

注意

© Agilent Technologies, Inc. 2025

本マニュアルの内容は米国著作権法および国際著作権法によって保護されており、Agilent Technologies, Inc. の書面による事前の許可なく、本書の一部または全部を複製することはいかなる形態や方法（電子媒体への保存やデータの抽出または他国語への翻訳など）によっても禁止されています。

マニュアル番号

5994-1231JAJP

GX96-IPC

Rev. AK

版

第3版、2025年3月

Printed in Japan

Agilent Technologies, Inc.

保証

このマニュアルの内容は「現状有姿」提供されるものであり、将来の改訂版で予告なく変更されることがあります。

Agilent は、法律上許容される最大限の範囲で、このマニュアルおよびこのマニュアルに含まれるいかなる情報に関しても、明示黙示を問わず、商品性の保証や特定目的適合性の保証を含むいかなる保証も行いません。**Agilent** は、このマニュアルまたはこのマニュアルに記載されている情報の提供、使用または実行に関連して生じた過誤、付随的損害あるいは間接的損害に対する責任を一切負いません。**Agilent** とお客様の間に書面による別の契約があり、このマニュアルの内容に対する保証条項がここに記載されている条件と矛盾する場合は、別に合意された契約の保証条項が適用されます。

技術ライセンス

本書で扱っているハードウェアおよびソフトウェアは、ライセンスに基づき提供されており、それらのライセンス条項に従う場合のみ使用または複製することができます。

権利の制限

米国政府の制限付き権利について：連邦政府に付与されるソフトウェアおよび技術データに係る権利は、エンドユーザーのお客様に通例提供されている権利に限定されています。**Agilent** は、ソフトウェアおよび技術データに係る通例の本商用ライセンスを、FAR 12.211 (Technical Data) および 12.212 (Computer Software)、並びに、国防総省に対しては、DFARS 252.227-7015 (Technical Data -Commercial Items) および DFARS 227.7202-3 (Rights in Commercial Computer Software or Computer Software Documentation) の規定に従い提供します。

安全にご使用いただくために

注意

注意は、取り扱い上、危険があることを示します。正しく実行しなかったり、指示を遵守しないと、製品の破損や重要なデータの損失に至るおそれのある操作手順や行為に対する注意を促すマークです。指示された条件を十分に理解し、条件が満たされるまで、注意を無視して先に進んではなりません。

警告

警告は、取り扱い上、危険があることを示します。正しく実行しなかったり、指示を遵守しないと、人身への傷害または死亡に至るおそれのある操作手順や行為に対する注意を促すマークです。指示された条件を十分に理解し、条件が満たされるまで、警告を無視して先に進んではなりません。

目次

| | |
|-----------------------------------|----|
| はじめに | 5 |
| キット構成 | 6 |
| ユーザーが用意する機器と試薬 | 7 |
| サンプル前処理に関する考慮事項 | 8 |
| プロトコル | 9 |
| 概要 | 9 |
| Gly-X 脱グリコシル化 | 10 |
| InstantPC ラベリング | 10 |
| InstantPC のクリーンアップ | 11 |
| ラベル化グリカンの分析 | 14 |
| InstantPC ラベル化グリカンに推奨の HILIC メソッド | 15 |
| InstantPC ラベル化グリカンに対する推奨の MS 条件 | 19 |
| 付録 | 20 |
| 自動化プロトコルに対する推奨事項 | 20 |
| FAQ | 21 |
| リソースおよび参考文献 | 25 |
| 参考文献 | 25 |
| 技術支援 | 26 |
| 製品情報 | 27 |

はじめに

InstantPC キットによる Gly-X N- グリカン高速遊離およびラベリングでは、溶液内での酵素によるタンパク質の脱グリコシル化を利用します。また、遊離した N-グリカンは、InstantPC 色素で高速ラベリングを行います。あとは簡単な除去作業で、グリカンサンプルの UHPLC、LC/MS、MS/MS などのメソッドによる分析の前処理が完了です。溶液中での脱グリコシル化とラベル化により、シンプルかつ高速で自動化にも適したメソッドが実現します。InstantPC 色素は比類のない高輝度な蛍光と MS 信号を実現し、異なる糖鎖分析ワークフローで単一のラベリングメソッドを展開できます。利点：

- より優れたピーク分離度を実現する小さな分子サイズ
- 1～96 サンプルを処理可能な、柔軟な高スループットフォーマット
- 最適化されたクリーンアップにより、過剰な遊離色素、タンパク質、その他の干渉化合物を除去

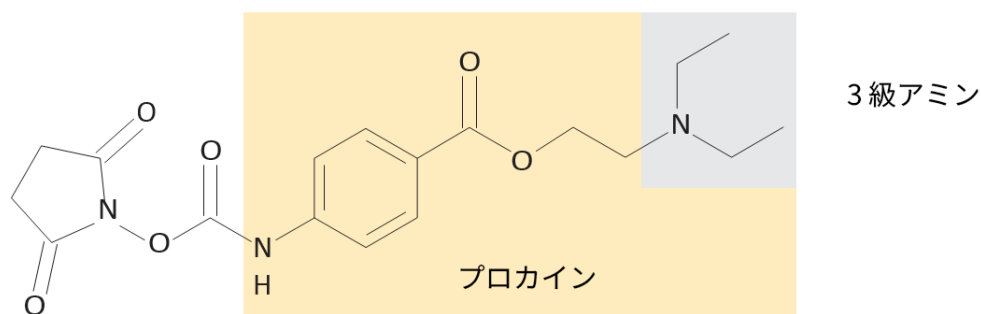


図 1. InstantPC 色素 (IPC)

検査キットの構成

Gly-X および InstantPC (GX96-IPC) 色素キットは3つのモジュールで構成されています。各モジュールが、1回の分析で最大96サンプルに対して十分な試薬を提供します。

表1 検査キットの構成

| モジュール | コンポーネント | 数量 | 保管 |
|---------------------------------------|---------------------------------------|----|--------|
| Gly-X 脱グリコシル化モジュール GX96-100 | Gly-X 脱グリコシル化プレート、96 ウェル | 1 | RT |
| | Gly-X N-グリカナーゼ、1 mg/mL、120 μ L | 1 | 4 °C |
| | Gly-X 消化緩衝液、240 μ L | 2 | 4 °C |
| | Gly-X 変性剤、240 μ L | 1 | 4 °C |
| Gly-X InstantPC ラベリングモジュール GX96-101 | InstantPC 色素 (凍結乾燥) | 4 | -20 °C |
| | InstantPC 色素溶媒、600 μ L | 1 | -20 °C |
| Gly-X InstantPC クリーンアップモジュール GX96-102 | Gly-X クリーンアッププレート A | 1 | RT |
| | Gly-X InstantPC 溶出液 | 1 | RT |
| | Gly-X 廃液トレイ | 1 | RT |
| | Gly-X 使用ウェルシーリングキャップ、黒 (クリーンアッププレート用) | 96 | RT |
| | Gly-X コレクションプレート、96 ウェル | 1 | RT |
| | シールフィルム (スリット入り) | 1 | RT |
| | 保管シーリングホイル | 1 | RT |

注意

Gly-X 溶出液は、10 % (v/v) のアセトニトリルを含む 160 mM ギ酸アンモニウムです。

注意

Gly-X および InstantPC 24 ct キット (GX24-IPC) には、30 μ L の Gly-X N-グリカナーゼ、バイアル 1 本の Gly-X 消化緩衝液、バイアル 1 本の InstantPC 色素、表に記載のその他すべてのキットコンポーネントが含まれています。

注意

クリーンアップモジュールには、Gly-X 真空マニホールドスペーサ (GX100) が必要です。



図 2. GX100、Gly-X 真空マニホールドスペーサが必要

ユーザーが用意する機器と試薬

- 96 ウェルサーマルサイクラーまたは2つの個別のヒートブロック、90 および 50 °C に設定 (Corning THERM-1001、110 V や THERM-1000、230 V など)

注意

2つの GlykoPrep ヒータ、WS0271 は、VWR 13259-260 モジュール型ヒートブロックに適合します。

- 真空マニホールド (Millipore MSVMHTS00)
- 真空ポンプ (Millipore WP6211560、110 V、WP6122050、220V、Welch WOB-L ポンプ 2522)

注意

推奨の Millipore モデル以外の真空マニホールドをお持ちの場合は、ガイドンスについてアジレントまでご連絡ください (<https://explore.agilent.com/ContactUs-jp>)。GX100 ではなく GX200 スペーサには、Waters 真空マニホールドを使用できます (21 ページの FAQ を参照)。

- Gly-X 真空マニホールドスペーサ (Agilent GX100)
- ギ酸、MS グレード
- アセトニトリル (ACN)、MS グレード
- オプション - AdvanceBio スピнкаラム (部品番号 **1980-1103**) または 96 サンプルプレート (部品番号 **1980-1104**) によるサンプルバッファ交換。AdvanceBio スピнкаラム用のコレクションチューブが含まれています。AdvanceBio スピン 96 サンプルプレートの推奨アクセサリプレートは、部品番号 5043-9308 (洗浄ステップ用)、部品番号 **5043-9312** (収集用)、部品番号 **5042-1389** (保存用シーリングマット) です。AdvanceBio スピンの詳細な説明は、取扱説明書 **5994-7244JAJP** を参照してください。

サンプル前処理に関する考慮事項

一般的に、糖タンパク質サンプルは、低塩濃度の中性緩衝液中に洗浄剤とアミンなどの求核種がない状態で、最大で 2 mg/mL を調製する必要があります。サンプルが高濃度の場合は、水、または 50 mM HEPES (pH 7.9) 中で希釈する必要があります。

その他のサンプルに関する考慮事項は次のとおりです。

- アミンバッファ成分（トリス、アルギニン、グリシン、ヒスチジンなど）は InstantPC グリカンラベリング色素に反応するため、避ける必要があります。このようなサンプルの脱グリコシル化手順の前に、水または干渉のないバッファ（50 mM HEPES、pH 7.9 など）にバッファ交換する際には、AdvanceBio 脱塩スピンカラム（部品番号 **1980-1103**）または 96 サンプルプレート（部品番号 **1980-1104**）の使用を推奨します。手順についてはユーザーガイド **5994-7244JAJP** を、裏付けとなるデータについてはアプリケーションノート **5994-7239EN** を参照してください。または、10 kDa 分子量カットオフスピン遠心分離フィルタを使用できます。
- プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーにより前処理したサンプルを使用する場合、溶出液としてグリシンバッファではなく 0.1% ギ酸を使用する必要があります。
- 塩含有バッファ（およそ 150 mM の塩濃度）中のサンプルは、キットで使用できますが、PBS の使用は推奨されません（21 ページの **FAQ** を参照）。推奨の希釈液は、水または 50 mM HEPES (pH 7.9) に相当するバッファです。
- タンパク質サンプルと、注入に必要な回数 / 容量によっては、2 mg/mL 未満のサンプルを使用できます。
- 各反応に推奨のタンパク質の最大量は 40 µg（20 µL の 2 mg/mL 溶液）ですが、糖タンパク質によっては 40 µg を超えて使用できる場合もあります（21 ページの **FAQ** を参照）。
- タンパク質サンプルは pH 5.5 以上でなければなりません。プロトコルを開始する前に pH を調整するか、10 ページの **Gly-X 脱グリコシル化** の **step 1** で 20 µL サンプルあたり 3 µL の Gly-X 消化緩衝液を添加します。
- クエン酸含有バッファの場合は、水または 50 mM の HEPES (pH 7.9) でサンプルを希釈してクエン酸を 20 mM 未満に下げるか、分子量カットオフスピン遠心式フィルタで緩衝液交換します。

90 °C でのインキュベーション時に沈殿物が観察された場合は（10 ページの **Gly-X 脱グリコシル化** の **step 2**）、塩、低 pH、または干渉している可能性がある洗剤についてサンプル前処理とサンプルバッファを確認します。サンプルバッファと Gly-X プロトコルとの互換性に関する質問については、アジレントにご連絡ください (<https://explore.agilent.com/ContactUs-jp>)。

プロトコル

始めましょう

- 1 サンプル前処理を行います（8ページの**サンプル前処理に関する考慮事項**を参照）。
- 2 サーマルサイクラーを 90 °C に設定するか、2 つの個別のヒートブロックを 90 °C および 50 °C に設定します。
- 3 **表 2** に示された希釈標準溶液を調製します。

表 2 希釈標準溶液の説明。ACN 含有溶液の場合、有機溶媒対応のチューブ、槽、またはプレートを使用します（ポリスチレンは非対応）。

| 希釈標準溶液 | 手順 | 注意事項 |
|---------------------------------------|---|---|
| N-グリカナーゼ希釈標準溶液 | N-グリカナーゼおよび Gly-X 消化緩衝液を 1 対 1 (v/v) で混合します。サンプルあたり 2.4 μ L の希釈標準溶液を調製し、8 ウェルに対して 9.6 μ L の N-グリカナーゼと 9.6 μ L の消化緩衝液を混合します。 | 20% の予備の希釈標準溶液を混合します。サンプルあたり 2 μ L が必要です。 |
| InstantPC 色素溶液 | -20 °C の温度から InstantPC 色素 および InstantPC 色素溶媒を取り出します。室温に戻し、乾燥剤から取り除きます。 150 μ L の InstantPC 色素溶媒を InstantPC 色素バイアルに追加し、溶解するまでボルテックスします。 注: 他の色素バイアルで使用するために、色素溶媒バイアルを保持しておきます。 | サンプルあたり 5 μ L が必要です。再溶解された InstantPC 色素と色素溶媒は再密封可能なバッグに乾燥剤とともに再包装し、再密封して、-20 °C で最大 3 か月間保管でき、凍結融解サイクルは 4 回まで繰り返すことができます。使用のために開封する前に、溶解した色素を室温に戻します。 注: 色素バイアルから移す場合は、有機溶媒対応のチューブまたはプレートを使用します（ポリスチレンは非対応）。 |
| ロード / 洗浄溶液 2.5% ギ酸 / 97.5% アセトニトリル | 96 サンプルの原液：ガラス目盛付シリンダーに 6 mL のギ酸を加えます。100% アセトニトリルを加えて容量を 240 mL にします。ガラス製の保管用ベッセルに移し、しっかりとキャップを締めて、攪拌して混合します。 | サンプルあたり約 2.4 mL が必要です。キャップをしっかりと締めて、室温 (RT) で 6 か月保存可能です。 |

- 4 以下の品目でクリーンアップステーションを準備します。
 - a Gly-X クリーンアッププレート A
 - b Gly-X コレクションプレート (PCR プレート)
 - c 真空ポンプに接続された真空マニホールド
 - d Gly-X マニホールドスパーサ (Agilent GX100)
 - e 廃液トレイ



Gly-X 脱グリコシル化

- 1 2 μL の Gly-X 変性剤（オレンジ色のキャップのバイアル）を Gly-X 脱グリコシル化プレートの下部に加えます。

注意

5.5 pH 以下のサンプルの場合は、3 μL の Gly-X 消化緩衝液（白のキャップのバイアル）を加えます。

- 2 各 20 μL の糖タンパク質サンプル（約 2 mg/mL）を Gly-X 脱グリコシル化プレートの下部に加えます。それぞれを加えた後、ピペットで十分に混合します。



- 3 ベンチトップ上でプレートを軽くたたいて、ウェルの底にサンプルを集めます（またはスピンドウンします）。
- 4 キャップなしで 90 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間インキュベートします。

注意

この時点で沈殿物が形成されている場合は、サンプルバッファ組成を確認します。

- 5 プレートを取り外し、N-グリカナーゼを加える前に 2 分間 RT で置きます。
- 6 各サンプルに 2 μL の N-グリカナーゼ希釈標準溶液を加えます。ピペットを使用して十分に混合します。
- 7 ベンチトップ上でプレートを軽くたたいて、ウェルの底にサンプルを集めます（またはスピンドウンします）。
- 8 キャップなしで 50 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間インキュベートします。
- 9 ヒーターからプレートを取り外し、直接 InstantPC ラベリングに進みます。

InstantPC ラベリング

- 1 各サンプルに、上記で調製した 5 μL の InstantPC 色素溶液を加えます。それぞれを加えた後、ピペットで十分に混合します。この手順を繰り返し、すべてのサンプルに InstantPC 色素溶液を加えます。

注意

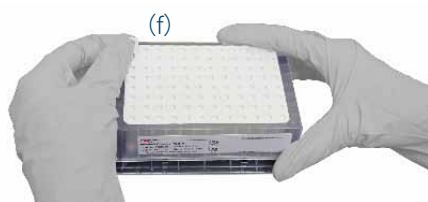
沈殿物が形成されるのは正常です。

- 2 キャップなしで 50 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間インキュベートします。
- 3 InstantPC 色素溶液のキャップをしっかりと締めて、乾燥剤の中に入れて、-20 $^{\circ}\text{C}$ に戻します。

InstantPC のクリーンアップ

設定

- 1 必要な数のウェルに対し、慎重に白いキャップを取り外して Gly-X クリーンアッププレート (f) を準備します。



注意

ウェルが再使用されるのを防ぐために、クリーンアップ前の手順で、使用するウェルに黒のキャップストリップ (g) を取り付けます。

注意

クリーンアッププレート保管プレート (h) は脇に置いておいて、使用後のクリーンアッププレートを保管するために使用します。付属のホイルバッグに入れて保管します。



- 2 真空または加圧式マニホールドに廃液トレイをセットします。
- 3 マニホールドを組み立てます (i)。



- 4 マニホールドの上部に Gly-X クリーンアッププレート A (j) を取り付けます。



ロード

- 1 マルチチャンネル型ピペットを使用して、Gly-X クリーンアッププレートの必要な数のウェルに 400 μL のロード / 洗浄溶液を加えます。減圧しないでください。

注意

クリーンアッププレートが通過することで、ある程度のロード / 洗浄溶液の損失が生じます。すぐにステップ2に進み、ロード / 洗浄溶液容量を 500 μL にまで増やして、時間を確保します (>3分)。

- 2 マルチチャンネル型ピペットを使用して脱グリコシル化プレートの各サンプルに 150 μL のロード / 洗浄溶液を加え、ピペットで混合してから、全量のサンプル (約 172 μL) を Gly-X クリーンアッププレートの対応のウェルに移します。ピペットを使用して十分に混合します。

注意

複数のサンプルを調製する場合は、プレートウェルからのロード / 洗浄溶液の損失を最小限にするために、マルチチャンネル型ピペットを使用して、一行ごとに、またはカラムごとにサンプルをロードすることを推奨します。

- 3 手順を繰り返し、すべてのサンプルをクリーンアッププレートに移します。
- 4 5 inHg 未満に減圧します。ウェルが空になるまで、溶液を通過させます。

注意

このステップにより、サンプルが Gly-X クリーンアッププレートにロードされます。

洗浄

- 1 600 μL のロード / 洗浄溶液で洗浄し、洗浄溶液を廃液トレイに集めながら、2 inHg に減圧します。
- 2 2回目および3回目の 600 μL ロード / 洗浄溶液で手順を繰り返します。

注意

すべてのウェルが空になってない場合は、2分後に 10 inHg にまで真空度を高めます。

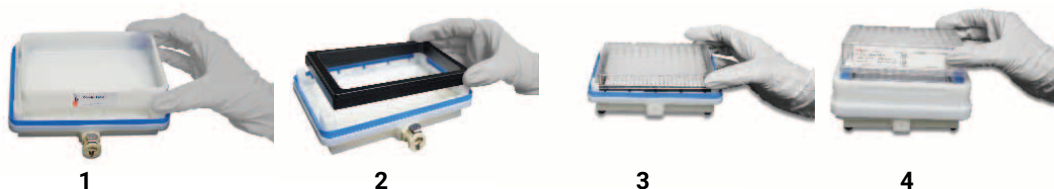
注意

48以上のサンプルを処理している場合は、2回目の洗浄の後に廃液トレイを空にします (廃液トレイの容量は約 120 mL)。

- 3 真空を解放し、クリーンアッププレートを取り外し、紙で拭きます。廃液トレイを空にします。

溶出

- 1 マニホールドから廃液トレイを取り外します。
- 2 マニホールドに Gly-X マニホールドスパーサ (Agilent GX100) をセットします。
- 3 マニホールドスパーサの上部にコレクションプレートをセットし、真空マニホールドを再度組み立てます。
- 4 真空マニホールドの上部に Gly-X クリーンアッププレートを取り付けます。



- 5 各ウェルに 100 μ L の Gly-X InstantPC 溶出液を加えます。真空 (2 inHg 以下) を使用して、サンプルをコレクションプレートへ溶出します。

注意

すべてのウェルが空になってない場合は、2 分後に 10 inHg にまで真空度を高めます。

- 6 真空を解放し、クリーンアッププレートを取り外し、保管プレートの上に置きます。
- 7 コレクションプレートを取り外します。オプション：キットに付属の、UHPLC 用のスリット入りシールフィルムでコレクションプレートをシールします。-20 $^{\circ}$ C での長期保管の場合は、キットに付属のホイルシールフィルムを使用します。このシーリングホイルは、スリット入りシールフィルムの上に取り付け、オートサンプラにセットする前に取り外すことができます。

注意

シーリングホイルは保管のみを対象としており、HPLC のオートサンプラには対応していません。その他のオプションについては、21 ページの **FAQ** を参照してください。

- 8 サンプルをボルテックスで混合し、スピンドウン / 軽くたたいてサンプルをウェルの底部に集めるか、ピペットを使用して混合します。

注意

この最終的な溶出後の混合ステップは、一貫性の高い結果を得るために不可欠です。

- 9 クリーンアッププレートを保管用プレート (i) にセットし、黒い「使用ウェル」シーリングキャップを使用済みのクリーンアッププレートウェル (h) に取り付け、クリーンアッププレートをホイルバッグに戻して RT で保管します。
- 10 InstantPC ラベル化グリカンサンプルは分析可能な状態です。サンプルは Gly-X InstantPC 溶出液で -20 $^{\circ}$ C で最大 6 か月間、または、Gly-X InstantPC 溶出液あるいは ACN/DMF で希釈後に 4 $^{\circ}$ C で最大 5 日間保管できます (14 ページの **ラベル化グリカンの分析** を参照)。



ラベル化グリカンの分析

蛍光検出の場合、N-グリカンと結合した InstantPC に最適な励起および発光波長は次のとおりです。

- 励起：285 nm
- 発光：345 nm

285 nm の励起波長に設定された UV 検出器を使用して、InstantPC ラベル化グリカンに UV 検出を使用することも可能です (1)。ロードされるサンプル量は、UV 検出で最適な信号のために増加しなければならない場合があります。詳細は、アジレントにお問い合わせください。

蛍光検出による UHPLC に対しては、1 μ L の InstantPC-グリカンを含む Gly-X InstantPC 溶出液 (160 mM のギ酸アンモニウム、10% (v/v) アセトニトリル) の注入が推奨されます。ピーク形状に影響を及ぼす可能性があるため、UHPLC-HILIC では InstantPC 溶出液を 1 μ L を超えて注入しないでください。

- シアル化グリカンが沈殿する可能性があるため、より多い注入量 (> 1 μ L) の InstantPC グリカンに対しては、ACN のみでサンプルを希釈しないでください。HILIC メソッド開始時の高い有機 % により適合させるため、水溶性緩衝液 22.5%、DMF 37.5%、ACN 40.0% の最終濃度を得るために、3 の 1:1 [v/v] ACN:DMF に対して、1 の溶出液のサンプルを使用します。

1 μ L を超える HILIC 注入のための Gly-X InstantPC ラベル化グリカンサンプルの希釈例：

表 3 InstantPC ラベル化グリカンサンプルと標準のための推奨の希釈

| 必要な全容量 (μ L) | 10% 有機 Gly-X 溶出液中の IPC ラベル化グリカ ンサンプル (μ L) | IPC ラベル化 グリカン標準 (μ L)* | 1:1 [v/v] ACN:DMF (μ L) | % 有機 | % 水性 |
|----------------------|---|-----------------------------------|---------------------------------|------|------|
| 10 | 2.5 | | 7.5 | 77.5 | 22.5 |
| 20 | 5.0 | | 15.0 | 77.5 | 22.5 |
| 40 | 10.0 | | 30.0 | 77.5 | 22.5 |
| 10 | | 2.5 | 7.5 | 75.0 | 25.0 |
| 20 | | 5.0 | 15.0 | 75.0 | 25.0 |
| 40 | | 10.0 | 30.0 | 75.0 | 25.0 |

* 標準に付属の説明書に従い、100 mM ギ酸アンモニウム (pH 4.4 ~ 5) または水ですでに再溶解された InstantPC ラベル化標準。

InstantPC ラベル化グリカンに推奨の HILIC メソッド

Agilent AdvanceBio アミド HILIC カラム

Agilent AdvanceBio アミド HILIC カラムは、N-グリカンの HILIC 分離用に設計されています。全多孔質 1.8 µm シリカ粒子と独自の結合相により、優れた長期安定性と再現性を実現すると同時に、複雑な N-グリカン混合物を最適に分離します。

推奨する開始条件

取り付け、カラムのコンディショニング、使用パラメータ (pH、温度、圧力) などの説明については、AdvanceBio アミド HILIC カラムユーザーマニュアル (5994-6915JAJP) を参照してください。

- AdvanceBio アミド HILIC カラム、2.1 × 150 mm、1.8 µm (部品番号 859750-913)
- 移動相 A：50 mM ギ酸アンモニウム、ギ酸を用いて pH 4.4 に調整、または Agilent AdvanceBio ギ酸アンモニウム HILIC 移動相濃縮液 (部品番号 G3912-00000) から調製
- 移動相 B：アセトニトリル
- カラム温度：60 °C
- 流量：0.5 mL/min
- 励起 285 nm、発光 345 nm

注意

1 µL の水性サンプルの注入を使用した例を示しています。より大容量の注入については、ガイドランスとして表 3 を参照してください。

表 4 非常に複雑であるか、またはシアル化されたグリカンサンプルに推奨されるグラジエント条件

| 時間 (分) | %B | 流量 (mL/min) |
|--------|----|-------------|
| 0 | 76 | 0.50 |
| 45 | 46 | 0.50 |
| 46 | 40 | 0.50 |
| 48 | 40 | 0.50 |
| 49 | 76 | 0.50 |
| 60 | 76 | 0.50 |

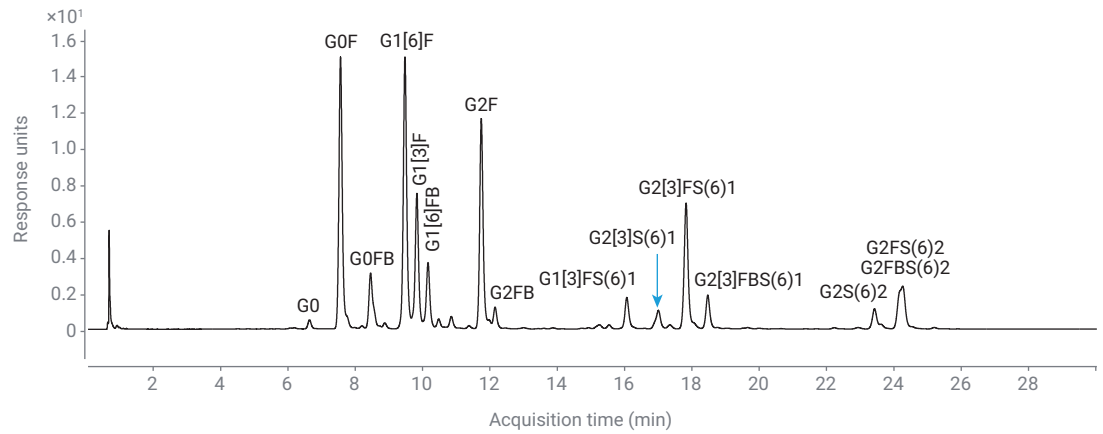


図 3. 60 分間のグラジエントによる、Agilent AdvanceBio InstantPC ヒト IgG N-グリカンライブラリ（部品番号 GKPC-005）のサンプルクロマトグラム

表 5 単純な中性グリカンサンプルで推奨するグラジエント条件

| 時間 (分) | %B | 流量 (mL/min) |
|--------|----|-------------|
| 0 | 76 | 0.50 |
| 17 | 62 | 0.50 |
| 18 | 40 | 0.50 |
| 20 | 40 | 0.50 |
| 21 | 76 | 0.50 |
| 30 | 76 | 0.50 |

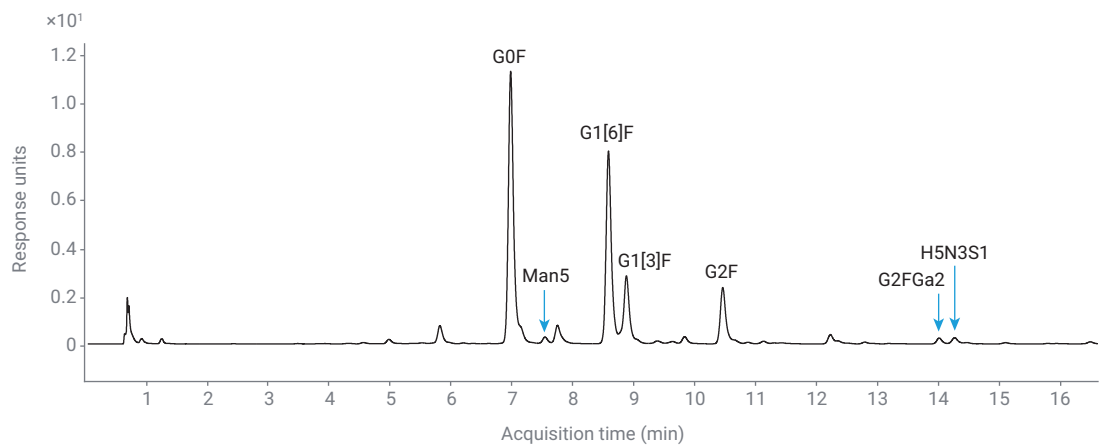


図 4. 30 分間のグラジエントによる、Agilent-NISTmAb から放出された Agilent AdvanceBio InstantPC ラベル化 N-グリカンのサンプルクロマトグラム

追加のメソッドとデータについては、アプリケーションノート **5994-6916JAJP** 『遊離 N-グリカンの LC/FLD/MS 分析のために改善された親水性相互作用液体クロマトグラフィー』を参照してください。

グリカンピークアサインメントツール (GPAT)

多くの場合、HILIC リテンションタイム (RT) だけでは、得られた分離ピークが多数のグリカン構造の候補のどれと一致するかを確実に判定することができません。グルコース単位 (GU) - 正規化後グリカンリテンションタイムのライブラリに基づき、ピーク同定を予測することは可能です。グリカンピークアサインメントツール (GPAT) には、AdvanceBio アミド HILIC カラムと移動相を使用して分離された、100 個の InstantPC- ラベル化 N-グリカンおよび 2-AB- ラベル化 N-グリカンの GU 値のライブラリが含まれています。GPAT はウェブベースで、無料で使用できます。使用を開始するには、InstantPC- ラベル化ラダー標準 (部品番号 GKPC-503) により取得されたリテンションタイム (RT) を入力するだけです。ラダー標準に基づく RT を使用して、GPAT はライブラリにより予測される N-グリカン RT のリストを生成します。機密性の高いサンプル情報を入力する必要がありません。

アプリケーションノート **5994-7477EN** では、このツールを使用してセツキシマブに存在するグリカンに注釈を付け、多様なグリカン構造で GPAT の予測精度を評価しました。

このツールは 2.1 × 150 mm バージョンの Agilent AdvanceBio アミド HILIC カラム (部品番号 859750-913) で収集されたデータでの使用を対象としており、アジレントのウェブサイト (www.agilent.com/biopharma/gpat) から無料で使用できます。

以下の LC メソッドは、GPAT に関するアプリケーションノート **5994-7477EN** で使用されています。

表 6 中性グリカン、S1 グリカン、S2 グリカンを含む InstantPC グリカンサンプルの LC グラジエント

| 時間 (分) | %B |
|--------|----|
| 0 | 77 |
| 45 | 59 |
| 46 | 40 |
| 47 | 40 |
| 49 | 77 |
| 60 | 77 |

表 7 中性グリカンから S4 グリカンまでを含む InstantPC グリカンサンプルの LC グラジエント

| 時間 (分) | %B |
|--------|----|
| 0 | 77 |
| 75 | 47 |
| 76 | 40 |
| 77 | 40 |
| 79 | 77 |
| 90 | 77 |

Waters BEH グリカン分離技術カラムのための 15 分 UHPLC メソッド :

2.1 x 100 mm、1.7 µm カラム温度 60 °C、励起 285 nm、発光 345 nm。

表 8 15分メソッド、Waters のカラム

| 時間 (分) | 流量 (mL/min) | % ACN | % 100 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.4 |
|--------|-------------|-------|--------------------------|
| 0.0 | 1.0 | 75.0 | 25.0 |
| 12.0 | 1.0 | 50.0 | 50.0 |
| 12.1 | 0.5 | 40.0 | 60.0 |
| 12.5 | 0.5 | 40.0 | 60.0 |
| 12.6 | 0.5 | 75.0 | 25.0 |
| 12.7 | 1.0 | 75.0 | 25.0 |
| 15.0 | 1.0 | 75.0 | 25.0 |

Waters BEH グリカン分離技術カラムのための 60 分 UHPLC メソッド :

2.1 x 150 mm、1.7 µm カラム温度 60 °C、励起 285 nm、発光 345 nm。

注意

このメソッドは、アプリケーションノート **5994-0942EN**『**Comparison of Common Fluorescent Labels for LC/MS Analysis of Released N-Linked Glycans**』(遊離 N- 結合型グリカンの LC/MS 分析用の一般的な蛍光ラベルの比較) で使用されています。

表 9 60分メソッド、Waters のカラム

| 時間 (分) | 流量 (mL/min) | % ACN | % 50 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.4 |
|--------|-------------|-------|-------------------------|
| 0.0 | 0.4 | 80.0 | 20.0 |
| 2.0 | 0.4 | 80.0 | 20.0 |
| 2.5 | 0.4 | 75.0 | 25.0 |
| 50.0 | 0.4 | 62.0 | 38.0 |
| 52.0 | 0.4 | 40.0 | 60.0 |
| 53.5 | 0.4 | 40.0 | 60.0 |
| 55.0 | 0.4 | 80.0 | 20.0 |
| 60.0 | 0.4 | 80.0 | 20.0 |

InstantPC ラベル化グリカンに対する推奨の MS 条件

MS 条件

Agilent Jet Stream ESI ソース、任意の MS、ポジティブモード、シースガス 300 °C、10.0 L/分、乾燥ガス 150 °C、9.0 L/分、ネブライザ圧力 35 psig、VCap 2500 V、ノズル 500 V、フラグメンタ 120 V (該当する場合)、 m/z 範囲 600 ~ 3000。

Waters Xevo G2-S Qtof、+ モード、キャピラリ電圧 2.8 kV、コーン電圧 30 V、ソース温度 120 °C、脱溶媒温度 350 °C、スキャン時間 0.8 秒、 m/z 範囲 300 ~ 2,000 Da。

MS/MS 条件

コリジョンエネルギーランプ：40 ~ 60 V (+1)、15 ~ 30 V (+2)、15 ~ 25 V (+3)、スキャン時間：1.0 秒、 m/z 範囲 50 ~ 2,000 Da。

InstantPC によるラベル化グリカンの質量の計算

プロトコルでグリコシルアミン型のグリカンは InstantPC によりラベル化されていますが、多数のグリカン質量計算は、ラベルなしグリカンの遊離還元末端型が開始点となります。そのため、2つの計算法があります。1つは、開始点として遊離還元を終了質量を使用した InstantPC ラベル化グリカンの質量を対象とした方法で、もう1つは、グリコシルアミンへの InstantPC 添加をベースとする計算法です。

遊離還元末端を含むグリカンに追加される質量：

- グリカンの質量 (遊離還元末端) + $C_{14}N_3O_2H_{19}$ = InstantPC ラベル化グリカンの質量
- $C_{14}N_3O_2H_{19}$ によって追加される質量
モノアイソトピック：261.14773 Da
平均：261.3196 Da

グリコシルアミンに追加される質量：

- グリカンの質量 (グリコシルアミン) + $C_{14}N_2O_3H_{18}$ = InstantPC ラベル化グリカンの質量
- $C_{14}N_2O_3H_{18}$ によって追加される質量
モノアイソトピック：262.13174 Da
平均：262.3043 Da

自動化プロトコルに対する推奨事項

以下のサンプルと試薬容量の指示は、Gly-X プロトコルの自動化のためのピペティング要件に合うように作成されました（14 ページの表 3）。自動化プロトコルでの試薬の比率は標準プロトコルと同じですが、自動化ピペティングの信頼性を向上させるために、最小分注容量は 2 ~ 5 μL で変化します。

表 10 5 μL の最小分注容量に対応するための、サンプル、変性剤、N-グリカナーゼに関する希釈標準溶液の指示。9 ページの表 2 の指示に従い、その他の希釈標準溶液を調製します。

| サンプルと試薬 | 標準プロトコル | 自動化プロトコル |
|----------------|---|--|
| サンプル | 20 μL @ 最大 2 mg/mL (最大 40 μg) * | 15 μL @ 最大 2.67 mg/mL (最大 40 μg) * |
| 変性剤 | サンプルあたり 2 μL の変性試薬原液を使用します。 | 水で変性剤を希釈します (2:3 (v/v))。サンプルあたり 5 μL の希釈変性試薬を使用します。必ず 20% の予備を含めて希釈変性試薬を調製します。例えば、8 つのサンプルには 48 μL 調製します (19.2 μL 変性試薬、28.8 μL 水)。 |
| N-グリカナーゼ希釈標準溶液 | N-グリカナーゼと Gly-X 消化緩衝液を 1:1 (v/v) で混合して、N-グリカナーゼ希釈標準溶液を調製します。サンプルあたり 2 μL の N-グリカナーゼ希釈標準溶液を使用します。必ず 20% の予備を含めて N-グリカナーゼ希釈標準溶液を調製します。例えば、8 つのサンプルには 20 μL 調製します。 | N-グリカナーゼ、Gly-X 消化緩衝液、水を 1:1:3 (v/v/v) で混合して、N-グリカナーゼ希釈標準溶液を調製します。サンプルあたり 5 μL の N-グリカナーゼ希釈標準溶液を使用します。必ず 20% の予備を含めて N-グリカナーゼ希釈標準溶液を調製します。例えば、8 つのサンプルには 48 μL 調製します (9.6 μL N-グリカナーゼ、9.6 μL Gly-X 消化緩衝液、28.8 μL 水)。 |

* サンプルの種類によっては、最大 100 μg 糖タンパク質を使用できる場合があります（21 ページの FAQ を参照）。

質問：なぜサンプルの希釈に PBS は推奨されないのですか？

回答：PBS は Gly-X InstantPC キットに対応していますが、サンプルの希釈に PBS を使用すると、不自然なピークとなる可能性があります。これらのピークは、遊離色素ピークの近くの、分離の早い段階で溶出し、N-グリカンの分析を妨げることはありません。最高の性能を得るためには、水または 50mM HEPES (pH 7.9) でサンプルを希釈することが推奨されます。

質問：反応ごとの推奨上限である 40 µg を超えるタンパク質を使用できますか？

回答：それはタンパク質によって異なります。一般的に、100 µg までのタンパク質はこのサンプル前処理に対応していますが、a) グリカンの相対%面積値における直線的レスポンスの損失、または b) 変性剤添加後の沈殿物なく、40 µg を超えるタンパク質を使用できることを検査して確認する必要があります。

質問：私のサンプルが Gly-X クリーンアップマトリックスに完全にロードされていません (ロードステップ 9)。なぜですか？

回答：これは、タンパク質サンプルの性質、またはサンプル緩衝液の組成によるマトリックス効果に起因している可能性があります。反応ごとのタンパク質の量を減らすか、または Gly-X プロトコル開始前にバッファ交換を行うことによって対応できる可能性があります。

質問：UHPLC-HILIC で 1 µL を超えて注入したいです。なぜ DMF でサンプルを希釈する必要がありますのですか？

回答：HILIC 分離においては、高濃度の有機溶媒中でグリカンがカラムと相互作用し、グラジエント時に水溶液の濃度が上昇することで、カラムから溶出します。1 µL の水溶液注入は UHPLC-HILIC メソッドに対応できますが、1 µL を超える水溶液を注入すると、HILIC メソッドの開始時に高い有機条件を損ない、ピークの広がり / フロンティングの原因となることが確認されています。このため、1 µL を超えるの注入量に対しては、1 容量の溶出液中のサンプルを、3 容量の 1:1 [v/v] ACN:DMF に希釈することが推奨されます。

質問：なぜ HILIC 注入の前に ACN でサンプルを希釈してはいけないのですか？また、DMF 以外のものを希釈に使用できますか？

回答：Gly-X 溶出液中の InstantPC ラベル化グリカンを ACN のみで希釈すると、シアル化グリカンが沈殿する可能性があります。サンプル希釈のための DMF の代替物の試験は行っていません。

質問：LC 分析でラベル化グリカンの蛍光シグナルが少ないです。これはどのように対処したらよいのでしょうか？

回答：シグナルを増加させるためのいくつかのオプションがありますが、まずは使用されている FLD ex/em 波長を確認します (285/345 nm、[14 ページ](#))。

次のオプションがあります (推奨順)：

- 1 ACN:DMF による希釈後に、LC にさらに多くのラベル化グリカンを注入します ([14 ページ](#))。
- 2 [13 ページ](#) の **step 5** の溶出時のクリーンアッププロトコル中に、100 µL ではなく 50 µL の InstantPC 溶出液でラベル化グリカンを溶出させます。これは、ほとんどのサンプルタイプに有効です。ご不明な点はアジレントにお問い合わせください。
- 3 例えば SpeedVac (加熱なし) を使用してグリカンを乾燥させ、少量を再溶解させます。これは多くのサンプルタイプに有効です。InstantPC 溶出液は 160 mM ギ酸アンモニウム、10% [v/v] アセトニトリルです。ギ酸アンモニウムは揮発性緩衝液であるため、サンプルを保護するために加熱設定をオフにして、SpeedVac でロータリエバポレータによって乾燥させることができます。サンプルを 100 mM のギ酸アンモニウム (pH 4.7 ± 0.3) で再溶解できます。InstantPC 溶出液は、再溶解のための代替物として使用する

ことも可能です。サンプルの安定性に影響を及ぼす可能性があるため、乾燥した InstantPC ラベル化グリカンに水を使用して再溶解しないでください。

SpeedVac によっては、乾燥プロセス中にギ酸アンモニウムの膜がチューブの壁に生じる可能性があります。これが気になる場合は、サンプルを再溶解し、再び乾燥させてください。

1 μL を超える LC 注入のために、すでに InstantPC 溶出液中のサンプルを 1:1 DMF:ACN と混合している場合、サンプルを乾燥させることは推奨しません。熱（加熱するとグリカンに悪影響を及ぼす可能性がある）を使用せずロータリエバポレータで、または超圧で DMF を含むサンプルを乾燥させることは困難です。

質問：UHPLC オートサンプラに直接コレクションプレートを取り付けることはできますか？プレートの寸法は？

回答：はい。

OpenLab 2 で操作される Agilent LC の場合、コントロールパネルで機器への接続を切り、**[機器の構成]** を選択します。右クリックでオートサンプラモジュールを開き、そのウィンドウの下部で **[サンプル容器を定義]** をクリックして、オプションのリストを表示します。図 5 に示されている寸法で、新しいオプションを追加します。

| Wellplate | |
|------------------------------------|-----------------------|
| Plate Name | GlyX Collection Plate |
| Row information | |
| Rows | 8 |
| Row Distance | 9.00 mm |
| Row Offset | 11.24 mm |
| Column information | |
| Columns | 12 |
| Column Distance | 9.00 mm |
| Column Offset | 14.38 mm |
| Column Shift | 0.00 mm |
| Well information | |
| Volume | 100.00 μL |
| Well Depth | 16.10 mm |
| Well X Size | 5.50 mm |
| Well Y Size | 5.50 mm |
| Bottom Size | 0.000000 mm |
| <input type="checkbox"/> Square | |
| Plate information | |
| Plate Length | 85.75 mm |
| Plate Width | 128.00 mm |
| Plate Height | 16.10 mm |
| Origin | left / back |
| <input type="checkbox"/> Is Sealed | |

図 5. ウェルプレートオプションの編集

MassHunter で操作される Agilent LC の場合、機器の構成ツールを使用して同じようにコレクションプレートを設定できます。

図 6 に、例として、Waters Acquity UHPLC で使用可能な設定を示します。

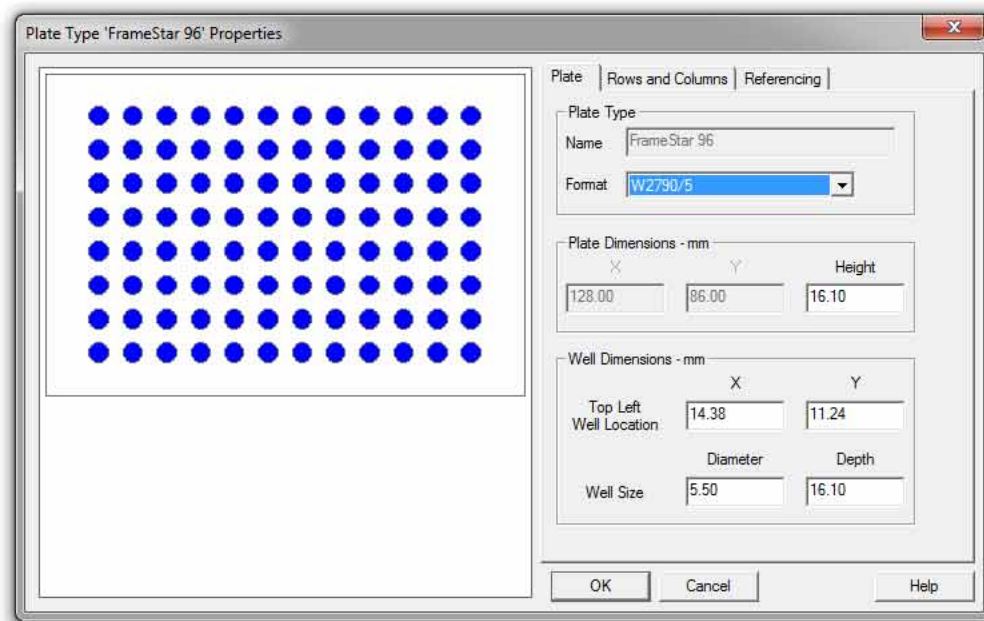


図 6. Waters Acquity UHPLC 設定例

注意

プレートから注入する場合は、粘着剤がプローブに問題をもたらす可能性があるため、通常の粘着ホイルまたは粘着シールフィルムは回避します。粘着シーリングホイルおよびフィルムは取り除く必要があります。キットに付属のスリット入りシールフィルム（ウェルエリアに粘着剤なし）、または穴開け可能なヒートシールホイルを使用します（保管シーリングホイルは使用しません）。ウェルの上に直接粘着するカバー/ホイルは避けます。粘着剤は UHPLC プローブに損傷を与える可能性があります。保管のために、キットに付属のスリット入りフィルムを、キットに付属のシーリングホイルでカバーできます。スリット入りフィルムを設置したまま、分析の前に付属のシーリングホイルを取り外すことが可能です。追加のシーリングホイルは Thermo Scientific から注文できます（AB-0626）。

コレクションプレートはシールフィルム（スリット入り）で密閉するか、マイクロプレートヒートシーラー（Thermo ALPS 50 V 半自動化マイクロプレートヒートシーラー、#AB-1443 など）を使用して穴開け可能なホイル（Thermo Easy Pierce 20 μm ホイル、#AB-1720 など）で加熱密閉できます。

コレクションプレートの寸法は、メーカーのウェブサイトでも参照できます。Framestar 96 ウェルスカート付 PCR プレート（#4ti-0960/C、E&K 部品番号 75094）。GX96-IPC マニュアルの改訂 AA および AB に使用されたコレクションプレートは Fisher #50-823-843（4721）です。

ニードル調整なしで、このメソッドを使用するデッドボリュームは約 15 μL です。より優れた回収率のために設計されたバイアルにサンプルを移すことも可能です（Waters Total Recovery バイアルなど）。

質問：5 分の HILIC 分離には 100 mM のギ酸アンモニウム、60 分の分離には 50 mM のギ酸アンモニウムが推奨されています。これは正しいですか？

回答：高速分離には 100 mM のギ酸アンモニウム、より長い分離を伴う MS には 50 mM のギ酸アンモニウムを使用します。

質問：InstantPC ラベル化グリカンの MS 分析において最もよく見られる付加体は何ですか？

回答：ポジティブモード MS で、ほとんどの二分岐 InstantPC- N- グリカンは $[M+2H]^+2$ をもたらし、より大きなシアル化グリカンは大多数の $[M+3H]^+3$ になります。www.agilent.com/glycanmass に、ポジティブモード MS における最も一般的な InstantPC ラベル化グリカン付加体と、それらの質量のリストが掲載されています。

質問：Waters の真空マニホールドに GX96-IPC キットを使用できますか？

回答：はい。溶出ステップ (**12 ページ**) で GX100 の代わりに GX200 Gly-X 真空マニホールドスペーサ (Waters マニホールド) が使用されている場合は可能です。Waters 真空マニホールド (#186001831) を使用している場合、GX200 は、クリーンアッププレートとコレクションプレートとの間に適切な距離を提供します。これは、コレクションプレートへのラベル化 N-グリカンの溶出の際に、クロストークを回避するために重要です。詳細は、アジレントにお問い合わせください (<https://explore.agilent.com/ContactUs-jp>)。

リソースおよび参考文献

アジレントのウェブサイトで、追加情報、出版物、技術情報をご参照ください。

www.agilent.com/chem/jp

製品の使用、保証、使用ライセンス

販売規約はこちら：www.agilent.com

バーチャル特許表示

アジレントの製品と特許については、www.agilent.com をご覧ください。

参考文献

- 1 Nwosu C, *et al.* Evaluation of UV Detection as a Novel Method for Antibody N-glycan Analysis. ASMS Poster, **2017**.

技術支援

アジレントは、糖鎖分析のための自動化可能な高速メソッドの開発に取り組んでいます。開発中の製品についてはお問い合わせください。アジレントはお客様の意見を尊重し、ご連絡をお待ちしております。製品性能や新しいアプリケーション、技術に関するご提案を歓迎します。

ご意見やご質問は、[ホームページ](#)からご連絡ください。

製品情報

表 11 キットおよびモジュール

| 製品コード | 説明 |
|-----------------|---|
| GX96-IPC | Gly-X および InstantPC キット (96-ct) |
| GX24-IPC* | Gly-X および InstantPC キット (24-ct) |
| GX96-201PC | Gly-X および InstantPC 脱グリコシル化およびラベリングモジュールセット (96-ct) |
| GX24-201PC | Gly-X および InstantPC 脱グリコシル化およびラベリングモジュールセット (24-ct) |
| GX96-101 | Gly-X InstantPC ラベリングモジュール (96-ct) |
| GX24-101 | Gly-X InstantPC ラベリングモジュール (24-ct) |
| GX96-102 | Gly-X クリーンアップモジュール、InstantPC 用 (96-ct) |
| GX100 | Gly-X 真空マニホールドスパーサ (2 パック) |
| GX200 | Gly-X 真空マニホールドスパーサ (Waters マニホールド) |
| G5524-60010 キット | AssayMAP PA50 プロテイン A アフィニティ精製キット (96 ct) |

* 24-ct キット (GX24-IPC) には 96 ウェルクリーンアッププレートが含まれています。クリーンアッププレートは室温で保管し、Gly-X InstantPC 脱グリコシル化およびラベリングモジュールの 24-ct リフィルをご注文ください (GX24-201PC)。

表 12 AdvanceBio アミド HILIC カラムおよび移動相濃縮液

| 部品番号 | 説明 |
|-------------|---|
| 859750-913 | AdvanceBio アミド HILIC、2.1 × 150 mm、1.8 μm |
| 858750-913 | AdvanceBio アミド HILIC、2.1 × 100 mm、1.8 μm |
| G3912-00000 | AdvanceBio ギ酸アンモニウム移動相濃縮液 (1 L の 50 mM ギ酸アンモニウムを pH 4.4 にして精製) |

表 13 InstantPC ラベル化グリカンライブラリ

| 製品コード | 説明 |
|------------|--|
| GKPC-005 | ヒト IgG N- 結合型グリカンライブラリ |
| GKPC-503 | グルコースホモポリマー |
| GKPC-020 | CHO mAb N- 結合型グリカンライブラリ |
| GKPC-020-P | CHO mAb N- 結合型グリカンライブラリ + CHO mAb 糖タンパク質 |
| GKPC-233 | α(2-3) シアル化 3 本鎖糖鎖ライブラリ |
| GKPC-263 | α(2-6) シアル化 3 本鎖糖鎖ライブラリ |
| GKPC-234 | α(2-3) シアル化 3 本鎖糖鎖ライブラリ |
| GKPC-264 | α(2-6) シアル化 4 本鎖糖鎖ライブラリ |

表 14 InstantPC ラベル化個別グリカン標準

| 製品コード | 説明 | 製品コード | 説明 |
|----------|--------------------------|----------|--------------------------|
| GKPC-401 | G0-N | GKPC-320 | G1FS1 (α 2,6) |
| GKPC-301 | G0 | GKPC-321 | A1 (α 2,3) |
| GKPC-402 | G0F-N | GKPC-311 | A1 (α 2,6) |
| GKPC-302 | G0F | GKPC-325 | A1F (α 2,3) |
| GKPC-317 | G1 | GKPC-315 | A1F (α 2,6) |
| GKPC-316 | G1F | GKPC-322 | A2 (α 2,3) |
| GKPC-304 | G2 | GKPC-312 | A2 (α 2,6) |
| GKPC-305 | G2F | GKPC-323 | A2F (α 2,3) |
| GKPC-403 | G1F + 1aGal | GKPC-313 | A2F (α 2,6) |
| GKPC-405 | G2F + 1aGal | GKPC-103 | Man5 |
| GKPC-318 | G2F + 2aGal | GKPC-104 | Man6 |
| GKPC-329 | G1S1 (α 2,3) | GKPC-105 | Man7 |
| GKPC-319 | G1S1 (α 2,6) | GKPC-106 | Man8 |
| GKPC-330 | G1FS1 (α 2,3) | GKPC-107 | Man9 |

www.agilent.com

© Agilent Technologies, Inc. 2025
Third edition, March 2025



5994-1231JAJP
GX96-IPC
Rev. AK
DE.5881597222

