使用UPLC-荧光/质谱法分析2-AB标记的多聚糖混合物

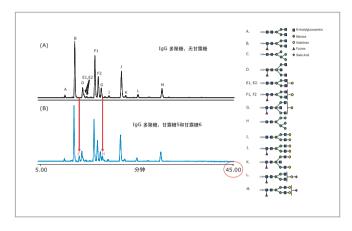
王 芸 沃特世科技(上海)有限公司

蛋白质糖基化是生命系统非常重要的翻译后修饰之一,在免疫识别,蛋白分泌,信号转导等生命过程中发挥了重要作用。与蛋白相连的多聚糖是这些功能的重要载体,特别是对于单克隆抗体药物,多聚糖部分对药物的生物活性有着重要的影响。因此,发展分离效率高,检测灵敏度好的糖基化分析方法对单克隆抗体药物分析具有十分重要的意义。

针对糖基化分析中的种种困难,沃特世公司开发了亲水作用色谱法,以及荧光-质谱结合检测的分析方法。ACQUITY UPLC®系统配合荧光检测器(FLR)以及多聚糖分析专用(GST)色谱柱,比HPLC方法有更高的分离度。多聚糖分析专用色谱柱装填了1.7µm的酰胺吸附剂,可在HILIC模式下有效分离荧光标记的多聚糖。UPLC®配合荧光检测器分析多聚糖可以获得很高的分离度和定量准确性,特别是对于位置异构体以及有共流出的小峰分析;而质谱检测为糖链鉴定提供了更多的结构信息。通过与标准糖链保留时间的比较,该流程能实现高通量的多聚糖定性定量,满足药物分析的多种需求。

一、色谱条件与标记后的 多聚糖样品的分离

可通过HILIC方法,有效分离2-AB标记的多聚糖混合物。对于方法优化,使用更缓的窄梯度,可有效提高保留时间上相临近的多聚糖峰之间的分离度;对于其它的参数,如流速、缓冲液浓度、流动相pH及柱温等,一般也需要进行优化。图1示例使用优化后的HILIC色谱条件后,复杂的2-AB标记的lgG多聚糖混合物得到了很好的分离,包括E1/E2与F1/F2。实验所用梯度洗脱时间为45分钟,包括色谱柱清洗和再平衡步骤。一般来说,一个样品的总分析时间在1小时内。因此,与使用3.0-μm填料的HPLC方法相比,使用1.7-μm填料的UPLC色谱方法,不但分离效果更好,而且运行时间更短。实验中使用2.1 x 150 mm色谱柱。图1(B)中甘露糖5(峰C)与甘露糖6(峰H)可与邻近多聚糖峰成功分离,解决了共流出的问题。



二、2-AB标记的多聚糖定量及结构鉴定

由于多聚糖在HILIC 模式下能实现基线分离,各种异构体,例如末端唾液酸的位置异构,都能得到很好的分离。因此,在荧光检测器下的峰面积积分能对各种糖链进行定量分析。而从MS谱图来看,多聚糖样品中高甘露糖糖型所占比例较高,而复合型及杂合型糖链也都能够得到鉴定。各种带有神经氨酸的糖链也都能得到鉴定,表明该方法能够适合各种多聚糖复合物的分析。除了分子量,我们还能通过MS/MS谱图进一步确认多聚糖的结构。

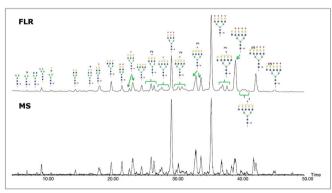


图2. Factor IX的荧光图(上)和质谱图(下)。

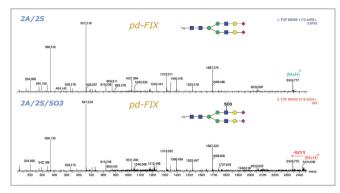


图3. 使用MSMS方法进行糖结构推导。

2-AB标记的IgG多聚糖混合物的分析结果充分说明沃特世提供了成熟的聚糖分析方案,且相应色谱柱的质量控制采用了2-AB标记的IgG多聚糖混合物进行。ACQUITY UPLC系统显著缩短了分析时间,将常规HPLC上需要2个小时甚至3个小时的分离梯度缩短到1小时。 此外沃特世提供UPLC-FLR-MS的整体解决方案可以十分有效的对多聚糖进行分析,除提供分子量信息外,还可以进行糖结构推导,大大降低了生物药物研发工作中糖基化分析的难度。

实验流程:

一、2-AB 标记糖链

使用GlycoPro le试剂盒, Prozyme公司

使用试剂盒进行2-AB 标记糖链时,除以下步骤,按 照该公司的说明操作即可。

- 1.使用50µl的标记反应液
- 2.65度反应4-5小时
- 3.将样品按步骤4处理除掉过量的标记试剂

使用Sigma公司试剂

- 1.配制30%的醋酸DMSO溶液(30μl冰醋酸,700ulDMSO)
- 2.按照20:1 (v/w)的比例配制2-AB溶液 (如需要20mg 2-AB,则用400μl 30%的醋酸DMSO溶液配制)
- 3.以16.7: 1 (v/w) 的比例将2-AB溶液与氰基硼氢化钠混合配制标记反应液
- 4.将所得糖链用50μl标记反应液溶解, 65度震荡反映4-5小时
 - 5.将反应液按步骤4处理除去过量的标记试剂

二、使用MassPrep亲水作用样品 处理板除去过量的标记试剂

所需溶液: MiniQ 纯水, 90% 乙腈 ACN, 10 mM 醋酸铵 Tris, 20% ACN

- 1.样品处理板活化,向样品处理板加入 200µl MiniQ 纯水,再加入 200µl 90% ACN, 重复 90% ACN
- 2.吸取 50μl 标记溶液,加入 450μl ACN (如有沉淀,请勿离心,以免降低糖链回收率),由于板上每孔体积为200μl,可以将样品分为四份加入
- 3.将样品加入处理板,设定真空度为低(压力 250-500 mmHg),以保证样品与HILIC基质有充分时间相互作用;如果溶液在板上没有移动,可适当增加真空度
 - 4.用 90% ACN清洗处理板两次
- 5.换用样品收集板, 用200μl 10 mM 醋酸铵Tris, 20% ACN洗脱, 洗脱液转移至1ml 离心管
 - 6.冷冻干燥标记后糖链溶液

冻干后的样品复溶于20μl50% ACN中, 超声5 min 后转入UPLC采样瓶, 进样5μl。

参考文献

- (1) Martin Gilar, Ying-Qing Yu, Joomi Ahn, and Hongwei Xie. Analysis of Glycopeptide Glycoforms in Monoclonal Antibody Tryptic Digest using a UPLC HILIC Column
- (2) Hongwei Xie, Weibin Chen, Martin Gilar, St John Skilton and Jeffery R. Mazzeo. Separation and Characterization of N-linked Glycopeptides on Hemagglutinins In A Recombinant In uenza Vaccine
- (3) Joomi Ahn, Ying Qing Yu and Martin Gila.r UPLC亲水相互作用色谱(HILIC)-荧光检测法分析2-AB标记的多聚糖