

消耗品工作流程订购指南

使用 AdvanceBio Gly-X InstantPC 样品前处理和 LC/FLD/MS 对生物 治疗性糖蛋白进行 N-糖分析

简化和标准化的 N-糖分析流程

N-糖的位点和结构在治疗性蛋白质的药物理学中发挥着重要作用，可能会影响免疫原性、药代动力学和药效学。Agilent AdvanceBio Gly-X 是新一代 N-糖样品前处理平台^[1]，提供了简化的溶液内工作流程，使用 InstantPC 染料进行快速多聚糖标记以及高效的真空净化步骤以去除多余的标记物和变性剂，从而获得高的荧光检测 (FLD) 和质谱 (MS) 信号。标记的 N-糖样品可立即用 UHPLC/FLD/MS 进行相对定量，使用 AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱用亲水相互作用液相色谱，在 60 分钟或更短的时间内完成分析。此外，还提供各种 InstantPC 标记的 N-糖标准品以用于校准 N-糖分离和鉴定 N-糖类型。



图 1. 使用 Gly-X InstantPC 样品前处理与 LC/FLD/MS 的游离 N-糖分析工作流程

安捷伦设计和制造的端到端 N-糖分析工作流程解决方案

在本指南中，您将找到使用 InstantPC 开始 N-糖分析所需的消耗品。我们测试了多种产品，结果报告于应用简报 5994-1348ZHCN 中^[2]。本研究评估了利妥昔单抗 (Rituxan, 一种单克隆抗体或 mAb) 和依那西普 (恩利, 一种 Fc 融合蛋白) 的 N-糖，并证明与 2-AB 标记的多聚糖相比，InstantPC 标记的 N-糖分析表现出显著更高的荧光信号和更高的 MS 电离效率，从而能检测低丰度的多聚糖类型。

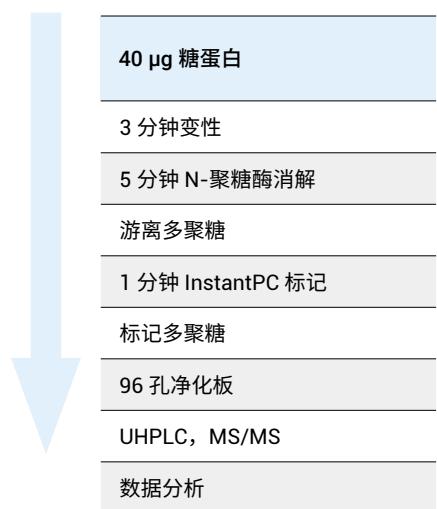
本 Gly-X InstantPC N-糖分析工作流程指南包括以下订购信息：

- 样品前处理试剂盒 — Gly-X InstantPC 技术，专为 LC/FLD 中的强荧光信号和 MS 分析增强电离而开发和优化
- InstantPC 标记的 N-糖标准品 — 特征明确的糖型单标和文库在分析 N-糖类型方面发挥重要作用，这些 N-糖可能影响生物治疗药物的安全性和有效性
- 用于通过 HILIC 分离多聚糖的液相色谱柱
- 溶剂和试剂
- 可直接稀释的流动相浓缩液
- 样品瓶和瓶盖
- 数据分析与报告

以下是提高 N-糖分析效率的方法

- 样品前处理仅需不到 1 小时，便可用于 UHPLC/FLD 或 LC/MS
- 5 分钟的 PNGase F 酶解可提供无偏差 N-糖释放
- InstantPC 染料可实现 UHPLC/FLD 和 MS 高信号
- 简便易用且环境稳定的 96 孔净化板
- 支持快速的高分离度分析
- 模块形式丰富，可根据样品通量灵活选用，避免浪费

图 2 显示了由 Gly-X InstantPC 配制的利妥昔单抗和依那西普的游离 N-糖的 HILIC/FLD 数据示例。包括用于 N-糖结构归属的 MS 数据的更多信息列于应用简报 5994-1348ZHCN 中。



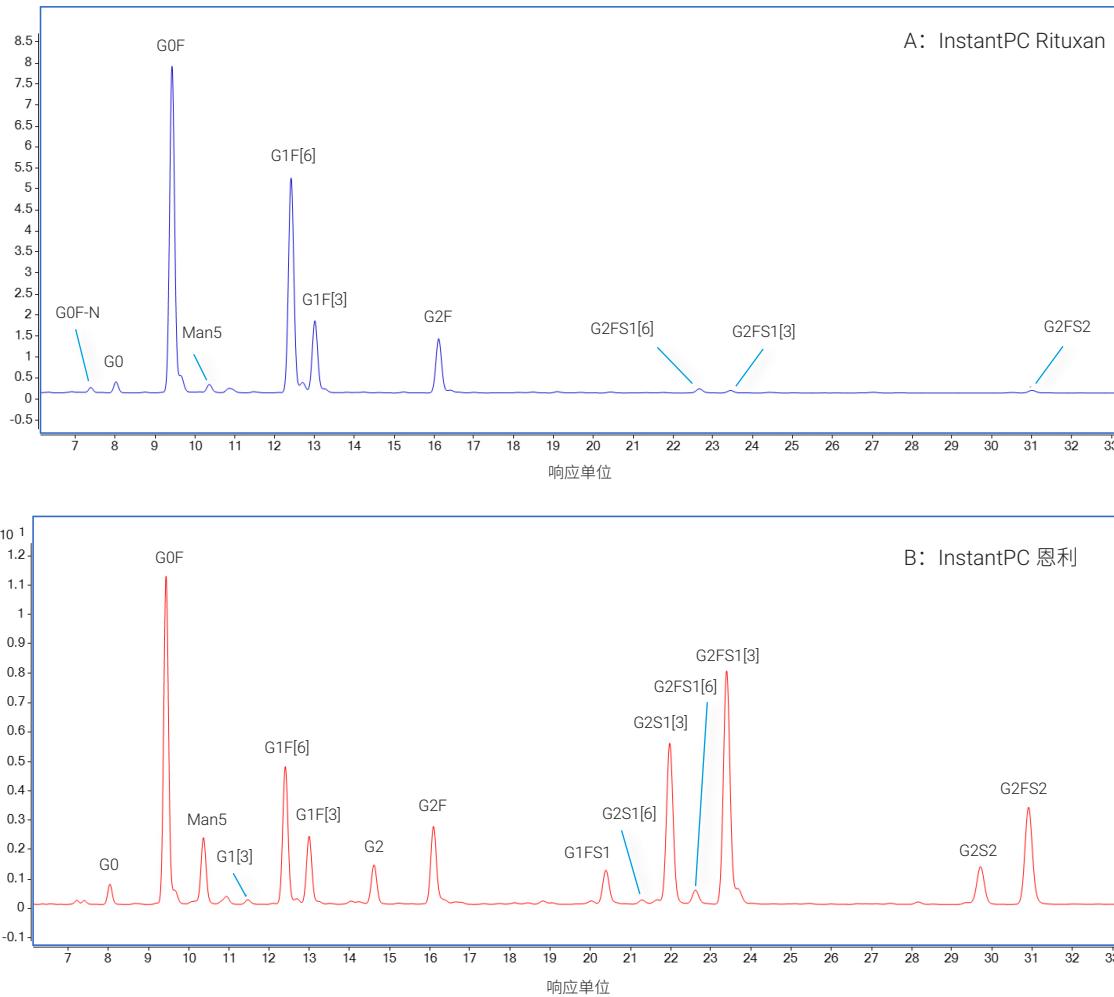


图2. 用 InstantPC 标记的 A) Rituxan 和 B) 恩利 N-糖 HILIC-UHPLC 荧光谱图。N-糖相对面积百分比如表 1 和表 2 所示, $n = 4$ 。
HPLC 条件和 Q-TOF 参数列于表 3 和表 4 中

表 1. 用 InstantPC 标记的恩利 N-糖的相对峰面积百分比、SD 和 %CV, $n = 4$

	平均相对峰 面积 (%)	标准偏差	%CV
G0F-N	0.520	0.000	0.000
G0	1.288	0.005	0.388
G0F	42.965	0.031	0.072
Man5	1.003	0.010	0.955
G1F[6]	29.453	0.031	0.105
G1F[3]	10.203	0.030	0.293
G2F	7.858	0.013	0.160
G2FS1[6]	0.675	0.010	1.481
G2FS1[3]	0.378	0.015	3.974
G2FS2	0.455	0.010	2.198

表 2. 用 InstantPC 标记的利妥昔单抗 N-糖的相对峰面积百分比、SD 和 %CV, $n = 4$

	平均相对峰 面积 (%)	标准偏差	%CV
G0	1.138	0.005	0.440
G0F	20.340	0.055	0.269
Man5	4.073	0.015	0.368
G1[3]	0.320	0.008	2.552
G1F[6]	9.130	0.037	0.410
G1F[3]	4.523	0.013	0.278
G2	2.628	0.010	0.364
G2F	5.573	0.015	0.269
G1FS1	2.628	0.015	0.564
G2S1[6]	0.268	0.005	1.869
G2S1[3]	13.235	0.033	0.251
G2FS1[6]	1.148	0.005	0.436
G2FS1[3]	20.185	0.057	0.285
G2S2	3.478	0.005	0.144
G2FS2	9.143	0.030	0.327

表 3. 用于 InstantPC 标记的 N-糖分析的 Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD 条件

参数	值	
色谱柱	Agilent AdvanceBio 酰胺 HILIC, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859750-913)	
柱温	60 °C	
流动相	A) 50 mmol/L 甲酸铵, pH 4.4 B) 乙腈	
梯度程序	时间 (min)	%B
	0	77
	45	59
	46	40
	47	40
	49	77
	60	77
进样量	1 μL	
荧光检测	Agilent 1260 Infinity II FLD InstantPC: $\lambda_{\text{Ex}}^{\circ}$ 285 nm, $\lambda_{\text{Em}}^{\circ}$ 345 nm	

表 4. 用于 InstantPC 标记的 Agilent 6545XT Q-TOF 参数

Agilent 6545XT Q-TOF	
离子源	双 AJS ESI
气体温度	150 °C
干燥气流速	9 L/min
雾化器	35 psi
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	10 L/min
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	120 V
锥孔电压	65 V
质量数范围	m/z 600–3000
扫描速率	1 质谱图/秒
采集模式	宽动态范围 (2 GHz)

Gly-X InstantPC 入门

糖蛋白样品前处理的注意事项

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。

- 最大浓度：2 mg/mL
- 每次反应的最大蛋白质含量：40 μg（如各 2 mg/mL 的 2 μL 溶液）。可使用更高含量的蛋白质（最高达 100 μg），但应对数据线性进行评估
- 缓冲液：不含去垢剂和亲核试剂（例如胺）的低浓度盐（约 150 mmol/L）中性缓冲液。可用水或 50 mmol/L HEPES (pH 7.9) 稀释样品

其他注意事项：

- 在去糖基化之前，胺缓冲液（例如 Tris、精氨酸、甘氨酸、组氨酸）组分中的样品应遵循缓冲液交换步骤。推荐使用分子量截止值为 10 kDa 的旋转离心过滤器
- 在使用 Protein A 亲和层析进行样品前处理时，应使用 0.1% 甲酸作为洗脱液
- 不建议使用 PBS
- 请参阅 Gly-X InstantPC 手册了解更多详细信息^[5]

孵育和净化硬件

在 Gly-X InstantPC 样品前处理过程中，将样品加热至 90 °C 进行蛋白质变性，将其加热至 50 °C 进行 PNGase F 消解和 InstantPC 标记。加热试剂盒内 96 孔板中的样品，建议使用热循环仪或干式加热器模块，并且下文提供了建议。净化过程由真空驱动。如果您不想使用建议的 Millipore 型号的负压真空装置和泵，请联系安捷伦。

加热和真空硬件（非安捷伦）	部件号
96 孔热循环仪 (Corning)	THERM-1001, 110 V THERM-1000, 230 V
干式加热器模块，4 个模块，HB4DG, US (数量: 2) (Troemner)	HB4DG
模块化加热模块 (数量: 2) (VWR)	VWR 13259-260
多管真空装置 (Millipore)	MSVMHTS00
真空泵 (Millipore)	WP6211560, 110 V WP6122050, 220 V

HILIC 分离最佳实践

小体积进样量 (1 μ L) 的标记多聚糖最适合 HILIC 分离。水溶液进样量大于 1 μ L 将影响峰形和分离度。有关使用有机溶剂稀释样品以实现大于 1 μ L 的进样量的说明，请参阅 Gly-X InstantPC 用户手册 ([5994-1231EN](#)) 第 14 页。

用户应优化其 HPLC 系统以尽可能减小死体积。仅在不超过最大压力的 80% 的条件下运行时，可达到最佳色谱柱使用寿命。

Agilent AdvanceBio 甲酸铵流动相浓缩液（部件号 G3912-00000）可用于制备 1 L 50 mmol/L 甲酸铵，pH 4.4。

典型操作温度为 60 °C。可使用更高的温度，但是将缩短色谱柱寿命。

多聚糖标准品

安捷伦提供标记有 InstantPC 的各种游离 N-糖标准品和文库，能够用于校准用于游离多聚糖分析的 LC/FLD/MS 系统。有关标记 N-糖标准品的完整列表，请参见多聚糖标准品技术宣传单页 ([5994-2202ZHCN](#))。多聚糖标准品对于帮助鉴定多聚糖异构体和共洗脱峰至关重要。潜在的共洗脱物包括 G0F/Man5、Man5/G1、G1FS1/G2F。

轻松挑选和订购信息

要从安捷伦网上商城订购下表中列出的商品，请通过单击“我的列表 #”标题链接将商品添加至您的收藏产品列表中。然后输入您需要的产品数量，添加至购物车并继续结算。您的列表便会保留在收藏产品下，供您将来订购时使用。

如果这是您首次使用收藏产品，系统会要求您输入电子邮件地址进行账户验证。如果您已有安捷伦账户，可以直接登录。但是，如果您尚未注册安捷伦账户，则需要注册账户。该功能仅在启用了电子商务功能的地区有效。您也可以通过客户服务中心或经销商渠道订购所有物品。

我的列表 1 Gly-X InstantPC N-糖样品前处理、AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱、溶剂和样品容器。

描述	部件号
样品前处理	
使用 InstantPC 试剂盒的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，96 ct	GX96-IPC
使用 InstantPC 试剂盒的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，24 ct*	GX24-IPC*
Gly-X 多管真空装置垫片	GX100
HILIC 色谱柱	
AdvanceBio 酰胺 HILIC 300Å, 2.1 × 150 mm, 1.8 μ m	859750-913
试剂	
InfinityLab 超纯 LC/MS 乙腈 (1 L)	5191-4496
MS 溶液，甲酸，10 mL	US-700002341
AdvanceBio 甲酸铵流动相浓缩液，10 mL	G3912-00000
InfinityLab 超纯 LC/MS 级，水	5191-4498
样品瓶和瓶盖**	
螺口盖样品瓶，250 μ L，100/包	5190-2242
瓶盖，卡口，蓝色，PTFE/硅橡胶隔垫，100/包。	5182-0541
瓶盖尺寸：11 mm	

* 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)

** 将 InstantPC 标记的多聚糖洗脱到 96 孔板中。用户可以将样品从板上直接注入 LC，也转移至样品瓶中

我的列表 2 Gly-X InstantPC N-糖样品前处理试剂盒和模块的更多配置。

描述	部件号
使用 InstantPC 试剂盒的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，96 ct	GX96-IPC
使用 InstantPC 试剂盒的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，24 ct	GX24-IPC
AdvanceBio Gly-X 去糖基化模块，24 ct	GX24-100
AdvanceBio Gly-X InstantPC 标记模块，24 ct	GX24-101
AdvanceBio Gly-X 去糖基化模块，96 ct	GX96-100
AdvanceBio Gly-X InstantPC 标记模块，96 ct	GX96-101
AdvanceBio Gly-X InstantPC 净化模块，96 ct	GX96-102
AdvanceBio Gly-X 去糖基化和 InstantPC 标记模块组，24 ct	GX24-201PC
AdvanceBio Gly-X 去糖基化和 InstantPC 标记模块组，96 ct	GX96-201PC
Gly-X 多管真空装置垫片	GX100

多聚糖标准品

有关安捷伦标记的 N-糖标准品的完整列表，请参见多聚糖标准品技术宣传单页 ([5994-2202ZHCN](#))。

我的列表 3 出现在利妥昔单抗中的 InstantPC 标记的 N-糖标准品^[2]。这些标准品可用作 N-糖分离的对照品并区分共洗脱峰。

我的列表 3 (Rituxan 中检出的 N-糖)

描述	CFG 结构	部件号
G0F-N/FA1		GKPC-402
G0/A2		GKPC-301
G0F/FA2		GKPC-302
Man5/M5		GKPC-103
G1/A2G1		GKPC-317
G1F/FA2G1		GKPC-316
G2/A2G2		GKPC-304
G1FS1 α(2,3)/FA2G1S(3)1		GKPC-330
G2F/FA2G2		GKPC-305
G2S1 α(2,3)/A2G2S(3)1		GKPC-321
G2FS1 α(2,3)/FA2G2S(3)1		GKPC-325
G2S2 α(2,3)/A2G2S(3)2		GKPC-322
G2FS2 α(2,3)/FA2G2S(3)2		GKPC-323

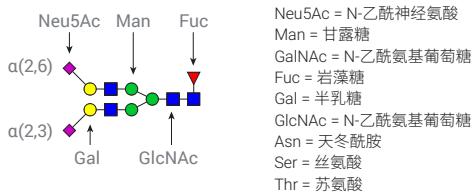


图 3. 多聚糖结构动画遵循功能性糖组学协会 (CFG) 的建议^[6]，并使用 GlycoWorkbench 2.14.10 绘制

我的列表 4 出现在依那西普中的 InstantPC 标记的 N-糖标准品^[2]。这些标准品可用作 N-糖分离的对照品并区分共洗脱峰。

我的列表 4 (恩利中检出的 N-糖)

描述	CFG 结构	部件号
G0F-N/FA1		GKPC-402
G0/A2		GKPC-301
G0F/FA2		GKPC-302
Man5/M5		GKPC-103
G1/A2G1		GKPC-317
G1F/FA2G1		GKPC-316
G2/A2G2		GKPC-304
G1FS1 α(2,3)/FA2G1S(3)1		GKPC-330
G2F/FA2G2		GKPC-305
G2S1 α(2,3)/A2G2S(3)1		GKPC-321
G2FS1 α(2,3)/FA2G2S(3)1		GKPC-325
G2S2 α(2,3)/A2G2S(3)2		GKPC-322
G2FS2 α(2,3)/FA2G2S(3)2		GKPC-323

我的列表 5 AdvanceBio InstantPC 标记的高甘露糖 N-糖标准品。

描述	CFG 结构	部件号
Man5/M5		GKPC-103
Man6/M6		GKPC-104
Man7/M7		GKPC-105
Man8/M8		GKPC-106
Man9/M9		GKPC-107

我的列表 6 用于研究唾液酸化糖蛋白的 InstantPC 标记的三天线型和四天线型 N-糖文库。多聚糖结构见分析证书。

描述	部件号
InstantPC α(2,3) 唾液酸化三天线型 N-糖文库	GKPC-233
InstantPC α(2,6) 唾液酸化三天线型 N-糖文库	GKPC-263
InstantPC α(2,3) 唾液酸化四天线型 N-糖文库	GKPC-234
InstantPC α(2,6) 唾液酸化四天线型 N-糖文库	GKPC-264

我的列表 7 N-糖文库和对照糖蛋白。多聚糖结构见分析证书。

描述	部件号
人 IgG N-糖文库由与正常人 IgG 上的 N-糖一致的复合二天线型寡糖组成，包括 InstantPC 标记的二分支 GlcNAc N-糖	GKPC-005
CHO mAb N-糖文库由中性岩藻糖基化复合二天线型和许多 CHO 衍生的单克隆抗体 (mAb) 中存在的高甘露糖 N-糖 Man5 组成，带有 InstantPC 标记	GKPC-020
CHO mAb N-糖文库与 CHO mAb 糖蛋白由复合二天线型和高甘露糖 N-糖组成，存在于来源于许多 CHO 的治疗性糖蛋白中。将该文库的来源糖蛋白作为对照纳入样品前处理中	GKPC-020-P
AdvanceBio InstantPC 麦芽糊精分子量标准品。可用作分子量标准品以生成葡萄糖单位 (GU) 值 ^[7]	GKPC-503
Agilent-NISTmAb, 25 μL	5191-5744
Agilent-NISTmAb, 4 × 25 μL	5191-5745

我的列表 8 用于亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 方法的 AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱。如需了解更多信息，请访问我们的[网站](#)。

描述	部件号
1.8 μm, 最大压力 1200 bar, 最高温度 80 °C	
AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm	859750-913
AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm	858750-913

参考文献

1. N-糖分析：更胜一筹的组合，安捷伦产品样本 [5994-1647ZHCN](#), 2020
2. 用于游离 N-糖 LC/FLD/MS 分析的改进亲水相互作用液相色谱，安捷伦应用简报 [5994-6916ZHCN](#), 2023
3. 使用 InstantPC 的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒：用于快速 FLD/MS 糖基化分析的精简工作流程，安捷伦宣传单页 [5994-0918ZHCN](#), 2019
4. 多聚糖标准品技术宣传单页，[5994-2202ZHCN](#), 2020
5. Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep with InstantPC Kit, 96-ct (formerly ProZyme) (使用 InstantPC 试剂盒的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理, 96 ct (原 ProZyme))，用户手册 [5994-1231EN](#)
6. Y Xie, et al. High-throughput and high-sensitivity N-Glycan profiling: A platform for biopharmaceutical development and disease biomarker discovery. Analytical Biochemistry, Volume 623, 15 June 2021, 114205
7. Varki A, et al. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. Glycobiology. 2015 Dec; 25(12): 1323–1324

Agilent CrossLab：助力客户成功

CrossLab 代表了安捷伦集服务和消耗品于一体的独特解决方案，以支持客户获得工作流程的成功、提高生产力和运营效率。我们在每一次互动中为您提供深刻见解，助您实现业务目标。我们提供从方法优化和培训到实验室整体移机和操作分析的一系列产品和服务，帮助您管理仪器和实验室，确保实现理想性能。

如需了解有关 CrossLab 的更多信息，请访问 www.agilent.com/crosslab

了解更多信息：

www.agilent.com/chem/glycoscience

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278

400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

DE44396.4422106482

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2024
2024年1月3日，中国出版
5994-3926ZHCN