

声明

© 安捷伦科技有限公司，2025

根据美国和国际版权法，未经 Agilent Technologies, Inc. 事先许可和书面同意，不得以任何形式或通过任何方法（包括电子存储和检索以及翻译成其他语言）复制本手册的任何部分。

手册部件号

5994-1231ZH-CN
GX96-IPC
修订版 AK

版本

第三版，2025年3月
中国出版
安捷伦科技有限公司

担保

本档所含资料“按原样”提供，在以后的版本中若有更改，恕不另行通知。此外，在适用法律许可的最大范围内，Agilent 对本手册及其所包含的信息不做任何明示和默示的担保，包括但不限于适销性以及适合特定用途的默示担保。Agilent 对提供、使用或应用本档及其所包含的任何信息所引起的错误或偶发或必然损坏概不负责。如果 Agilent 与用户之间单独签定的书面协议中所含的保证条款与本档中的条款冲突，则应以单独协议中的保证条款为准。

技术许可

本档中所述的硬件和/或软件是依据许可提供的，且只能根据此类许可的条款进行使用或复制。

权利限制说明

美国政府的受限权利。授予联邦政府的软件和技术数据权利仅包括通常提供给最终用户的那些权利。Agilent 根据 FAR 12.211（技术数据）和 12.212（计算机软件）和（对于国防部）DFARS 252.227-7015（技术数据 - 商品）以及 DFARS 227.7202-3（商业计算机软件或计算机软件文档中的权利）来提供软件和技术数据方面的此常规商业许可。

安全声明

小心

“小心”提示表示有危害。提醒您注意某个操作步骤、某项操作或类似问题，如果执行不当或未遵照提示操作，可能会损坏产品或丢失重要数据。在完全理解并满足指定条件之前，请勿忽略“小心”提示继续进行操作。

警告

“警告”提示表示有危险。提醒您注意某个操作步骤、某项操作或类似问题，如果执行不当或未遵照提示操作，可能会导致人身伤害或死亡。在完全理解并满足指定条件之前，请勿忽略“警告”提示继续进行操作。

目录

前言	5
试剂盒组成	6
由用户提供的设备和试剂	7
样品前处理注意事项	8
方案	9
入门指南	9
Gly-X 去糖基化	10
InstantPC 标记	10
InstantPC 净化	11
标记多聚糖的分析	14
用于 InstantPC 标记的多聚糖的推荐 HILIC 方法	15
用于 InstantPC 标记的多聚糖的建议 MS 条件	19
附录	20
推荐的自动化方案说明	20
常见问题解答	21
资源和参考文献	25
参考文献	25
技术支持	26
订购信息	27

前言

采用 InstantPC 的 Gly-X N-糖快速释放和标记试剂盒使用新型溶液内酶促蛋白质去糖基化，然后使用 InstantPC 染料快速标记游离 N-糖。经过简单的净化步骤后，多聚糖样品可通过 UHPLC、LC-MS、MS/MS 和其他方法进行分析。该方法在溶液中进行去糖基化和标记，简单且快速，非常适合自动化。InstantPC 染料可提供非常强的荧光亮度和 MS 信号，从而能够在不同的多聚糖分析工作流程中应用单一标记方法。其他优势包括：

- 分子尺寸小，可提高色谱峰分离度
- 灵活的高通量形式：处理 1 到 96 个样品
- 经优化的净化步骤可去除多余游离染料、蛋白质和其他干扰化合物

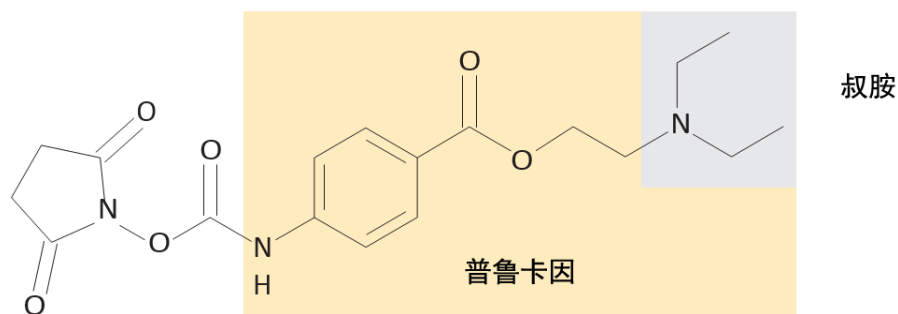


图 1. InstantPC 染料 (IPC)

试剂盒组成

采用 InstantPC 的 Gly-X (GX96-IPC) 染料试剂盒由三个模块组成。每个模块提供了足够的试剂，每次最多可处理 96 个样品。

表 1 试剂盒组成

模块	组成	单位	储存
Gly-X 去糖基化模块 GX96-100	Gly-X 去糖基化板, 96 孔	1	室温
	Gly-X N-糖苷酶, 1 mg/mL, 120 μ L	1	4 °C
	Gly-X 酶解缓冲液, 240 μ L	2	4 °C
	Gly-X 变性剂, 240 μ L	1	4 °C
Gly-X InstantPC 标记模块 GX96-101	InstantPC 染料 (冻干)	4	-20 °C
	InstantPC 染料溶剂, 600 μ L	1	-20 °C
Gly-X InstantPC 净化模块 GX96-102	Gly-X 净化板 A	1	室温
	Gly-X InstantPC 洗脱液	1	室温
	Gly-X 废液盘	1	室温
	Gly-X 密封盖, 用于使用过的孔, 黑色 (用于净化板)	96	室温
	Gly-X 收集板, 96 孔	1	室温
	密封膜 (预开口)	1	室温
	储存密封箔	1	室温

注意

Gly-X 洗脱液为含有 10% (v/v) 乙腈的 160 mmol/L 甲酸铵。

注意

采用 InstantPC 的 Gly-X 24 ct 试剂盒 (GX24-IPC) 包含 30 μ L Gly-X N-糖苷酶、一瓶 Gly-X 酶解缓冲液、一瓶 InstantPC 染料以及表中列出的所有其他试剂盒组成。

注意

净化模块需要 Gly-X 多管真空装置垫片 (GX100)。



图 2. GX100, Gly-X 多管真空装置垫片, 必需

由用户提供的设备和试剂

- 96 孔热循环仪或两个独立的加热模块，设置为 90 °C 和 50 °C（例如，Corning THERM-1001，110 V；THERM-1000，230 V）

注意

两个 GlykoPrep 加热器，WS0271，可配备 VWR 13259-260 模块化加热模块。

- 真空萃取装置 (Millipore MSVMHTS00)
- 真空泵（Millipore WP6211560，110 V；WP6122050，220 V；Welch WOB-L 泵 2522）

注意

如果您使用的真空装置和泵不是所建议的 Millipore 型号，请联系安捷伦获取指导：<https://www.agilent.com/en/contact-us/page>。沃特世真空装置可以用 GX200 垫片代替 GX100（见第 21 页“常见问题解答”）。

- Gly-X 多管真空装置垫片 (Agilent GX100)
- MS 级甲酸（建议使用 Fisher A117-50）
- MS 级乙腈 (ACN)（建议使用 Fisher A955-4）
- 可选 – 使用 AdvanceBio 离心柱（部件号 **1980-1103**）或 96 孔样品板（部件号 **1980-1104**）进行样品缓冲液置换。对于 AdvanceBio 离心柱，已包括收集管。对于 AdvanceBio 离心 96 孔样品板，建议将部件号为 5043-9308 的附件板用于清洗步骤，将部件号为 **5043-9312** 的附件板用于收集步骤，将部件号为 **5042-1389** 的密封垫用于储存密封。有关 AdvanceBio 离心柱的详细说明，请参阅用户指南 **5994-7244ZHCN**。

样品前处理注意事项

一般而言，应用不含去垢剂和亲核试剂（例如胺）的低盐中性缓冲液，配制最大浓度为 2 mg/mL 的糖蛋白样品。应用水或 50 mmol/L HEPES (pH 7.9) 稀释浓度较高的样品。

其他样品注意事项包括：

- 应避免使用胺缓冲液组分（例如，Tris、精氨酸、甘氨酸、组氨酸），因为这些组分会与 InstantPC 多聚糖标记染料发生反应。建议在对这些样品进行去糖基化之前，使用 AdvanceBio 脱盐离心柱（部件号 **1980-1103**）或 96 孔样品板（部件号 **1980-1104**）将缓冲体系置换为水或无干扰缓冲液（如 50 mM HEPES, pH 7.9）操作说明详见用户指南 **5994-7244ZHCN**，支持数据详见应用简报 **5994-7239EN**。或者，可以使用分子量截止值为 10 kDa 的旋转离心过滤器
- 应避免使用胺缓冲液组分（例如，Tris、精氨酸、甘氨酸、组氨酸），因为这些组分会与 InstantPC 多聚糖标记染料发生反应。对于这些样品，推荐在去糖基化步骤之前使用截留分子量为 10 kDa 的离心过滤装置进行缓冲液置换。可以使用水或无干扰的缓冲液（例如，50 mmol/L HEPES, pH 7.9）重悬蛋白质样品
- 当使用由 Protein A 亲和色谱制备的样品时，应使用 0.1% 甲酸而不是甘氨酸缓冲液作为洗脱液
- 含盐缓冲液（约 150 mmol/L 盐）中的样品可以使用该试剂盒，但是不建议使用 PBS（见第 21 页“**常见问题解答**”）。首选稀释剂为水或 50 mmol/L HEPES (pH 7.9) 的匹配缓冲液
- 根据蛋白质样品以及用于进样的所需数量/体积，可以使用低于 2 mg/mL 的样品
- 建议每次反应的最大蛋白质量为 40 µg（20 µL 的 2 mg/mL 溶液），但根据糖蛋白的不同，可以使用超过 40 µg 的量（见第 21 页“**常见问题解答**”）
- 蛋白质样品的 pH 不应低于 5.5。在开始该方案之前调节 pH，或在第 10 页“**Gly-X 去糖基化**”的**步骤 1**中向每 20 µL 样品中加入 3 µL Gly-X 酶解缓冲液
- 对于含柠檬酸盐的缓冲液，用水或 50 mmol/L HEPES (pH 7.9) 稀释样品，将柠檬酸盐降至 20 mmol/L 以下，或用分子量截留离心过滤器置换缓冲液

如果在 90 °C 下孵育时观察到沉淀（第 10 页“**Gly-X 去糖基化**”的**步骤 2**），请检查样品前处理过程和样品缓冲液中的含盐情况、pH 是否过低或可能存在的干扰性去垢剂。如果您对样品缓冲液与 Gly-X 方案的兼容性有疑问，请联系安捷伦：

<https://www.agilent.com/en/contact-us/page>。

方案

入门指南

- 1 样品前处理（见第 8 页“样品前处理注意事项”）
- 2 将热循环仪设置为 90 °C，或将两个独立的加热模块分别设置为 90 °C 和 50 °C
- 3 配制表 2 所示的工作溶液

表 2 工作溶液说明。对于含乙腈的溶液，请使用与有机溶剂兼容的试管、底槽或板（聚苯乙烯不兼容）

工作溶液	说明	注释
N-糖苷酶工作溶液	将 N-糖苷酶与 Gly-X 酶解缓冲液按 1:1 (v/v) 混合。对于每个样品，配制 2.4 μ L 工作溶液；对于八个孔的样品，将 9.6 μ L N-糖苷酶与 9.6 μ L 酶解缓冲液混合。	每个样品需要 2 μ L，混合超量 20% 的工作溶液。
InstantPC 染料溶液	从 -20 °C 下取出 InstantPC 染料和 InstantPC 染料溶剂。放置至室温，从干燥剂包中取出。 将 150 μ L InstantPC 染料溶剂加入 InstantPC 染料小瓶中，涡旋混合直至溶解。注：保留染料溶剂瓶，与其他染料小瓶配合使用。	每个样品需要 5 μ L。复溶的 InstantPC 染料和染料溶剂可以用干燥剂重新包装在可重新密封的袋子中，重新密封后在 -20 °C 下可储存长达三个月，并可进行四次冻融循环。在打开使用之前，使溶解的染料恢复至室温。 注：如果要从染料小瓶中转移出来，请使用与有机溶剂兼容的试管或板（聚苯乙烯不兼容）。
上样/清洗溶液 2.5% 甲酸/97.5% 乙腈	用于 96 个样品的储备液：将 6 mL 甲酸加入玻璃量筒中。用 100% 乙腈使体积达到 240 mL。转移至玻璃储存容器中，盖紧盖子，旋转混合。	每个样品需要约 2.4 mL 盖紧盖子，在室温 (RT) 下可储存长达六个月。

- 4 使用以下物品准备净化工作站：
 - a Gly-X 净化板 A
 - b Gly-X 收集板（PCR 板）
 - c 连接至真空泵的真空装置
 - d Gly-X 多管真空装置垫片 (Agilent GX100)
 - e 废液盘



Gly-X 去糖基化

- 1 将 2 μL Gly-X 变性剂（橙色盖小瓶）加入 Gly-X 去糖基化板的底部

注意

对于 pH 为 5.5 或更低的样品，另外加入 3 μL Gly-X 酶解缓冲液（白色盖小瓶）。

- 2 将各糖蛋白样品取 20 μL （约 2 mg/mL）加入 Gly-X 去糖基化板的底部。每次添加完毕后，用移液器混合均匀



- 3 在工作台上轻敲板，使样品聚集在孔底（或通过离心）
- 4 在 90 $^{\circ}\text{C}$ 下无盖孵育 3 分钟

注意

如果此时产生沉淀，请检查样品缓冲液组成。

- 5 取出板，在室温下放置 2 分钟，然后加入 N-糖苷酶
- 6 向每个样品中加入 2 μL N-糖苷酶工作溶液。使用移液器混合均匀
- 7 在工作台上轻敲板，使样品聚集在孔底（或通过离心）
- 8 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下无盖孵育 5 分钟
- 9 从加热模块上取下板，然后直接进行 InstantPC 标记

InstantPC 标记

- 1 向每个样品中加入 5 μL 上述配制的 InstantPC 染料溶液。每次添加完毕后，用移液器混合均匀。重复上述步骤，直至已将 InstantPC 染料溶液加入每个样品中

注意

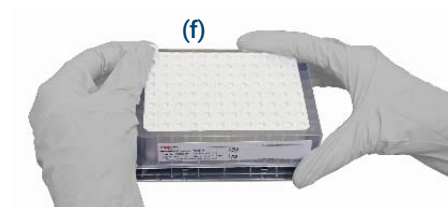
出现沉淀是正常的。

- 2 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下无盖孵育 1 分钟
- 3 盖紧 InstantPC 染料溶液，放入干燥剂包中，并放回 -20 $^{\circ}\text{C}$

InstantPC 净化

设置

- 1 按所需数量的孔，小心地取下白色盖子，准备 Gly-X 净化板 (f)



注意

将黑色联管盖 (g) 放置在先前净化程序中所用的孔上，防止重复使用这些孔。

注意

将净化板储存板 (h) 放到一旁，用于储存使用后的净化板。储存在提供的铝箔袋中。



- 2 将废液盘置于真空或正压提取装置中
- 3 组装完整的真空萃取装置 (i)



- 4.将 Gly-X 净化板 A 安装在真空萃取装置的顶部 (j)



上样

- 1 使用多通道移液器，将 400 μL 上样/清洗溶液加入 Gly-X 净化板中所需数量的孔中。请勿施加真空

注意

由于需要穿过净化板，上样/清洗溶液会有部分损失。立即继续执行步骤 2 或将上样/清洗溶液体积增加至 500 μL 以留出更多时间 (> 3 分钟)。

- 2 使用多通道移液器，向去糖基化板中的每个样品中加入 150 μL 上样/清洗溶液，用移液器混合，然后将整个样品（约 172 μL ）转移至 Gly-X 净化板相应的孔中。用移液器混合均匀

注意

在对多个样品进行前处理时，建议使用多通道移液器逐行或逐列上样，以尽可能减少板孔中的上样/清洗溶液损失。

- 3 重复上述步骤，直至将所有样品都转移至净化板中
- 4 施加真空，压力 < 5 英寸汞柱。使溶液穿过，直到孔中的溶液排空

注意

此步骤将样品加入到 Gly-X 净化板中。

清洗

- 1 用 600 μL 上样/清洗溶液进行清洗，并施加真空，使压力达到 2 英寸汞柱，将清洗液收集到废液盘中
- 2 用第二份和第三份 600 μL 上样/清洗溶液重复以上步骤

注意

所有孔都应完全排空，如果没有，2 分钟后，将真空增加至 10 英寸汞柱。

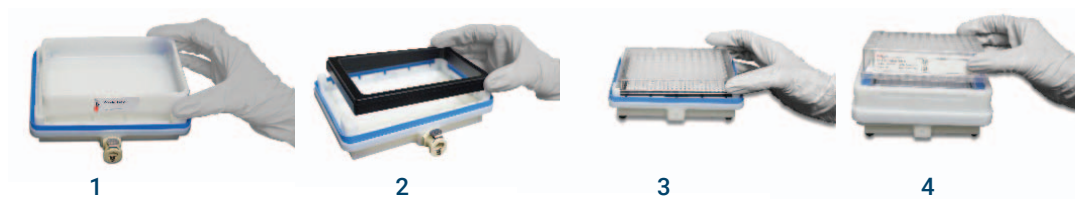
注意

如果处理超过 48 个样品，请在第二次清洗后清空废液盘（废液盘可容纳约 120 mL）。

- 3 释放真空，取下净化板并在纸上吸干。清空废液盘

洗脱

- 1 从真空萃取装置中取下废液盘
- 2 将 Gly-X 多管真空装置垫片 (Agilent GX100) 放入真空萃取装置中
- 3 将收集板放到多管真空装置垫片顶部并重新组装真空萃取装置
- 4 将 Gly-X 净化板安装在真空萃取装置的上方



- 5 向每个孔中加入 100 μL Gly-X InstantPC 洗脱液。使用真空（2 英寸汞柱或更低），将样品洗脱到收集板中

注意

所有孔都应完全排空，如果没有，2 分钟后，将真空增加至 10 英寸汞柱。

- 6 释放真空，取下净化板，然后放到储存板上
- 7 取下收集板。可选：使用试剂盒中的预开口密封膜密封收集板，以便在 UHPLC 上使用。为了在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下长期储存，请使用试剂盒中的箔密封膜。可以将密封箔密封在预开口密封膜的外面，并在放置到自动取样器上之前将其取下

注意

密封箔仅用于储存，与 UHPLC 不兼容。更多选件，请参见第 21 页“常见问题解答”。

- 8 涡旋混合，并旋转/敲击以将样品收集在孔底，或用移液器混合

注意

这一最终洗脱后混合步骤对于获得一致的结果至关重要。

- 9 将净化板放到储存板 (i) 上，用黑色的“用过的孔”密封盖盖住用过的净化板孔 (h)，将净化板放回箔袋中并储存于室温下
- 10 InstantPC 标记的多聚糖样品可直接用于分析。样品可在 Gly-X InstantPC 洗脱液中于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存长达 6 个月，或在 Gly-X InstantPC 洗脱液或用 ACN/DMF 稀释后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存长达 5 天（见第 14 页“标记多聚糖的分析”）



标记多聚糖的分析

对于荧光检测，与 N-糖偶联的 InstantPC 的最佳激发和发射波长为：

- 激发：285 nm
- 发射：345 nm

紫外检测也可用于 InstantPC 标记的多聚糖，将紫外检测器激发波长设置为 285 nm^[1]。为了在紫外检测下获得理想信号，可能需要增加样品上样量，请联系安捷伦了解更多详情。

对于采用荧光检测的 UHPLC，推荐进样 1 μ L 含有 InstantPC-多聚糖的 Gly-X InstantPC 洗脱液（160 mmol/L 甲酸铵，10% (v/v) 乙腈）。请勿在 UHPLC-HILIC 中进样超过 1 μ L 的 InstantPC 洗脱液，因为这可能会影响峰形。

- 如果需要对 InstantPC-多聚糖采用更大的进样量 (> 1 μ L)，请勿单独使用乙腈稀释样品，因为这可能会导致唾液酸化多聚糖发生沉淀。使用 1 份溶于洗脱液的样品与 3 份 1:1 [v/v] ACN:DMF，最终浓度为 22.5% 水性缓冲液、37.5% DMF、40.0% ACN，以更接近 HILIC 方法开始时的高有机相比例 (%)

用于 > 1 μ L HILIC 进样的 Gly-X InstantPC 标记的多聚糖样品的稀释示例：

表 3 推荐用于 InstantPC 标记的多聚糖样品和标准品的稀释

所需总体积 (μ L)	10% 有机 Gly-X 洗脱液中的 IPC 标记的多聚糖样品 (μ L)	IPC 标记的多聚糖标准品 (μ L)*	1:1 [v/v] ACN:DMF (μ L)	有机相 (%)	水相 (%)
10	2.5		7.5	77.5	22.5
20	5		15	77.5	22.5
40	10		30	77.5	22.5
10		2.5	7.5	75	25
20		5	15	75	25
40		10	30	75	25

* 之前按照标准品随附的说明复溶于 100 mmol/L 甲酸铵 (pH 4.4 至 5) 或水中的 InstantPC 标记的标准品。

用于 InstantPC 标记的多聚糖的推荐 HILIC 方法

Agilent AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱

Agilent AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱设计用于 N-糖的 HILIC 分离。全多孔 1.8 μm 硅胶颗粒填料和独特的键合技术提供了优异的长期稳定性和重现性，同时可实现复杂 N-糖混合物的出色分离。

推荐的起始条件

有关安装、色谱柱活化和操作参数（pH 值、温度和压力）的说明，请参阅 AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱用户手册 **5994-6915ZHCN**。

- AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱，2.1 \times 150 mm, 1.8 μm （部件号 859750-913）
- 流动相 A: 50 mM 甲酸铵，用甲酸将 pH 调节至 4.4，或由 Agilent AdvanceBio 甲酸铵 HILIC 流动相浓缩液（部件号 G3912-00000）制得
- 流动相 B: 乙腈
- 柱温: 60 $^{\circ}\text{C}$
- 流速: 0.5 mL/min
- 激发波长 285 nm，发射波长 345 nm

注意

示例中采用 1 μL 水溶液进样。如需增加进样量，请参考表 3 获取相关指导。

表 4 高度复杂或唾液酸化多聚糖样品的推荐起始梯度

时间 (min)	%B	流速 (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

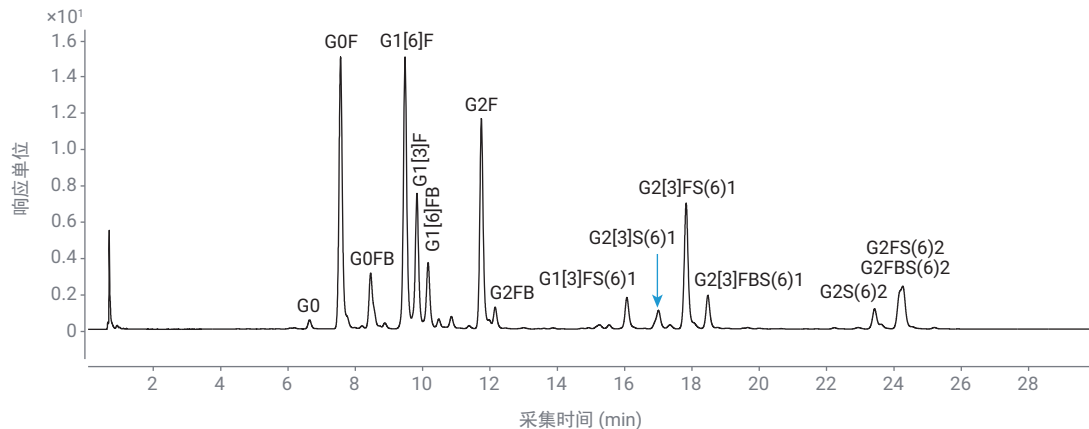


图 3. 使用 60 分钟梯度得到的 Agilent AdvanceBio InstantPC 人 IgG N-糖文库（部件号 GKPC-005）的色谱图示例

表 5 简单中性多聚糖样品的推荐起始条件

时间 (min)	%B	流速 (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

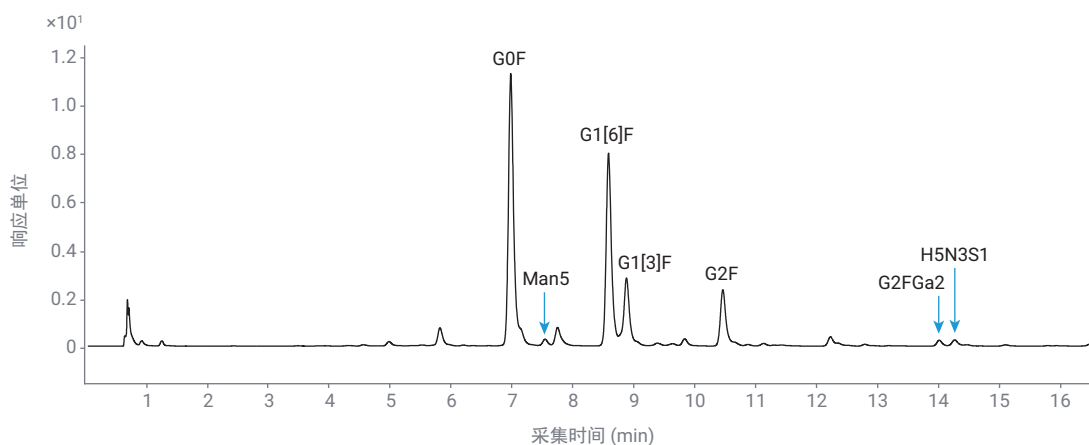


图 4. 使用 30 分钟梯度得到的从 Agilent-NISTmAb 中释放的 Agilent AdvanceBio InstantPC 标记的 N-糖色谱图示例

更多方法和数据请参阅应用简报 **5994-6916ZH-CN** 《用于游离 N-糖 LC/FLD/MS 分析的改进亲水相互作用液相色谱》

多聚糖峰归属工具 (GPAT)

仅凭 HILIC 保留时间 (RT) 往往不足以将众多可能的多聚糖结构与所得的色谱峰准确匹配。通过基于葡萄糖单元 (GU) 归一化的多聚糖保留时间数据库可以预测峰归属。多聚糖峰归属工具 (GPAT) 包含 100 多种 InstantPC 和 2-AB 标记 N-糖的 GU 值数据库, 这些数据是使用 AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱和相应流动相进行分离获得的。该工具是一款网页版应用程序, 使用非常简单, 只需输入使用 InstantPC 标记的分子量标准品 (部件号 GKPC-503) 获得的保留时间 (RTs) 即可。该工具使用通过分子量标准品获得的保留时间, 利用数据库生成预测的 N-糖保留时间列表, 全程无需输入其他敏感的样品信息。

在应用简报 **5994-7477EN** 中, 我们使用该工具对西妥昔单抗中存在的多聚糖进行了标注, 并验证了 GPAT 对各种多聚糖结构的预测准确性。

该工具专门设计用于通过 2.1 × 150 mm Agilent AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱 (部件号 859750-913) 采集的数据, 可通过安捷伦网站 www.agilent.com/biopharma/gpat 免费使用。

关于 GPAT 的应用简报 **5994-7477EN** 中使用了以下 LC 方法:

表 6 用于含有中性、S1 和 S2 多聚糖的 InstantPC 多聚糖样品的 LC 梯度

时间 (min)	%B
0	77
45	59
46	40
47	40
49	77
60	77

表 7 用于含有中性至 S4 多聚糖的 InstantPC 多聚糖样品的 LC 梯度

时间 (min)	%B
0	77
75	47
76	40
77	40
79	77
90	77

用于 Waters BEH 多聚糖分离技术色谱柱的 15 分钟 UHPLC 方法:

2.1 × 100 mm, 1.7 μm。柱温 60 °C, 激发波长 285 nm, 发射波长 345 nm。

表 8 15 分钟方法, 沃特世色谱柱

时间 (min)	流速 (mL/min)	ACN (%)	100 mmol/L 甲酸铵, 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

用于 Waters BEH 多聚糖分离技术色谱柱的 60 分钟 UHPLC 方法:

2.1 × 150 mm, 1.7 μm。柱温 60 °C, 激发波长 285 nm, 发射波长 345 nm。

注意

此方法已用于应用简报 [5994-0942EN](#) 《游离 N-糖 LC/MS 分析中常用荧光标记的比较》。

表 9 60 分钟方法, 沃特世色谱柱

时间 (min)	流速 (mL/min)	ACN (%)	50 mmol/L 甲酸铵, 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

用于 InstantPC 标记的多聚糖的建议 MS 条件

质谱条件

安捷伦喷射流 ESI 离子源，任何 MS，正离子模式，鞘气 300 °C (10.0 L/min)，干燥气 150 °C (9.0 L/min)，雾化器压力 35 psig，毛细管电压 2500 V，喷嘴电压 500 V，碎裂电压 120 V（如果适用）， m/z 范围 600–3000。

Waters Xevo G2-S QTof，正离子模式，毛细管电压 2.8 kV，锥孔电压 30 V，离子源温度 120 °C，脱溶剂温度 350 °C，扫描时间 0.8 秒， m/z 范围 300–2000 Da。

MS/MS 条件

碰撞能量递增范围为 40–60 V (+1)；15–30 V (+2)；15–25 V (+3)；扫描时间 1.0 秒， m/z 范围 50–2000 Da。

计算 InstantPC 标记的多聚糖的质量

虽然在方案中用 InstantPC 标记糖胺形式的多聚糖，但许多多聚糖质量计算的起点是未标记多聚糖的自由还原末端形式。为此，我们提供了两种计算方法，一种使用多聚糖的自由还原末端质量作为起点计算 InstantPC 标记的多聚糖的质量，另一种基于添加至糖胺中的 InstantPC。

具有自由还原端的多聚糖增加的质量：

- 多聚糖质量（自由还原端） + $C_{14}N_3O_2H_{19}$ = InstantPC 标记的多聚糖的质量
- 由 $C_{14}N_3O_2H_{19}$ 增加的质量
 - 单一同位素：261.14773 Da
 - 平均值：261.3196 Da

糖胺增加的质量：

- 多聚糖质量（糖胺） + $C_{14}N_2O_3H_{18}$ = InstantPC 标记的多聚糖的质量
- 由 $C_{14}N_2O_3H_{18}$ 增加的质量
 - 单一同位素：262.13174 Da
 - 平均值：262.3043 Da

附录

推荐的自动化方案说明

编写了以下样品和试剂体积说明，以满足 Gly-X 方案自动化的移液要求（第 14 页表 3）。自动化方案中的试剂比例与标准方案相当，但最小移液体积从 2 μL 变为 5 μL ，以提高自动化移液的可靠性。

表 10 样品、变性剂和 N-糖苷酶的工作溶液说明，以满足 5 μL 的最小移液体积要求。按照第 9 页表 2 中所述配制其他工作溶液。

样品和试剂	标准方案	自动化方案
样品	20 μL ，最高 2 mg/mL（最大值 40 μg ）*	15 μL ，最高 2.67 mg/mL（最大值 40 μg ）*
变性剂	每个样品使用 2 μL 纯变性试剂。	用水按 2:3 (v/v) 稀释变性剂。 每个样品使用 5 μL 稀释变性试剂。 务必按超量 20% 配制稀释变性试剂。 例如，对于八个样品，配制 48 μL 试剂（19.2 μL 变性试剂，28.8 μL 水）。
N-糖苷酶工作溶液	按 1:1 (v/v) 混合 N-糖苷酶与 Gly-X 酶解缓冲液，配制 N-糖苷酶工作溶液。 每个样品使用 2 μL N-糖苷酶工作溶液。 务必按超量 20% 配制 N-糖苷酶工作溶液。 例如，对于八个样品，配制 20 μL 溶液。	按 1:1:3 (v/v/v) 混合 N-糖苷酶、Gly-X 酶解缓冲液与水，配制 N-糖苷酶工作溶液。 每个样品使用 5 μL N-糖苷酶工作溶液。 务必按超量 20% 配制 N-糖苷酶工作溶液。 例如，对于八个样品，配制 48 μL 溶液（9.6 μL N-糖苷酶，9.6 μL Gly-X 酶解缓冲液，28.8 μL 水）。

* 可以使用最多 100 μg 的糖蛋白，具体取决于样品类型（见第 21 页“常见问题解答”）。

常见问题解答

问：为什么不推荐使用 PBS 作为样品稀释剂？

答：PBS 与 Gly-X InstantPC 试剂盒兼容，但是使用 PBS 稀释样品可能会导致伪峰。这些峰会在分离早期在游离染料峰附近洗脱，不会干扰 N-糖分析。为获得理想性能，最好用水或 pH 7.9 的 50 mmol/L HEPES 稀释样品。

问：每次反应使用的蛋白质能否超过推荐的 40 µg 上限？

答：这可能取决于蛋白质。通常，该样品前处理流程可用于多达 100 µg 的蛋白质，但用户应进行测试以确保可以使用 > 40 µg 蛋白质，而不会导致：a) 多聚糖相对百分比峰面积值的线性响应损失，或 b) 添加变性剂后发生沉淀。

问：我的样品没有完全上样至 Gly-X 净化基质中（上样步骤 9），发生了什么？

答：这可能是由蛋白质样品的性质引起的，也可能是由您的制剂缓冲液的组成所导致的基质效应引起的。可以通过减少每次反应使用的蛋白质量或在开始 Gly-X 方案之前对蛋白质进行缓冲液置换来解决。

问：我想要向 UHPLC-HILIC 中进样 1 µL 以上。为什么需要用 DMF 稀释样品？

答：在 HILIC 分离中，多聚糖在高浓度有机溶剂中与色谱柱结合，然后通过梯度过程中增加水相浓度从色谱柱中洗脱。我们发现，1 µL 的水溶液进样量与 UHPLC-HILIC 方法兼容，但水溶液进样量大于 1 µL 时会在 HILIC 方法开始时破坏高有机相条件，导致峰展宽/前伸。为此，我们建议在进样量 > 1 µL 时，将一份洗脱液样品用三份 1:1 [v/v] ACN:DMF 稀释。

问：为什么在 HILIC 进样之前不能使用乙腈稀释样品？可以使用 DMF 以外的其他溶剂进行稀释吗？

答：如果单独用乙腈稀释 Gly-X 洗脱液中 InstantPC 标记的多聚糖，则可能导致唾液酸化多聚糖发生沉淀。我们尚未测试使用 DMF 外的其他替代溶剂进行样品稀释。

问：我发现通过 LC 分析得到的标记的多聚糖的荧光信号较低，我该如何解决？

答：有几种方法可以提高信号，但首先需要检查所用的 FLD 激发/发射波长（285/345 nm，[第 14 页](#)）。

这些方法包括（按优先顺序排序）：

- 1 在用 ACN:DMF 稀释后，将更多标记的多聚糖进样至 LC（[第 14 页](#)）。
- 2 在净化方案中，在[第 13 页](#)的洗脱步骤 5 中，用 50 µL 而不是 100 µL InstantPC 洗脱液洗脱标记的多聚糖。这应该适用于大多数样品类型。如有任何疑问，请联系安捷伦。
- 3 使用诸如 SpeedVac（不加热）等装置干燥多聚糖，然后使用更小的体积重悬，这应该适用于许多样品类型。InstantPC 洗脱液含有 160 mmol/L 甲酸铵和 10% [v/v] 乙腈。甲酸铵是一种挥发性缓冲液，因此可以通过在 SpeedVac 中旋转蒸发进行干燥，并关闭加热设置以保护样品。可以将样品重悬于 100 mmol/L 甲酸铵 (pH 4.7 ± 0.3) 中。InstantPC 洗脱液也可用作重悬的替代溶剂。请勿用水重悬干燥的 InstantPC 标记的多聚糖，因为这可能会影响样品稳定性。

根据 SpeedVac 的情况，在干燥过程中，管壁上可能会出现甲酸铵膜。如果这是一个问题，请重悬样品并再次干燥。

如果您已经将 InstantPC 洗脱液中的样品与 1:1 DMF:ACN 混合以实现 > 1 μL 的 LC 进样，我们不建议干燥样品。在不加热（加热可能对多聚糖产生不利影响）或极低压力的情况下，很难通过旋转蒸发干燥含有 DMF 的样品。

问：我可以将收集板直接放入 UHPLC 自动进样器中吗？收集板的尺寸是多少？

答：可以。

对于使用 OpenLab 2 操作的安捷伦液相色谱，请在 Control Panel（控制面板）中关闭与仪器的连接，然后选择 **Configure Instrument**（配置仪器）。右键单击以打开自动进样器模块，在该窗口底部单击 **Define Sample Containers**（定义样品容器）以查看选项列表。新增一个选项，具体参数如图 5 所示。

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	

图 5. 编辑孔板选项

对于使用 MassHunter 操作的安捷伦液相色谱，可以使用 Instrument Configuration（仪器配置）工具以类似的方式配置收集板。

图 6 显示了可用于例如 Waters Acquity UHPLC 的设置。

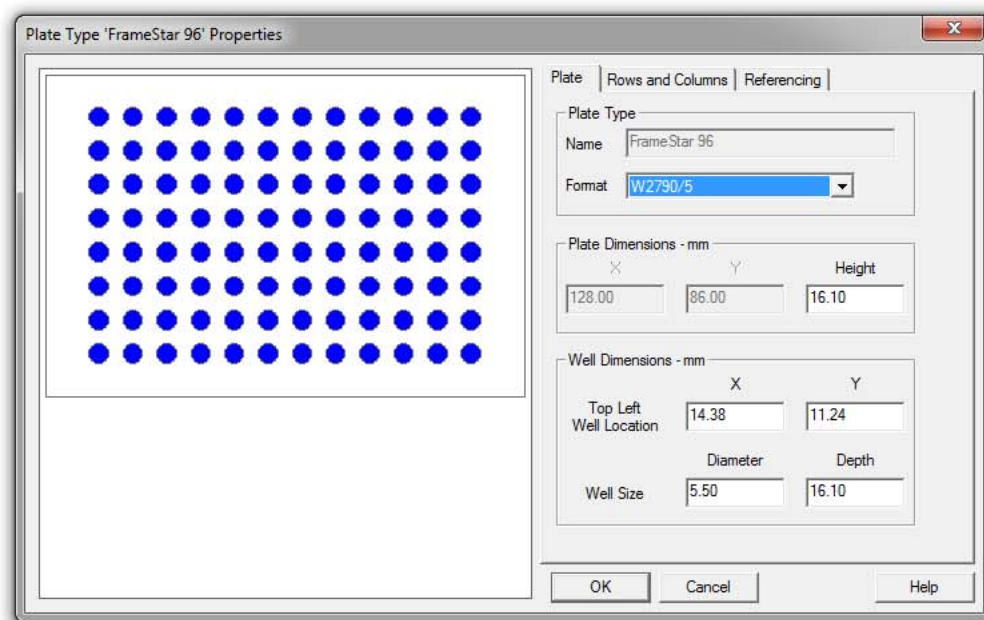


图 6. Waters Acquity UHPLC 设置示例

注意

从板中进样时，应避免使用常规粘合箔或粘合密封膜，因为粘合剂会导致针头出现问题。需要去除粘合密封箔和密封膜。使用试剂盒中的预开口密封膜（孔区域无粘合剂）或热封可穿刺箔（请勿使用储存密封箔）。避免使用任何在孔正上方有粘合剂的盖子/密封箔；粘合剂可能会损坏 UHPLC 针头。用试剂盒中的预开口膜密封后，可以用该试剂盒中的密封箔再密封一层，以便于储存。在分析之前去掉密封箔，仅保留预开口膜。其他密封箔可以从赛默飞世尔科技订购 (AB-0626)。

收集板可以用密封膜（预开口）密封，也可以使用微孔板热封膜机（例如，Thermo ALPS 50 V 半自动微孔板热封膜机，#AB-1443）用可穿刺箔（例如，Thermo Easy Pierce 易穿刺 20 μm 箔，#AB-1720）热封。

收集板尺寸也可通过制造商网站查询：Framestar 96 孔全裙边 PCR 板（#4ti-0960/C，E&K 货号 75094）。用于 GX96-IPC 手册 AA 版和 AB 版的收集板为 #50-823-843 (4721)。

在不调节针头的情况下，使用该方法的死体积约为 15 μL 。样品也可以转移到专为提高回收率而设计的样品瓶中（例如，Waters Total Recovery 样品瓶）。

问：你们建议使用 100 mmol/L 甲酸铵进行 5 分钟 HILIC 分离，使用 50 mmol/L 甲酸铵进行 60 分钟分离，是吗？

答：对于快速分离，我们使用 100 mmol/L 甲酸铵；对于 MS 结合较长时间的分离，我们使用 50 mmol/L 甲酸铵。

问：在 InstantPC 标记的多聚糖的 MS 分析中，最常见的加合物是什么？

答：在正离子模式 MS 中，大多数二天线型 InstantPC N-糖将产生 $[M+2H]^+2$ ，较大的唾液酸化糖型大部分为 $[M+3H]^+3$ 。请访问 www.agilent.com/glycanmass，参考在正离子模式 MS 下 InstantPC 标记的多聚糖最常见的加合物及其质量的列表。

问：我可以将 GX96-IPC 试剂盒用于沃特世真空萃取装置吗？

答：可以，只需要在洗脱步骤中使用 GX200 Gly-X 多管真空装置垫片（沃特世真空萃取装置）代替 GX100 即可（第 12 页）。当使用沃特世真空萃取装置 (#186001831) 时，使用 GX200 可以在净化板与收集板之间保持合适的距离。这在将标记的 N-糖洗脱到收集板中时避免交叉污染至关重要。请联系安捷伦了解更多详情：<https://www.agilent.com/en/contact-us/page>。

资源和参考文献

访问安捷伦网站，获取更多信息、出版物和技术简报：

www.agilent.com

产品使用、质保和使用许可

销售条款与条件可参见：www.agilent.com

虚拟专利标记

访问 www.agilent.com，获取安捷伦产品和专利列表。

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**

技术支持

安捷伦致力于开发快速、自动化多聚糖分析方法。联系我们，讨论正在开发中的产品。我们高度重视客户的意见，并且鼓励您与我们联系。我们欢迎您就产品性能或新应用和技术提出建议。

如果您有任何疑问或意见，请联系我们：<https://www.agilent.com/en/contact-us/page>。

订购信息

表 11 试剂盒和模块

产品代码	描述
GX96-IPC	采用 InstantPC 的 Gly-X 试剂盒 (96-ct)
GX24-IPC*	采用 InstantPC 的 Gly-X 试剂盒 (24-ct)
GX96-201PC	采用 InstantPC 的 Gly-X 去糖基化和标记模块组 (96-ct)
GX24-201PC	采用 InstantPC 的 Gly-X 去糖基化和标记模块组 (24-ct)
GX96-101	Gly-X InstantPC 标记模块 (96-ct)
GX24-101	Gly-X InstantPC 标记模块 (24-ct)
GX96-102	用于 InstantPC 的 Gly-X 净化模块 (96-ct)
GX100	Gly-X 多管真空装置垫片 (2/包)
GX200	Gly-X 多管真空装置垫片 (沃特世多管处理装置)
G5524-60010 KIT	AssayMAP PA50 Protein A 亲和纯化试剂盒 (96 ct)

* 24-ct 试剂盒 (GX24-IPC) 包含一块 96 孔净化板。将净化板储存于室温下，并订购 24-ct 重新填充的 Gly-X InstantPC 去糖基化和标记模块 (GX24-201PC)

表 12 AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱和流动相浓缩液

部件号	描述
859750-913	AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm
858750-913	AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm
G3912-00000	AdvanceBio 甲酸铵流动相浓缩液 (制备 1 L 50 mM 甲酸铵溶液, pH 4.4)

表 13 InstantPC 标记的多聚糖文库

产品代码	描述
GKPC-005	人 IgG N-糖文库
GKPC-503	葡萄糖均聚物
GKPC-020	CHO mAb N-糖文库
GKPC-020-P	CHO mAb N-糖文库 + CHO mAb 糖蛋白
GKPC-233	α(2-3) 唾液酸化三天线型文库
GKPC-263	α(2-6) 唾液酸化三天线型文库
GKPC-234	α(2-3) 唾液酸化三天线型文库
GKPC-264	α(2-6) 唾液酸化四天线型文库

表 14 InstantPC 标记的不同多聚糖标准品

产品代码	描述	产品代码	描述
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

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2025
第三版，2025年3月



5994-1231ZHCN
GX96-IPC
修订版 AK
DE.5881597222

