[技术简报]

便于N-糖分析的单次用和高通量HILIC SPE及IgG对照标准品

Matthew A. Lauber, Stephan M. Koza, 和 Kenneth J. Fountain

目的

展示GlycoWorks™工作流程的各方面优势，包括在方法验证和故障排除中适用于不同SPE型式的灵活性以及所采用的人IgG对照标准品的可行性。

背景

蛋白质的糖基化反应是十分有意义的翻译后修饰，可以调节蛋白质的结构和功能。生物治疗药物的糖基化作用无疑是必须进行彻底表征与监测的结构特征，尤其是在多聚糖图谱的变化与疗效和/或免疫原性的变化相关时。

一套用于评价糖蛋白中N-糖的常规应用方法包括：通过PNGase F释放出多聚糖，采用具有荧光活性的2-氨基苯甲酰胺(2-AB)进行标记，然后采用亲水作用色谱法(HILIC)进行分离，最后由荧光检测器(FLR)进行检测(图1)。此工作流程中，比较复杂的是样品制备步骤。为使此过程更加直观，沃特世(Waters®)推出了GlycoWorks，将N-糖制备与分析所需的诸多耗材组合在一起。最值得注意的是，GlycoWorks实现了HILIC SPE的前/后标记纯化步骤，这对于确保方法的稳定性而言非常重要。

GlycoWorks可帮助制备出N-糖用于后续分析，并为方法确认和故障排除提供不同的SPE型式(低/高通量)以及IgG对照标准品。

以下内容展示了GlycoWorks工作流程的两个突出方面：适用于不同的SPE型式(单次用小柱和高通量板)，以及可用于方法确认和故障排除的人IgG对照标准品。

图1. 采用GlycoWorks试剂盒从糖蛋白中制备出2-AB标记的多聚糖的示意图。GlycoWorks解决方案中包含的消耗品以蓝色突出显示。请注意：GlycoWorks试剂盒中不包含PNGase F和2-AB。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

解决方案

从GlycoWorks对照标准品(部件号186007033)即人IgG中，通过两种不同SPE型式以及各自使用维护手册中提供的方案，制备出2-AB标记的N-糖。图2A显示了对照标准品中多聚糖的HILIC-FLR色谱图，实验采用GlycoWorks HILIC µElution 96孔板(部件号186002780)、ACQUITY UPLC GST Amide (BEH Glycan)色谱柱以及用于仪器控制和数据解析的UNIFI®。借助葡萄糖单位(GU)值，与多聚糖性能测试标准品(部件号186006349)(与对照标准品一样基于人IgG)进行对比，对此谱图中丰度最高的九种多聚糖进行了分配。

使用GlycoWorks HILIC 1ml 小柱(单次用)(部件号186007080)所得色谱图如图2B所示。两色谱图显示：无论选择何种SPE型式，都可获得极为相似的结果。为验证此结果，对所分配的峰进行积分，用峰面积确定上述九种多聚糖的相对丰度(图2C)。此分析说明了使用两种不同型式SPE所得多聚糖的相对浓度并无显著区别。

此研究中，我们还使用GlycoWorks对照标准品评估了样品量对多聚糖图谱的影响。图3以对比形式给出了采用HILIC µElution板制得的多聚糖(25 µg至2.5 µg IgG)的HILIC-FLR色谱图。2.5 µg样品的总回收率低于平均值，很可能是由少量的非特异性表面损失造成。尽管所处理样品量相差十倍，但鉴定出的相对丰度高度相似，相差值≤11%。其中，峰9(G2FS1)的偏差最大，处理25 µg 和2.5 µg IgG时，偏差值分别为8.5%和7.6%。

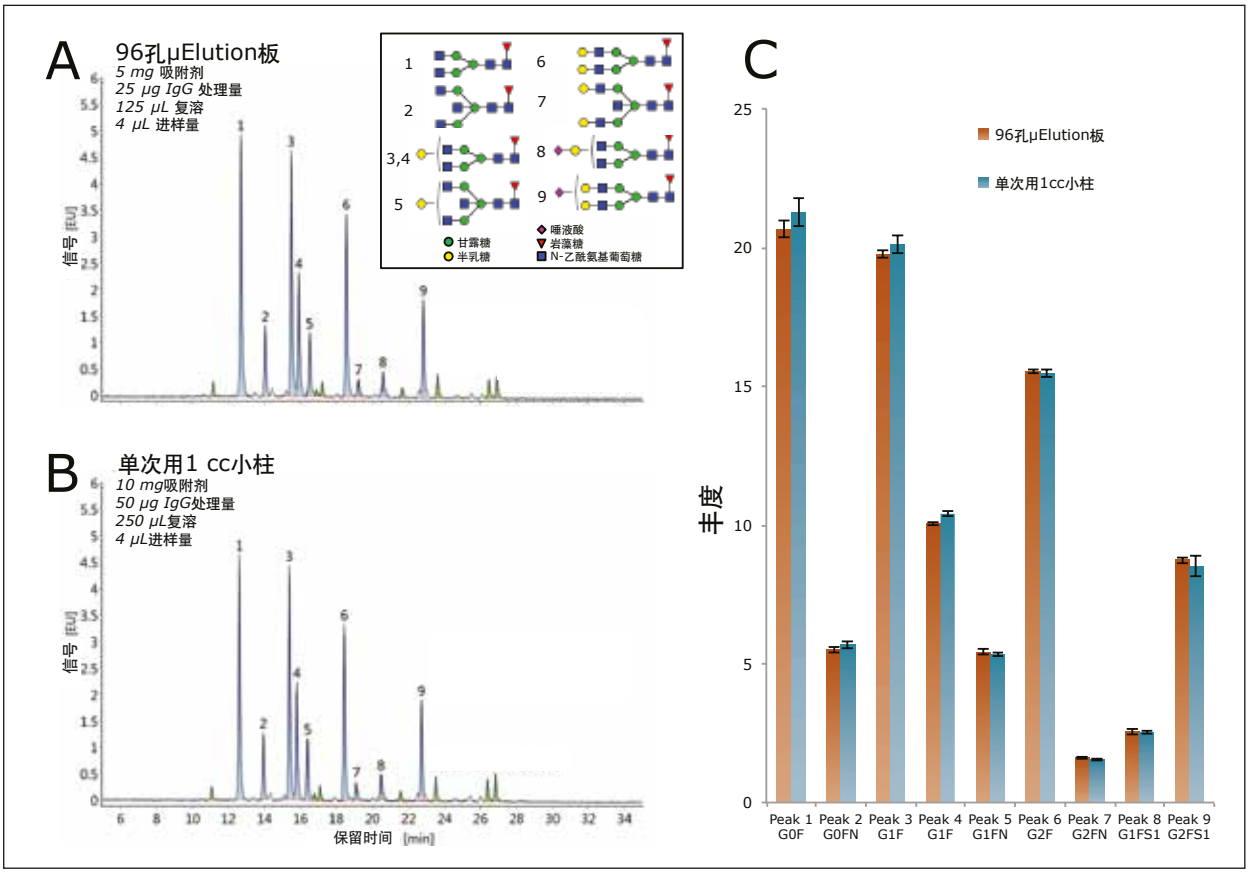

图2. GlycoWorks对照标准品释放出的2-AB标记的多聚糖HILIC-FLR分析结果，使用ACQUITY UPLC GST Amide (BEH Glycan)，1.7 µm，2.1 × 150 mm色谱柱。左侧所示为使用GlycoWorks HILIC µElution 96孔板(A)和单次用HILIC 1cc小柱(B)获得的色谱图。通过UNIFI处理检测到的峰涂有蓝色(预期组分)或绿色(发现组分)阴影。(C)右侧所示为用于计算相对丰度的积分峰面积。(n=3)

总结

GlycoWorks工作流程适用于两种不同的SPE型式：一种适合于高通量需求(96孔µElution提取板)，另一种适用于低通量应用(1 cc小柱)。最重要的是，结果显示：无论选择何种GlycoWorks SPE型式，都可获得极为相似的多聚糖图谱。实验结果基于GlycoWorks工作流程分析Glycoworks对照标准品中的N-多聚糖。GlycoWorks试剂盒中包含此标准品，可用于确认分析结果的正确性，或对故障排除流程有潜在的帮助。

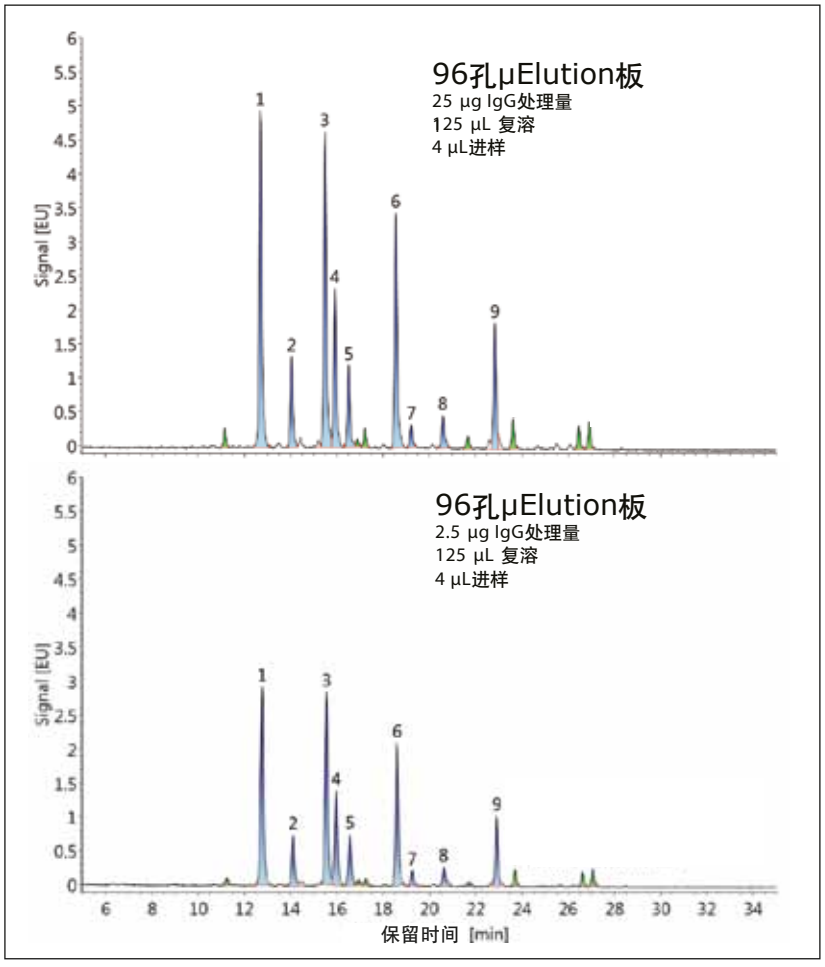

图3. GlycoWorks工作流程的适应性以及用于处理不同量糖蛋白的HILIC SPE型式。HILIC-FLR色谱图显示了由25和2.5µg GlycoWorks对照标准品所制备的2-AB标记的多聚糖。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, UNIFI和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。GlycoWorks是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

© 2013 沃特世公司 中国印刷

2013 年 5 月 720004716ZH TC-PDF

沃特世科技（上海）有限公司
北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com