

糖蛋白中N-联寡糖分析方案

Beth Gillece-Castro, Kim van Tran, Jonathan E. Turner, Thomas E. Wheat, Diane M. Diehl

简介

糖基化是真核细胞蛋白质的翻译后修饰。糖蛋白的糖基可影响生物活性，有介导受体识别的作用，可增加可溶性，调节并稳定蛋白构象。因此特殊的糖基结构与许多蛋白药物的安全有效性相关。正确的糖基化对糖蛋白达到并维持结构与生物活性极为重要。因此，糖基测定是生物药物开发项目的重要部分。在工艺开发与制造纯化过程中需监测单个糖基结构与相对含量。剂型开发与稳定性测试中也需要进行同样的检测。

沃特世提供糖基分析解决方案达到了上述要求，新型ACQUITY UPLC® BEH糖基分离技术色谱柱可分离生物药物中释放的2-氨基苯（2-AB）衍生的糖基。该专用色谱柱结合沃特世ACQUITY UPLC荧光检测器（FLR）系统以确保分离度、灵敏度与速度。

实验部分

样品与衍生

N端糖基混合物可以和2-AB标记衍生物一起购买所得（ProZyme公司，San Leandro, 加利福尼亚）或从PNGaseF糖蛋白中释放糖基所得。释放糖基依照Bigge等人的方法进行标记¹。分析前样品使用50%缓冲液A/50%乙腈稀释至1 pmol/μL。糖基在高浓度乙腈中难溶解，可能导致样品随时间延长而损失。

色谱条件

LC系统：	沃特世ACQUITY UPLC系统
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH 糖基专用色谱柱 2.1 x 150 mm, 1.7μm
色谱柱零件号：	186004742
柱温：	60°C
样品温度：	15°C
流速：	除水溶液洗涤清洗外为500μL/min
流动相A:	100 mM 甲酸铵, pH 4.5
流动相B:	乙腈
弱洗针液:	90/10 乙腈/水 (v/v)
强洗针液:	10/90 乙腈/水 (v/v)
密封洗涤:	50/50 甲醇/水 (v/v)
进样量:	1.5μL, 部分定量环进样; 2μL, 满环进样
检测:	荧光 (FLR) λ ex 330 nm λ em 420 nm

选择肽图分析使用的进样针和混合器（P/N 205000507，肽分析进样针包；P/N 205000403，ACQUITY UPLC高灵敏度过滤混合器）。肽图分析进样针或混合器的安装不会影响糖基分析。1和2色谱图数据采自于安装了肽进样针和混合器的ACQUITY UPLC系统。3与4色谱图数据采自于未安装的ACQUITY UPLC系统。

梯度表

人IgG糖基与葡聚糖梯度

(图1和图2)

时间分钟	流速mL/min	%A	%B
初始	0.5	22.0	78.0
38.5	0.5	44.1	55.9
39.5	0.25*	100	0
44.5	0.25*	100	0
46.5	0.5	22.0	78.0
50	0.5	22.0	78.0

高甘露糖与唾液酸化糖基
(图3和图4)

时间分钟	流速mL/min	%A	%B
初始	0.5	25	75
38.5	0.5	40	60
39.5	0.25*	100	0
44.5	0.25*	100	0
46.5	0.5	25	75
50	0.5	25	75

*注意：水相清洗时流速降低。

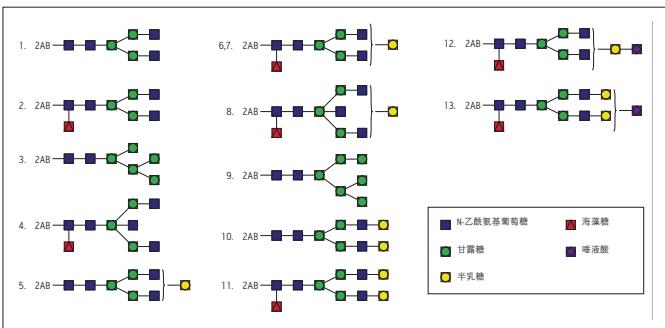


图1. 确认的2-AB标记的人IgG糖基主要结构。通常在上的6位核心甘露糖与在下的3位甘露糖相关。

结果与讨论

UPLC糖基分离技术色谱柱的设计开发旨在分析生物蛋白药物中常见或可预见的糖基。寡糖链包括图1中显示的高甘露糖，复合物，杂合与唾液酸化糖基。为建立常规方法检测样品中可能发现的所有类型的糖基，糖基均进行了2-氨基苯标记。荧光衍生物在键合酰胺键的色谱柱上分离最好。因为标记后的寡糖亲水性强，优先选择的分离模式为亲水作用色谱分离 (HILIC)。

由于各种糖基中包括很多相近结构，需要高选择性的色谱柱，才能达到最高的分离度。为此开发的色谱柱可用于超高效液相色谱仪器，所用颗粒为亚2-微米。BEH技术杂化填料为1.7μm颗粒，并达到了最佳的理化稳定性。色谱柱通过ACQUITY UPLC系统与FLR检测发挥其性能，实现最小扩散的优势。

在流速0.5 mL/min下运行系统，小颗粒的副作用是较高的反压力，对此ACQUITY UPLC系统可很好地适用。

在开发过程中色谱柱通过使用2-AB标记的人IgG糖基样品进行了评估，典型色谱柱见图2。样品包括高甘露糖、复合物、杂合与唾液酸化糖基作为键合相化学适合性的指标。最终选择的色谱柱（见图2）是非常出色的，正如图中所示峰2 (GOF) 与峰3 (Man5) 有高的分离度。存在的很多的异构体在糖基一个或多个糖基上存在。如峰6与7显示的异构体得到了分离。混合物的定量分析中，每个峰面积都进行了对照。这些分离良好的色谱峰可以得到很好的重复且性并且其定量结果也非常可靠。

色谱柱也进行了其他重要糖基分离的评估。图3中显示的葡萄糖低聚物

的同源多聚系列从1延伸至22糖（葡萄糖单位，GU），最小糖基得到保留并且最大糖基也有良好的分离度。计算葡萄糖单位相对保留时间提供

了评估单个单糖加减的标准化方法，还提供了色谱柱寿命的有益参考，补足批次间的重现性。GU值在描述未知糖基结构时也很有帮助²。

该色谱柱的分离度通过了多种样品测试，包括中性与酸性寡糖、分支变异体与连接异构体等。小牛核糖核酸酶b中与高甘露糖糖基混合物含有很多上述异构体。尤其是Man7糖基含有三种异构体，在2或3条侧链上有替代。图4中25分钟前的多个峰一起洗脱显示了Man7糖基异构体的分离。

上述分离技术也适用于带电的酸性糖基。小牛胎球蛋白可产生单、二、三与四唾液酸化的糖基，分析遇到很大的挑战。大些的糖基结构的异构体数量很多。唾液酸残基加入糖基末端后可与不同侧链相连，在半乳糖残基上的结合位点可能为2, 3, 4, 或6位。上述结构的分离见图5.一对含有唾液酸残基的三侧链糖基异构体在41.4与43.1分钟时洗脱。

结论

沃特世UPLC®糖基分离技术色谱柱在配有FLR检测器的ACQUITY UPLC系统下运行得到了高分离度、高重现性，快速的糖基分析方法。

- UPLC解决方案、灵敏度和速度超越了所有过去的HPLC解决方案
- 糖蛋白的N端糖基经2-AB标记
- 标记糖基在HILIC模式下分离
- 同一色谱柱与流动相可用于中性与带电寡糖
- 位点与连接异构体可得到分离
- 高分离度可确切确证糖基，定量数据可靠
- 分离度的提高可改进样品通量与生产效率
- 仪器的精密度与色谱柱的批次测试保证了方法可在实验室间做方法转移
- 将UPLC解决方案扩展到了生物药物的分析领域

参考文献

- [1] Bigge, J.C., Patel, T.P., Bruce, J.A., Goulding, P.N., Charles, S.M. and Parekh, R.B (1995) Non-selective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-aminobenzamide and anthranilic acid. *Anal. Biochem.*, 230, 229-238.
- [2] Royle, L., Roos, A., Harvey, D.J., Wormald, M.R., van Gijlswijk-Janssen, D., Redwan, E.-R., Wilson, I.A., Daha, M., Dwek, R.A., Rudd, P.M. (2003) Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *J. Biol. Chem.* 278, 20140-20153.

