postazione di automazione, per un uso flessibile ed efficiente dei moduli del kit in base alle esigenze di produttività e di flusso di lavoro.



40 µg glicoproteina

3 min denaturazione

5 min digestione con
N-Glicanasi

Glicani rilasciati

Marcatura con InstantPC, 1 min

Glicani marcati

Piastra di purificazione
a 96 pozzetti

UHPLC, LC/MS, CE

Analisi dei dati

La produttività aumenta grazie a:

- i kit Gly-X supportano sia metodi manuali che automatizzati
- il metodo automatizzato genera dati coerenti con quelli del flusso di lavoro manuale
- uso flessibile dei moduli del kit tra i due metodi
- efficacia dimostrata per marcature sia per LC/MS che per CE



Far progredire le glicoscienze, insieme.

Con l'aggiunta dei prodotti e dei servizi ProZyme, Agilent si propone come fornitore unico di strumenti e di prodotti di consumo, dal campione a risposte affidabili.

Le nostre competenze includono ora il flusso di lavoro completo per l'analisi dei glicani, in modo che tu possa ottenere facilmente i risultati affidabili e riproducibili di cui hai bisogno.

Per maggiori informazioni:

www.agilent.com/chem/better-together

Linee guida generali

La deglicosilazione degli N-glicani con Gly-X e la marcatura con InstantDye sono effettuate su piastra a 96 pozzetti.

La purificazione è effettuata in vuoto su piastra a 96 pozzetti.

Per automatizzare i kit Gly-X, il requisito per la piattaforma di automazione per quanto riguarda la pipettatura è di un volume compreso tra 4 e 400 µL. La piattaforma deve offrire posizioni per vial, vaschette e piastre a 96 pozzetti. La piattaforma deve inoltre supportare lo spostamento delle piastre a 96 pozzetti tra differenti postazioni del deck.

La deglicosilazione con Gly-X e la marcatura richiedono due temperature di incubazione (50 °C e 90 °C) e sono eseguite su piastra per PCR a 96 pozzetti. Queste fasi vengono generalmente eseguite con blocchi riscaldanti o con un termociclatore integrati sul deck.

La purificazione con Gly-X è eseguita in vuoto su piastra a 96 pozzetti per cui si raccomanda l'uso di un manifold a pressione positiva automatizzato integrato. È anche possibile utilizzare un vacuum manifold integrato.

Gli N-glicani marcati vengono eluiti dalla piastra di purificazione in una piastra per PCR, fase eseguita anch'essa nel manifold a pressione positiva.

Flusso di lavoro automatizzato

Il flusso di lavoro automatizzato (Figura 1) ha inizio con il sistema che trasferisce i volumi richiesti di tre reagenti stock (Gly-X Denaturant [denaturante], N-Glicanasi e il reagente InstantDye scelto) dai vial alla piastra "sorgente" a 96 pozzetti. Il numero di pozzetti per ogni reagente trasferito corrisponde al numero di campioni da trattare. I campioni di glicoproteina vengono quindi spostati dalla piastra per campioni nei pozzetti della piastra sorgente contenente i reagenti, miscelati e riportati nella piastra per campioni. La piastra per campioni viene quindi messa in incubazione alla temperatura specificata.

In questo modo, tutte le fasi di incubazione vengono effettuate nella piastra per campioni e per trasferire i campioni dalla piastra per campioni alla piastra sorgente e viceversa si possono utilizzare pipette multicanale.

Dopo l'aggiunta di Gly-X Denaturant, i campioni vengono messi in incubazione a 90 °C per 3 minuti. Successivamente al trasferimento della N-Glicanasi, la piastra per campioni viene messa in incubazione a 50 °C per 5 minuti. La deglicosilazione è seguita dall'aggiunta di reagenti di marcatura e dall'incubazione a 50 °C per 1 minuto. I campioni vengono quindi trasferiti nella piastra di purificazione Gly-X e lavati mediante il modulo a pressione positiva Hamilton [MPE]² sul deck Nimbus utilizzando un gradiente di pressione. Il tampone di eluizione per N-glicani marcati con InstantPC è incluso nel kit, il tampone di eluizione per i glicani marcati con InstantQ è acqua deionizzata. Gli N-glicani marcati sono eluiti con 100 µL di eluente in una piastra per PCR e sono pronti per l'analisi mediante LC/MS (InstantPC) o CE (InstantQ) con il sistema di analisi dei glicani Agilent Gly-Q (precedentemente ProZyme).

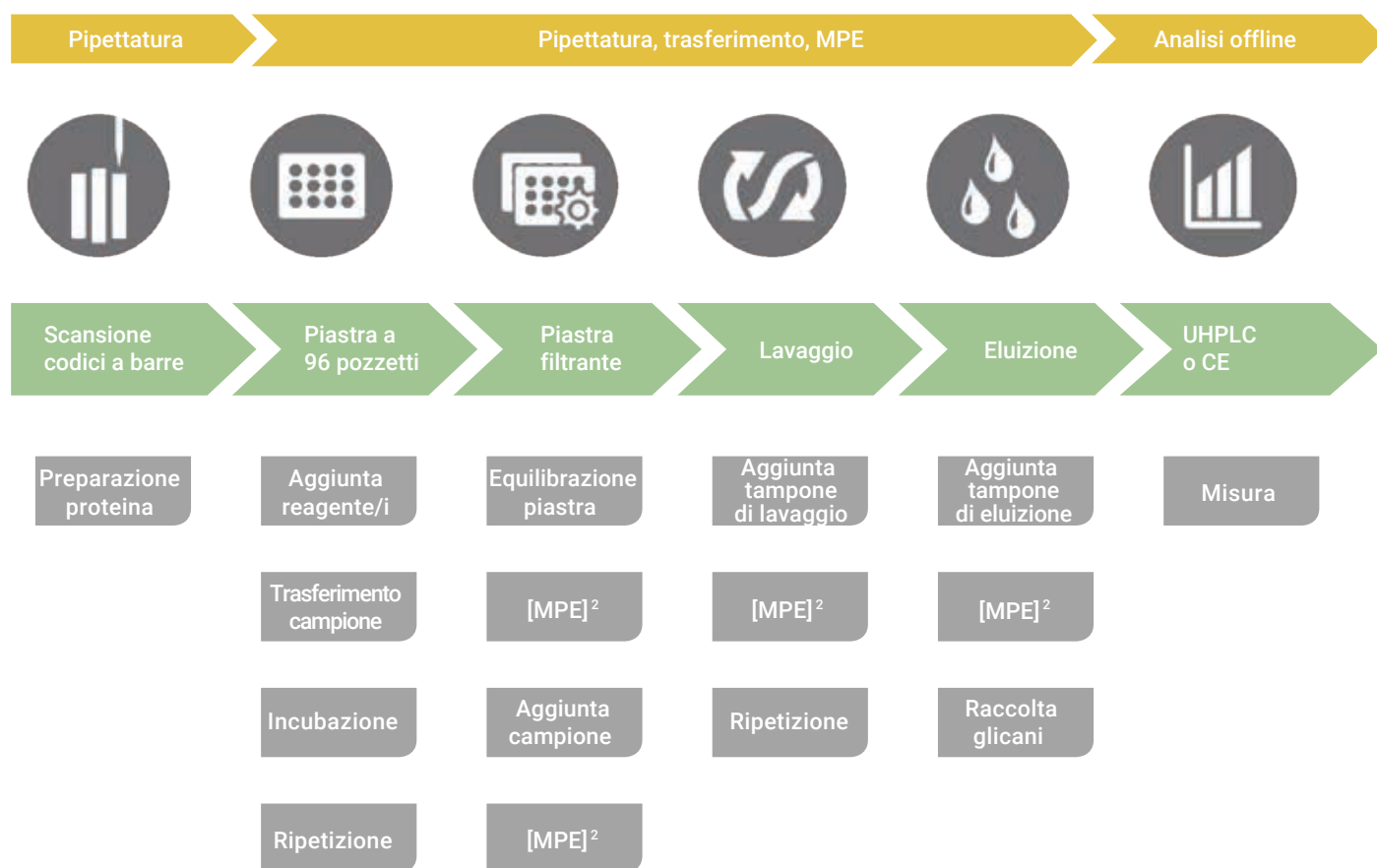


Figura 1: Panoramica dell'automazione: flusso di lavoro su Hamilton NIMBUS per la preparazione di N-glicani con Agilent AdvanceBio Gly-X con i kit InstantPC e InstantQ.

Configurazione del deck

Caricamento di prodotti di consumo e di componenti del kit

- Caricare i puntali, 50 μ L e 1.000 μ L
- Caricare la piastra sorgente con i reagenti: piastra per PCR, con bordo parziale
- Caricare lo stack di piastre di purificazione Gly-X
- Caricare la piastra di raccolta Gly-X o la piastra per PCR con bordo

Caricamento dei reagenti del kit

Gly-X Denaturant –

Diluire 1:1 con acqua deionizzata in un vial da 0,5 mL

- Collocare nel blocco dei reagenti

Soluzione di lavoro di N-Glicanasi – Preparare con il tampone di digestione secondo le istruzioni del kit, quindi diluire la miscela 1:1 con acqua deionizzata in un vial da 0,5 mL

- Collocare nel blocco dei reagenti

InstantDye – Preparare secondo le istruzioni del kit

- Collocare in un vial da 0,5 mL nel blocco dei reagenti

Caricamento dei tamponi richiesti

Tampone di caricamento/lavaggio

- Per InstantPC, preparare 100 mL di tampone di caricamento/lavaggio e collocarlo in una vaschetta sul deck
- Per InstantQ, collocare etanolo in una vaschetta sul deck

Reagenti di eluizione

- Per InstantPC, aggiungere l'eluente Gly-X InstantPC fornito nel kit in una vaschetta sul deck
- Per InstantQ, collocare acqua in una vaschetta sul deck

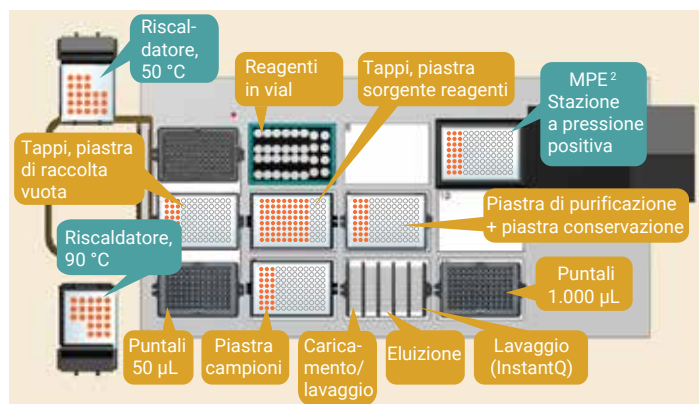


Figura 2: Disposizione del deck Hamilton NIMBUS. Posizione di piastre, vial, vaschette, riscaldatori e MPE manifold a pressione positiva.

Risultati affidabili

La proteina di fusione Enbrel e bianchi di acqua sono stati collocati nella piastra per campioni con una disposizione a scacchiera per verificare le prestazioni tra pozzetto e pozzetto e testare l'eventuale presenza di crossover. Il test è stato effettuato sia per il colorante InstantPC (mediante UHPLC) che per il colorante InstantQ (mediante CE con il sistema Gly-Q). Il seguente grafico mostra che si ottengono dati simili indipendentemente dal metodo usato durante lo sviluppo del protocollo automatizzato.

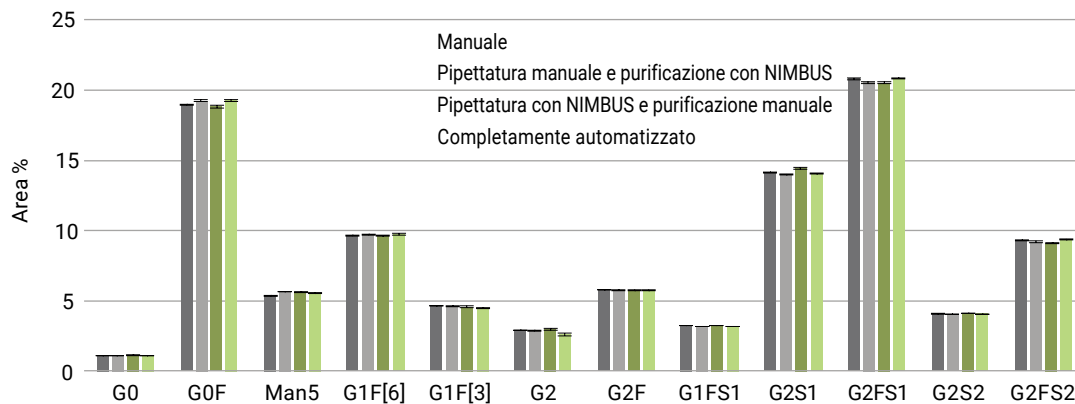


Figura 3: N-glicani di Enbrel marcati con InstantPC preparati con vari metodi (n=8).

Informazioni per gli ordini

AdvanceBio Gly-X con InstantPC

Kit e moduli

Descrizione	Codice
Kit AdvanceBio Gly-X con InstantPC (96 campioni)	GX96-IPC
Kit AdvanceBio Gly-X con InstantPC (24 campioni)	GX24-IPC
Set AdvanceBio Gly-X con modulo di deglicosilazione e marcatura InstantPC (96 campioni)	GX96-201PC
Set AdvanceBio Gly-X con modulo di deglicosilazione e marcatura InstantPC (24 campioni)	GX24-201PC
Modulo di marcatura InstantPC AdvanceBio Gly-X (96 campioni)	GX96-101
Modulo di marcatura InstantPC AdvanceBio Gly-X (24 campioni)	GX24-101
Modulo di purificazione InstantPC AdvanceBio Gly-X (96 campioni)	GX96-102
Distanziatore per vacuum manifold AdvanceBio Gly-X (conf. da 2)	GX100
Kit di purificazione per affinità con proteina A AssayMAP PA50 (96 campioni)	G5524-60010 KIT

AdvanceBio Gly-X con InstantQ

Kit e moduli

Descrizione	Codice
Kit AdvanceBio Gly-X con InstantQ (96 campioni)	GX96-IQ
Kit AdvanceBio Gly-X con InstantQ (24 campioni)	GX24-IQ
Set AdvanceBio Gly-X con modulo di deglicosilazione e marcatura InstantQ (96 campioni)	GX96-302IQ
Set AdvanceBio Gly-X con modulo di deglicosilazione e marcatura InstantQ (24 campioni)	GX24-302IQ
Modulo di marcatura InstantQ AdvanceBio Gly-X (96 campioni)	GX96-301
Modulo di marcatura InstantQ AdvanceBio Gly-X (24 campioni)	GX24-301
Modulo di purificazione InstantPC AdvanceBio Gly-X (96 campioni)	GX96-302
Distanziatore per vacuum manifold AdvanceBio Gly-X (conf. da 2)	GX100
Kit di purificazione per affinità con proteina A AssayMAP PA50 (96 campioni)	G5524-60010 KIT
Modulo cartuccia Gly-Q	GQ103
Sialidasi A	GK80040
Sialidasi S	GK80021

Informazioni per gli ordini
AdvanceBio Gly-X con InstantPC

Standard e controlli

Standard di singoli N-glicani marcati Codice con InstantPC

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

Standard e controlli

Librerie di N-glicani marcati con InstantPC

Codice

Libreria AdvanceBio di glicani N-linked IgG umane	GKPC-005
Glucosio omopolimero	GKPC-503
Libreria di glicani N-linked CHO mAb	GKPC-020
Libreria di glicani N-linked CHO mAb + glicoproteina CHO mAb	GKPC-020-P
Libreria di tetra-antennari sialilati $\alpha(2-3)$	GKPC-233
Libreria di tetra-antennari sialilati $\alpha(2-6)$	GKPC-263
Libreria di tetra-antennari sialilati $\alpha(2-3)$	GKPC-234
Libreria di tetra-antennari sialilati $\alpha(2-6)$	GKPC-264

Informazioni per gli ordini

AdvanceBio Gly-X con InstantQ

Standard e controlli

Standard di singoli N-glicani marcati Codice con 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

Standard e controlli

Standard di singoli N-glicani marcati Codice con InstantQ

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

Librerie di N-glicani marcati con InstantQ Codice

Libreria di N-glicani IgG umane	GKSQ-005
Libreria di glicani N-linked ribonucleasi B	GKSQ-009
Libreria di glicani N-linked CHO mAb	GKSQ-020
Libreria di glicani N-linked CHO mAb + glicoproteina CHO mAb	GKSQ-020-P
Libreria di tetra-antennari sialilati α(2-3)	GKSQ-233
Libreria di tetra-antennari sialilati α(2-3)	GKSQ-234
Libreria di tetra-antennari sialilati α(2-6)	GKSQ-263
Libreria di tetra-antennari sialilati α(2-6)	GKSQ-264

Ladder e standard di migrazione InstantQ Codice

GU Ladder Gly-Q	GKSQ-503
Standard di migrazione Gly-Q (superiore e inferiore)	GKSQ-500
Set di standard di allineamento Gly-Q (GKSQ-500 e GKSQ-503)	GKSQ-505

Trova ulteriori prodotti per l'analisi dei glicani:

www.agilent.com/chem/glycananalysis

Scopri di più sulle soluzioni Agilent per gli attributi critici per la qualità:

www.agilent.com/chem/advancebio

Solo per scopi di ricerca. Non utilizzabile per procedure diagnostiche.

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Pubblicato negli Stati Uniti, 7 giugno 2019
5994-1003ITE