Agilent

Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep with 2-AB Express Kit, 96-ct（旧 ProZyme）

ユーザーマニュアル

注意：

© Agilent Technologies, Inc. 2025

本マニュアルの内容は米国著作権法および国際著作権法によって保護されており、Agilent Technologies, Inc. の書面による事前の許可なく、本書の一部または全部を複製することはいかなる形態や方法（電子媒体への保存やデータの抽出または他国語への翻訳など）によっても禁止されています。

マニュアル番号

5994-1228JAJP
GX96-2AB
Rev. AF

版

Second edition, March 2025

Printed in Japan

Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd
Wilmington, DE 19808

保証

このマニュアルの内容は「現状有姿」提供されるものであり、将来の改訂版で予告なく変更されることがあります。Agilent は、法律上許容される最大限の範囲で、このマニュアルおよびこのマニュアルに含まれるいかなる情報に関しても、明示黙示を問わず、商品性の保証や特定目的適合性の保証を含むいかなる保証も行いません。Agilent は、このマニュアルまたはこのマニュアルに記載されている情報の提供、使用または実行に関連して生じた過誤、付随的損害あるいは間接的損害に対する責任を一切負いません。Agilentとお客様の間に書面による別の契約があり、このマニュアルの内容に対する保証条項がここに記載されている条件と矛盾する場合は、別に合意された契約の保証条項が適用されます。

技術ライセンス

本書で扱っているハードウェアおよびソフトウェアは、ライセンスに基づき提供されており、それらのライセンス条項に従う場合のみ使用または複製することができます。

権利の制限

米国政府の制限付き権利について：連邦政府に付与されるソフトウェアおよび技術データに係る権利は、エンドユーザーのお客様に通例提供されている権利に限定されています。Agilent は、ソフトウェアおよび技術データに係る通例の本商用ライセンスを、FAR 12.211（Technical Data）および 12.212（ComputerSoftware）、並びに、国防総省に対しては、DFARS 252.227-7015（Technical Data -Commercial Items）および DFARS 227.7202-3（Rights in Commercial Computer Software or Computer Software Documentation）の規定に従い提供します。

安全にご使用いただくために

注意

注意は、取り扱い上、危険があることを示します。正しく実行しなかったり、指示を遵守しないと、製品の破損や重要なデータの損失に至るおそれのある操作手順や行為に対する注意を促すマークです。指示された条件を十分に理解し、条件が満たされるまで、注意を無視して先に進んではなりません。

警告

警告は、取り扱い上、危険があることを示します。正しく実行しなかったり、指示を遵守しないと、人身への傷害または死亡に至るおそれのある操作手順や行為に対する注意を促すマークです。指示された条件を十分に理解し、条件が満たされるまで、警告を無視して先に進んではなりません。

目次

はじめに 5

検査キットの構成 6

ユーザーが用意する機器と試薬 7

サンプル前処理に関する考慮事項 8

プロトコル 9

始めましょう 9

Gly-X 脱グリコシル化 10

マトリックスへのグリカンのローディング 11

オンマトリックス 2-AB Express ラベリング 13

2-AB クリーンアップ 14

ラベル化グリカンの分析 18

2-AB- ラベル化グリカンに推奨の HILIC メソッド 18

2-AB- ラベル化グリカンに対する推奨の MS 条件 20

付表 A 21

自動化プロトコルに対する推奨事項 21

FAQ 22

リソースおよび参考文献 25

技術支援 26

製品情報 27

はじめに

2-AB Express キットによる Agilent Gly-X N-グリカン高速遊離およびラベリングでは、溶液内での酵素によるタンパク質の脱グリコシル化を利用します。また、遊離した N-グリカンは、2-AB 色素で高速ラベリングを行います。2-AB ラベリング反応はクリーンアッププレートで実行されるため、ラベリング前にサンプルを乾燥させる必要がありません。あとは簡単な遊離色素の除去作業で、グリカンサンプルの LC-蛍光、質量分析などのメソッドによる分析の前処理が完了です。プロトコルはシンプルで、高速（およそ2.5 時間）、自動化に適しています。2-AB色素は、確立された糖鎖分析ワークフローで優れた蛍光性能を発揮します。利点：

- 最高のピーク分離度を実現する小さな分子サイズ
- 1～96 サンプルを処理可能な、柔軟な高スループットフォーマット
- 最適化されたクリーンアップにより、過剰な遊離色素、タンパク質、その他の干渉化合物を除去

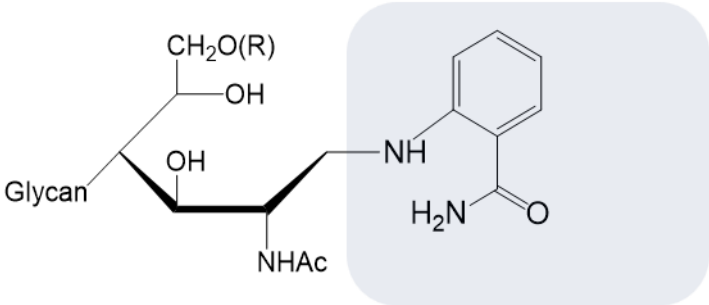

図 1.　2-AB 色素ラベル化 N-グリカン

検査キットの構成

Gly-X および 2-AB Express キット（GX96-2AB）は 3 つのモジュールで構成されています。（**表 1** を参照）各モジュールが、最大 96 サンプルに対して十分な試薬を提供します。

表 1　　キットの構成

モジュール	コンポーネント	単位	保管
Gly-X 脱グリコシル化モジュール GX96-100	Gly-X 脱グリコシル化プレート、96 ウェル	1	RT
	Gly-X N-グリカナーゼ、1 mg/mL、120 µL	1	4 °C
	Gly-X 消化緩衝液、240 µL	2	4 °C
	Gly-X 変性剤、240 µL	1	4 °C
Gly-X 2-AB Express ラベリングモジュール GX96-401	Gly-X 2-AB 色素溶液、50 µL	4	-20 °C
	Gly-X 2-AB 還元剤、50 µL	4	-20 °C
	Gly-X 2-AB 触媒、100 µL	4	-20 °C
	Gly-X 2-AB 最終試薬、230 µL	1	-20 °C
Gly-X 2-AB Express クリーンアップモジュール GX96-402	Gly-X クリーンアッププレート A	1	RT
	Gly-X ロードプレート、ディープウェルプレート、96 ウェル	1	RT
	Gly-X 使用ウェルシーリングキャップマット、黒（クリーンアッププレート用）	1	RT
	Gly-X コレクションプレート、96 ウェルプレート、透明	1	RT
	シールフィルム（スリット入り）	1	RT
	保管シーリングホイル	1	RT
	真空マニホールド用廃液トレイ	1	RT
	ヒートブロック用カバーフィルム	1	RT

注

Gly-X 2-AB Express スターターキット（GX400）が必要です。（図 2 を参照）真空マニホールドスペーサ（GX100）およびヒートブロックの蓋（2 つのサイズ）が含まれています。詳細はアジレントにお問い合わせください。

注

Gly-X および 2-AB Express 24-ct キット（GX24-2AB）には、それぞれバイアル 1 本の 30 µL Gly-X N-グリカナーゼ、Gly-X 消化緩衝液、2-AB 色素溶液、2-AB 還元剤、2-AB 触媒に加え、表 1 に記載のその他すべてのコンポーネントが含まれています。

ヒーターカバー　　**真空マニホールドスペーサ**

図 2.　　GX400、Gly-X 2-AB Express スターターキットが必要です。

ユーザーが用意する機器と試薬

乾燥ブロックヒーター 2 個と 96 ウェル PCR ヒートブロック。ヒーターの 1 つを 96 ウェルサーマルサイクラーに置き換えることも可能です。変性と脱グリコシル化はサーマルサイクラーを使用して実行することができ、ラベリングステップにヒートブロックが必要です。

推奨：

- Thermo Scientific 88871001 コンパクト乾燥ブロックヒーター 2 個と 96 ウェル PCR ヒートブロック
- Agilent Gly-X 真空マニホールドスペーサおよびヒートブロック蓋（旧 ProZyme）（GX400 Gly-X 2-AB Express スターターキットに付属。または GX100 スペーサと代替ヒーター蓋を使用）
- 真空マニホールド（Millipore MSVMHTS00）
- 真空ポンプ（Millipore WP6211560、110 V、WP6122050、220V、Welch WOB-L ポンプ 2522）

注

推奨の Millipore モデル以外の真空マニホールドをお持ちの場合は、ガイダンスについてアジレントまでご連絡ください（https://explore.agilent.com/ContactUs-jp）。Waters 真空マニホールドは、GX100 の代わりに GX200 スペーサを使用できます。22 ページの "FAQ" を参照してください。

- 脱イオン水、サンプルあたり約 100 µL
- アセトニトリル（ACN）、MS グレード、サンプルあたり約 4 mL
- オプション - AdvanceBio スピンカラム（部品番号 **1980-1103**）または 96 サンプルプレート（部品番号 **1980-1104**）によるサンプルバッファ交換。AdvanceBio スピンカラム用のコレクションチューブが含まれています。AdvanceBio スピン 96 サンプルプレートの推奨アクセサリプレートは、部品番号5043-9308（洗浄ステップ用）、部品番号**5043-9312**（収集用）、部品番号**5042-1389**（保存用シーリングマット）です。AdvanceBio Spin の詳細な説明は、取扱説明書 **5994-7244JAJP** を参照してください。

サンプル前処理に関する考慮事項

一般的に、糖タンパク質サンプルは、低塩濃度の中性緩衝液中に洗浄剤がない状態で、最大で 2 mg/mL を調製する必要があります。サンプルが高濃度の場合は、水、または 50 mM HEPES（pH 7.9）中で希釈する必要があります。

その他のサンプルに関する考慮事項は次のとおりです。

- PBS など、塩含有バッファ（約 150 mM 塩）中のサンプルは、キットで使用できます。推奨の希釈液は、水または 50 mM HEPES（pH 7.9）に相当するバッファです。
- タンパク質サンプルと、注入に必要な回数/容量によっては、2 mg/mL 未満のサンプルを使用できます。
- 各反応に推奨のタンパク質の最大量は 40 µg（20 µL の 2 mg/mL 溶液）ですが、糖タンパク質によっては 40 µg を超えて使用できる場合もあります（22 ページの**“FAQ”** を参照）。
- タンパク質サンプルは pH 5.5 以上でなければなりません。プロトコルを開始する前に pH を調整するか、**10 ページ** の**ステップ 1** で 20 µL サンプルあたり 3 µL の Gly-X 消化緩衝液を添加します。

90 °C でのインキュベーション時に沈殿物が観察された場合は（**11 ページ** の**ステップ 4**）、塩、低 pH、または干渉している可能性がある洗剤についてサンプル前処理とサンプルバッファを確認します。サンプルバッファと Gly-X プロトコルとの互換性に関する質問については、アジレントにご連絡ください（**https://explore.agilent.com/ContactUs-jp**）。

詳細な説明は取扱説明書 **5994-7244JAJP** を参照してください。AdvanceBio スピンカラムまたは 96 サンプルプレートによるオプションのサンプルバッファ交換に関する裏付けとなるデータは、アプリケーションノート **5994-7239EN** にあります。

プロトコル

始めましょう

1 サンプル前処理を行います（8 ページの**“サンプル前処理に関する考慮事項”**を参照）。

2 サーマルサイクラーを 90 °C にプログラムし、1 つのヒートブロックを 65 °C を設定するか、2 つの個別のヒートブロックを 90 °C および 50 °C に設定します。

注

90 °C に設定されたヒートブロックは、ラベリングステップのために 65 °C に再設定する必要があります（13 ページのステップ 4 を参照）。65 °C でのラベリングのステップは、ラボの換気フード内で実行することが推奨されます。

3 **表 2** に示された希釈標準溶液を調製します。

表 2　希釈標準溶液の説明。

希釈標準溶液	手順	注意事項
N-グリカナーゼ希釈標準溶液	N-グリカナーゼおよび Gly-X 消化緩衝液を 1 対 1（v/v）で混合します。サンプルあたり 2.4 µL の希釈標準溶液を調製し、8 ウェルに対して 9.6 µL の N-グリカナーゼ と 9.6 µL の 消化緩衝液を混合します。	20 % の予備の希釈標準溶液を混合します。サンプルあたり 2 µL が必要です。
2-AB 希釈標準溶液	予備を含めて、2-AB 溶液、2-AB 還元剤、2-AB 触媒、ACN を 1:1:2:44 の比率で混合します。例えば、8 ウェルの場合は、16 µL の 2-AB 溶液、16 µL の 2-AB 還元剤、32 µL の 2-AB 触媒、704 µL の ACN を混合します。ピペットまたはボルテックスで混合します。さまざまなサンプル数に対して必要な容量は、**表 3** を参照してください。	サンプルあたり 80 µL 必要です。20 % の予備を調製します。2-AB 希釈標準溶液は、-20 °C、1 か月間、10 回の凍結融解サイクルで安定しています。 注：有機溶媒対応のチューブまたはプレートを使用します（ポリスチレンは非対応）。

表 3　2-AB 希釈標準溶液の容量。20 % の予備を含む。

サンプル数	2-AB 溶液（µL）	2-AB 還元剤（µL）	触媒（µL）	ACN（µL）	合計（µL）	容量/サンプル（µL）
n	2/サンプル	2/サンプル	4/サンプル	88/サンプル	96	80
4	8	8	16	352	384	80
8	16	16	32	704	768	80
24	48	48	96	2112	2304	80

4 **図 3** に示された以下の品目でクリーンアップステーションを準備します。
   - **a** Gly-X クリーンアッププレート A
   - **b** 真空ポンプに接続された真空マニホールド
   - **c** Gly-X 廃液トレイ
   - **d** Gly-X コレクションプレート（PCR プレート）
   - **e** Cly-X ロードプレート（ディープウェルプレート）
   - **f** Gly-X マニホールドスペーサ（GX100）

図 3. クリーンアップステーションの品目

Gly-X 脱グリコシル化

脱グリコシル化

1 2 µL の Gly-X 変性剤（オレンジ色のキャップのバイアル）を Gly-X 脱グリコシル化プレートの下部に加えます。（**図 4** を参照）

注 **5.5 pH 以下のサンプルの場合は、3 µL の Gly-X 消化緩衝液（白のキャップのバイアル）を加え、ピペットで十分に混合します。**

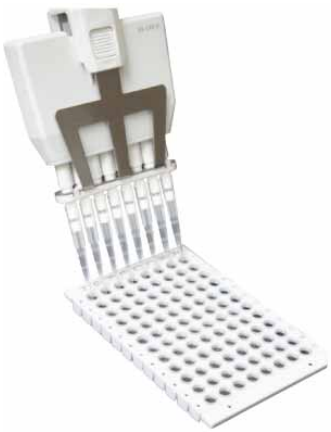

図 4. Gly-X 脱グリコシル化プレート

2 各 20 µL の糖タンパク質サンプル（約 2 mg/mL）を Gly-X 脱グリコシル化プレートの下部に加えます。それぞれを加えた後、ピペットで十分に混合します。

3 ベンチトップ上でプレートを軽くたたいて、ウェルの底にサンプルを集めます（またはスピンダウンします）。

4 90 °C で 3 分間インキュベートします。

注 **この時点で沈殿物が形成されている場合は、サンプルバッファ組成を確認します。**

5 プレートを取り外し、N-グリカナーゼを加える前に室温で 2 分間置きます。ラベリングステップの準備のために、ヒーターを 65 °C に設定します。

6 各サンプルに 2 µL の N-グリカナーゼ希釈標準溶液を加えます。ピペットを使用して十分に混合します。

7 ベンチトップ上でプレートを軽くたたいて、ウェルの底にサンプルを集めます（またはスピンダウンします）。

8 キャップなしで 50 °C で 5 分間インキュベートします。

仕上げ

1 2 µL の最終試薬を加え（ラベリングモジュールにあります）、十分に混合します。

2 キャップなしで 50 °C で 10 分間インキュベートします。

注 **沈殿物が形成されるのは正常です。最終試薬は、還元的アミノ化に適した -OH 形に N- グリカンを変換します。**

3 ヒートブロックからプレートを取り外し、グリカンのローディングに進みます。

マトリックスへのグリカンのローディング

1 必要な数のウェルに対し、白いキャップを慎重に取り外して Gly-X クリーンアッププレート（**図 5**）を準備します。

図 5. Gly-X クリーンアッププレート

2 真空マニホールドに廃液トレイをセットし、マニホールドを組み立てます。

図 6. 廃液トレイが取り付けられた真空マニホールド

3 廃液トレイの上から、クリーンアッププレートを真空マニホールドに取り付けます。

図 7. 廃液トレイとクリーンアッププレートが取り付けられた真空マニホールド

4 マルチチャネル型ピペットを使用して、クリーンアッププレートの 1 列または 1 行のウェルに、450 µL の ACN を加えます。減圧しないでください。

注 **クリーンアッププレートによってある程度の ACN の損失が生じます。すぐに ステップ 5 に進みます。**

5 マルチチャネル型ピペットを使用して、脱グリコシル化プレートの各サンプルに 150 µL の ACN を加え、十分に混合してから、全量のサンプル（約 172 µL）を脱グリコシル化プレートからクリーンアッププレートの対応のウェルに移します。混合します。

6 **4** と **5** のステップを繰り返し、すべての行をクリーンアッププレートに移します。

注 **シングルチャンネルピペットを使用して、一度に 1 つのサンプルでステップ 4 と 5 を実施し、すべてのサンプルでステップを繰り返します。**

7 5 in Hg 未満の真空を適用します。溶液を流します。

8 各ウェルに 600 µL の アセトニトリルを加えます。5 in Hg 未満の真空を適用します。

9 グリカンがクリーンアッププレートマトリックスにロードされました。 13 ページの**“オンマトリックス 2-AB Express ラベリング”** に進みます。

オンマトリックス 2-AB Express ラベリング

1 クリーンアッププレートの各ウェルに 80 µL の 2-AB 希釈標準溶液を加えます。

2 5 in Hg 未満の真空を適用します。溶液を流します。

図 8. クリーンアッププレートに添加された希釈標準溶液

3 65 °C のヒートブロックの表面に直接クリーンアッププレートを置きます。

図 9. ヒートブロック上のクリーンアッププレート

4 ヒートブロックの蓋でクリーンアッププレートをカバーし、65 °C で 1 時間インキュベートします。

図 10. ヒートブロックの蓋が取り付けられたクリーンアッププレート

注 **ヒーターがカバーされている場合でも、2-AB ラベリングには、ラボの換気フードを使用することを推奨します。**

2-AB クリーンアップ

洗浄

1 マニホールドから廃液トレイを取り外し、空にします。（**図 11** を参照）

図 11. 廃液トレイ

2 マニホールドにロードプレート（ディープウェルプレート）を取り付けます。（**図 12** を参照）

図 12. ロードプレート（ディープウェルプレート）

3 マニホールドの上部に Gly-X クリーンアッププレートを取り付けます。（**図 13** を参照）

図 13. マニホールドの上部に取り付けられた Gly-X クリーンアッププレート

4 クリーンアッププレートの各ウェルに 600 µL の ACN を加えます。

5 5 in Hg 未満の真空を適用し、溶出液をロードプレート（ディープウェル）に集めます。

6 マニホールドベースから、マニホールドの上部とともにクリーンアッププレートを取り外します。チップの損傷や汚染を防止するために、保管用プレートの上に置いておきます。（**図 14** を参照）

図 14. クリーンアッププレートと、マニホールドおよび保管用プレート

7 マニホールドからロードプレート（ディープウェル）を取り外します。（**図 15** を参照）

図 15. ロードプレート（ディープウェル）

8 廃液トレイを取り付けます。（**図 16** を参照）

図 16. 廃液トレイ

9 廃液トレイの上から、クリーンアッププレートを真空マニホールドに取り付けます。（**図 17** を参照）

図 17. 廃液トレイと真空マニホールドの上に設置された Gly-X クリーンアッププレート

再ロード

1 集められた約 600 µL の溶出液をすべて、ロードプレート（ディープウェル）からクリーンアッププレートの対応のウェルに移します。

2 5 in Hg 未満の真空を適用します。

注 **再ロードのステップの目的は、グリカンの回収率を最大化することです。**

洗浄

1 5 in Hg 未満の真空を適用し、600 µL の アセトニトリルで 3 回洗浄します。

2 最後の洗浄の後、30 秒間、真空をおよそ 20 in Hg に高めて、ウェルを完全に乾燥させます。

注 **48 以上のサンプルを処理している場合は、2 回目の洗浄の後に廃液トレイを空にします（廃液トレイの容量は約 120 mL）。適切なストリームで有機廃液を処理します。**

注 **ポンプを閉めて真空を遮断する場合、溶出に備えてバルブを 5 in Hg に設定します。**

3 真空マニホールドからクリーンアッププレートを取り外し、ラボ用ワイプで下部を拭き、残留溶媒を取り除きます。脇に置いておきます。

4 真空マニホールドから廃液トレイを取り外します。

溶出

1 エッジに切り込みがある面を上にして、Gly-X 真空マニホールドスペーサをマニホールドに取り付けます。（**図 18** を参照）

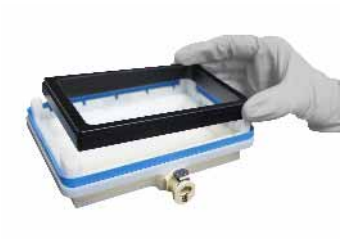

図 18. Gly-X 真空マニホールドスペーサ

2 コレクションプレート（PCR プレート）を取り付けます。（**図 19** を参照）

図 19. コレクションプレート（PCR プレート）

3 マニホールドを組み立て、コレクションプレートの上から、クリーンアッププレートを真空マニホールドに取り付けます。（**図 20** を参照）

図 20. コレクションプレートの上のクリーンアッププレート

4 クリーンアッププレートの各ウェルに 100 µL の 脱イオン水 を加えます。

5 5 in Hg 未満の真空を適用し、洗浄されたラベル化グリカンサンプルをコレクションプレートに集めます。

6 溶出液を集めるために、1 分以上真空状態を維持します。

注

すべてのウェルを完全に空にする必要があります。そうでない場合は、さらに 1 ～ 2 分間、5 in Hg 未満の真空状態を維持します。溶出ステップ中に真空を高めないでください。

7 ベンチ上でマニホールドを軽くたたき、クリーンアッププレートの下部の液滴を落としてください。

8 真空を解放し、クリーンアッププレートを取り外して真空を完全に解放してから、マニホールドを分解して、コレクションプレートを取り外します。

9 ピペットを使用して各サンプルを混合します。

注

この最終的な溶出後の混合ステップは、一貫性の高い結果を得るために不可欠です。

10 シールフィルムでコレクションプレートを密閉します。

11 黒い使用ウェルシーリングキャップを使用済みのクリーンアッププレートウェルに取り付け、バッグに戻して、RT で保管します。

12 2-AB-ラベル化グリカンサンプルは分析可能な状態です。サンプルは、-20 °C で少なくとも 6 か月間、4 °C で最大 5 日間保管できます。

注

ウェルが再使用されるのを防ぐために、クリーンアップ前の手順で、使用するウェルに黒のキャップストリップ（図 21）を取り付けます。

注

使用後にクリーンアッププレートを保管するために、クリーンアッププレート保管（丸底）プレート（図 21）を使用する必要があります。バッグに入れて室温で保管します。

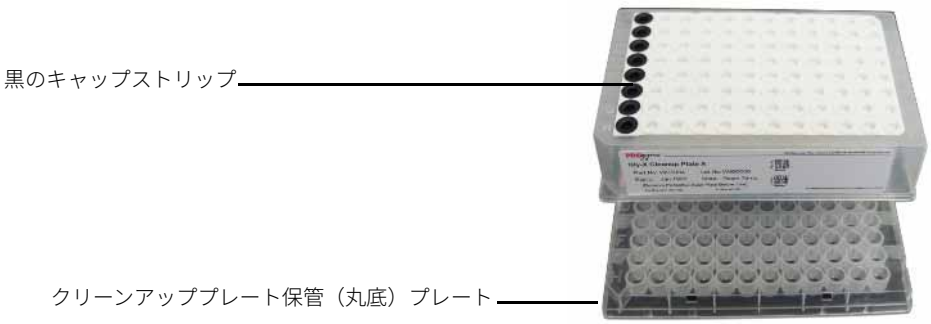

図 21. 黒のキャップストリップが取り付けられたクリーンアッププレート

ラベル化グリカンの分析

2-AB グリカンの励起 / 発光波長

N-グリカンと結合した 2-AB に最適な励起/発光波長は、使用される機器の光学設定によって異なる可能性があります。一緒に使用される励起/発光ペアには次があります。

- 360/428 nm（Waters Acquity UHPLC でアジレントが使用）
- 260/430 nm（Agilent 1290 Infinity でアジレントが使用）
- 250/428 nm（Melmer *et al.*、2010）
- 330/420 nm（Bigge *et al.*。1995）

2-AB グリカンの LC 注入量

UHPLC に対し、1 µL の水中の 2-AB-グリカンを注入することが推奨されます。

より多い 2-AB-グリカンを注入する場合（> 1 µL）、75 % までアセトニトリルで希釈します。

より高い濃度の注入が必要な場合は、100 µL のグリカンを SpeedVac（加熱なし）で乾燥させ、より少ない容量で再溶解します。

2-AB-ラベル化グリカンに推奨の HILIC メソッド

Agilent AdvanceBio アミド HILIC カラム

Agilent AdvanceBio アミド HILIC カラムは、N-グリカンの HILIC 分離用に設計されています。全多孔質 1.8 µm シリカ粒子と独自の結合相により、優れた長期安定性と再現性を実現すると同時に、複雑な N-グリカン混合物を最適に分離します。

推奨する開始条件

取り付け、カラムのコンディショニング、使用パラメータ（pH、温度、圧力）などの説明については、AdvanceBio アミド HILIC カラムユーザーマニュアル（**5994-6915EN**）を参照してください。

- AdvanceBio アミド HILIC カラム、2.1 × 150 mm、1.8 µm（部品番号 859750-913）
- 移動相 A：50 mM ギ酸アンモニウム、ギ酸を用いて pH 4.4 に調整、または Agilent AdvanceBio ギ酸アンモニウム HILIC 移動相濃縮液（部品番号 G3912-00000）から調製
- 移動相 B：アセトニトリル
- カラム温度：60 °C
- 流量：0.5 mL/min

2-AB グリカン用の次のメソッドは、アプリケーションノート **5994-7477EN**『Glycan Peak Assignment Tool (GPAT)』（グリカンピークアサインメントツール（GPAT））で使用されています：

表 4　中性グリカン、S1 グリカン、S2 グリカンを含む 2-AB グリカンサンプルの LC グラジエント

時間（分）	%B
0	74
50	54
51	40
52	40
54	74
64	74

表 5　中性グリカンから S4 グリカンまでを含む 2-AB グリカンサンプルの LC グラジエント

時間（分）	%B
0	74
75	44
76	40
77	40
79	74
90	74

グリカンピークアサインメントツール（GPAT）

多くの場合、HILIC リテンションタイム（RT）だけでは、得られた分離ピークが多数のグリカン構造の候補のどれと一致するかを確実に判定することができません。グルコース単位（GU）-正規化後グリカンリテンションタイムのライブラリに基づき、ピーク同定を予測することは可能です。グリカンピークアサインメントツール（GPAT）には、AdvanceBio アミド HILIC カラムと移動相を使用して分離された、100 個の InstantPC-ラベル化 N-グリカンおよび 2-AB-ラベル化 N-グリカンの GU 値のライブラリが含まれています。GPAT はウェブベースで、無料で使用できます。使用を開始するには、2-AB-ラベル化ラダー標準（部品番号 GKSB-503）により取得されたリテンションタイム（RT）を入力するだけです。ラダー標準に基づく RT を使用して、GPAT はライブラリにより予測される N-グリカン RT のリストを生成します。機密性の高いサンプル情報を入力する必要がありません。

アプリケーションノート **5994-7477EN** では、このツールを使用してセツキシマブに存在するグリカンに注釈を付け、多様なグリカン構造で GPAT の予測精度を評価しました。

このツールは 2.1 × 150 mm バージョンの Agilent AdvanceBio アミド HILIC カラム（部品番号 859750-913）で収集されたデータでの使用を対象としており、アジレントのウェブサイト（**http://www.agilent.com/biopharma/gpat**）から無料で使用できます。

Waters BEH グリカン分離技術カラムのための 15 分 UHPLC メソッド

2.1 x 100 mm、1.7 µm カラム温度 60 °C、励起 360 nm、発光 428 nm

表 6　15 分メソッド、Waters のカラム

時間（分）	流量（mL/min）	% アセトニトリル	% 100 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.4
0.0	1.0	80.0	20.0
2.0	1.0	80.0	20.0
12.0	1.0	52.5	47.5
12.1	0.5	40.0	60.0

表 6　15 分メソッド、Waters のカラム（続き）

時間（分）	流量（mL/min）	% アセトニトリル	% 100 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.4
12.5	0.5	40.0	60.0
12.6	0.5	75.0	25.0
12.7	1.0	80.0	20.0
15.0	1.0	80.0	20.0

Waters BEH グリカン分離技術カラムのための 60 分 UHPLC メソッド

2.1 x 150 mm、1.7 µm カラム温度 60 °C、励起 360 nm、発光 428 nm

注

このメソッドは、アプリケーションノート 5994-0942EN『Comparison of Common Fluorescent Labels for LC/MS Analysis of Released N-Linked Glycans』（遊離 N- 結合型グリカンの LC/MS 分析用の一般的な蛍光ラベルの比較）で使用されています。

表 7　60 分メソッド、Waters のカラム

時間（分）	流量（mL/min）	% ACN	% 50 mM ギ酸アンモニウム、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

2-AB-ラベル化グリカンに対する推奨の MS 条件

MS 条件

Agilent Jet Stream ESI ソース、任意の MS, ポジティブモード、シースガス 300 °C、10.0 L/分、乾燥ガス 150 °C、9.0 L/分、ネブライザ圧力 35 psig、VCap 2500 V、ノズル 500 V、フラグメンタ 100 V（該当する場合）。

Waters Xevo G2-S QTof、ポジティブまたはネガティブモード、キャピラリ電圧 2.8 kV、コーン電圧 30 V、ソース温度 120 °C、脱溶媒温度 350 °C、スキャン時間 0.8 秒、*m/z* 範囲 300〜2,000 Da。

2-AB- ラベル化グリカンの質量の計算

遊離還元末端を含むグリカンに追加される質量：

- グリカンの質量（遊離還元末端）+ $C_7N_2OH_8$-O= 2-AB-ラベル化グリカンの質量
- $C_7N_2OH_8$-O によって追加される質量
  - モノアイソトピック：120.06875 Da
  - 平均：120.2 Da

付表 A

自動化プロトコルに対する推奨事項

以下のサンプルと試薬容量の指示は、Gly-X プロトコルの自動化のためのピペッティング要件に合うように作成されました（**表 6** の 19ページ）。自動化プロトコルでの試薬の比率は標準プロトコルと同じですが、自動化ピペッティングの信頼性を向上させるために、最小分注容量は 2 µL から 5 µL に変更します。

表 8　5 µL の最小分注容量に対応するための、サンプル、変性剤、N- グリカナーゼに関する希釈標準溶液の指示。表 2 および 表 3 の 9 ページ の指示に従い、その他の希釈標準溶液を調製します。

サンプルと試薬	標準プロトコル	自動化プロトコル
サンプル	最大 2 mg/mL（最大 40 µg）で 20 µL*	最大 2.67 mg/mL（最大40 µg）で 15 µL*
変性剤	サンプルあたり 2 µL の変性試薬原液を使用します。	水で変性剤を希釈します（2:3（v/v））。 サンプルあたり 5 µL の希釈変性試薬を使用します。 必ず 20 % の予備を含めて希釈変性試薬を調製します。例えば、8 つのサンプルには 48 µL 調製します（19.2 µL 変性試薬、28.8 µL 水）。
N-グリカナーゼ希釈標準溶液	N-グリカナーゼと Gly-X 消化緩衝液を 1:1（v/v）で混合して、N-グリカナーゼ希釈標準溶液を調製します。 サンプルあたり 2 µL の N-グリカナーゼ希釈標準溶液を使用します。 必ず 20 % の予備を含めて N-グリカナーゼ希釈標準溶液を調製します。例えば、8 つのサンプルには 20 µL 調製します。	N-グリカナーゼ、Gly-X 消化緩衝液、水を 1:1:3（v/v/v）で混合して、N-グリカナーゼ希釈標準溶液を調製します。 サンプルあたり 5 µL の N-グリカナーゼ希釈標準溶液を使用します。 必ず 20 % の予備を含めて N-グリカナーゼ希釈標準溶液を調製します。例えば、8 つのサンプルには 48 µL 調製します（9.6 µL N-グリカナーゼ、9.6 µL Gly-X 消化緩衝液、28.8 µL 水）。

*　サンプルの種類によっては、最大 100 µg 糖タンパク質を使用できる場合があります（22 ページの**“FAQ”** を参照）。

FAQ

質問：2-AB-ラベル化グリカンの MS 分析において最もよく見られる付加体は何ですか？

回答：www.agilent.com にポジティブおよびネガティブモード MS における最も一般的な 2-AB-ラベル化グリカン付加体と、それらの質量のリストが掲載されています。

質問：2-AB-ラベル化グリカンの MS 分析には、ポジティブモードまたはネガティブモードのどちらがより適していますか？

回答：それぞれにメリットとデメリットがあります。ポジティブモード：バックグラウンドノイズが小さく、シグナルがより強い。ネガティブモード：付加体がより少ないため、MS がよりシンプルになる。

質問：UHPLC オートサンプラに直接コレクションプレートを取り付けることはできますか？プレートの寸法は？

回答：はい。

OpenLab 2 で操作される Agilent LC の場合、コントロールパネルで機器への接続を切り、［機器の構成］を選択します。右クリックでオートサンプラモジュールを開き、そのウィンドウの下部で［サンプル容器を定義］をクリックして、オプションのリストを表示します。**図 22** に示されている寸法で、新しいオプションを追加します。

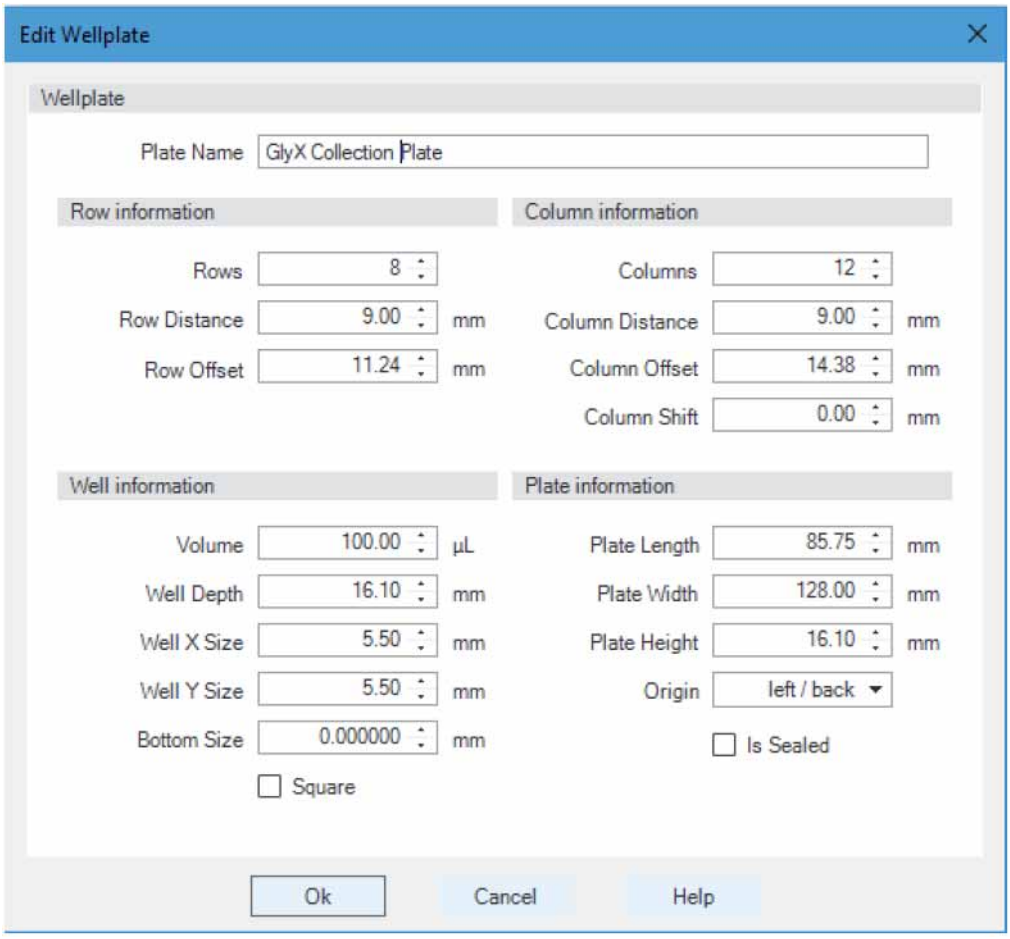

図 22.　　ウェルプレート設定の編集

MassHunter で操作される Agilent LC の場合、機器の構成ツールを使用して同じようにコレクションプレートを設定できます。

図 23 に、例として、Waters Acquity UPLC で使用可能な設定を示します。

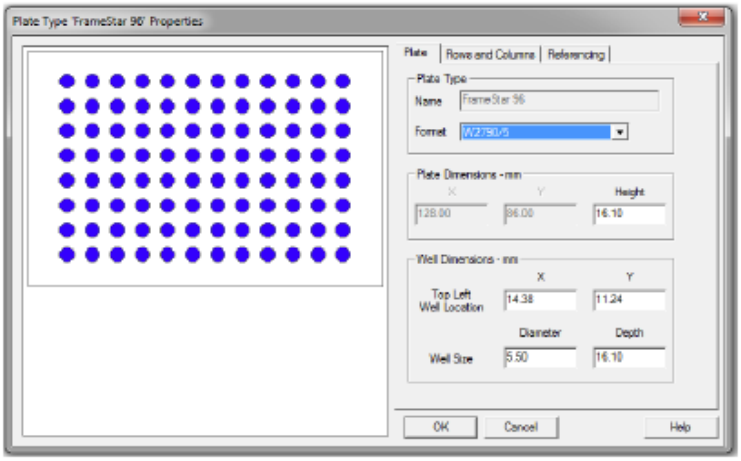

図 23.　　コレクションプレート設定

注

プレートから注入する場合は、粘着剤がプローブに問題をもたらす可能性があるため、通常の粘着ホイルまたは粘着シールフィルムは回避します。粘着シーリングホイルおよびフィルムは取り除く必要があります。キットに付属のスリット入りシールフィルム（ウェルエリアに粘着剤なし）、または穴開け可能なヒートシールホイルを使用します（保管シーリングホイルは使用しません）。ウェルの上に直接粘着するカバー / ホイルは避けます。粘着剤は UHPLC プローブに損傷を与える可能性があります。保管のために、キットに付属のスリット入りフィルムを、キットに付属のシーリングホイルでカバーできます。スリット入りフィルムを設置したまま、分析の前に付属のシーリングホイルを取り外すことが可能です。追加のシーリングホイルは Thermo Scientific から注文できます（AB-0626）。

コレクションプレートはシールフィルム（スリット入り）で密閉するか、マイクロプレートヒートシーラー（Thermo ALPS 50 V 半自動化マイクロプレートヒートシーラー、#AB-1443 など）を使用して穴開け可能なホイル（Thermo Easy Pierce 20 µm ホイル、#AB-1720 など）で加熱密閉できます。

コレクションプレートの寸法は、メーカーのウェブサイトでも参照できます。Framestar 96 ウェルスカート付 PCR プレート（#4ti-0960/C、E&K 部品番号 75094）。ニードル調整なしで、このメソッドを使用するデッドボリュームは約 15 µL です。より優れた回収率のために設計されたバイアルにサンプルを移すことも可能です（Waters Total Recovery バイアルなど）。

質問：私のサンプルが Gly-X クリーンアップマトリックスに完全にロードされていません（ 11 ページの“マトリックスへのグリカンのローディング”）。なぜですか？

回答：これは、タンパク質サンプルの性質、またはサンプル緩衝液の組成によるマトリックス効果に起因している可能性があります。反応ごとのタンパク質の量を減らすか、または Gly-X プロトコル開始前にバッファ交換を行うことによって対応できる可能性があります。

質問：反応ごとの推奨上限である 40 µg を超えるタンパク質を使用できますか？

回答：それはタンパク質によって異なります。一般的に、100 ug までのタンパク質はこのサンプル前処理に対応していますが、グリカンの相対 % 面積値における直線的レスポンスの損失なく、40 µg を超えるタンパク質を使用できることを検査して確認する必要があります。サポートが必要な場合は、アジレントまでお問い合わせください。

質問：変性および消化ステップに、PCR プレートではなく、Eppendorf マイクロチューブを使用できますか？

回答：はい。加熱ステップではチューブを開けたままにして、混合中に材料が蓋に当たらないようにしてください。

質問：変性および消化プロトコル中の混合と加熱のために、Eppendorf Thermo Mixer C などのプレートシェーカー/ヒーターを使用できますか？

回答：はい、可能です。ウェルの材料をボルテックスするのに混合率が十分に高くなければなりません。

質問：2-AB ラベリングステップの前の最終試薬とは？

回答：最終試薬は弱酸で、還元的アミノ化による 2-AB ラベリングの前に、グリコシルアミン（-NH2）に対し、遊離還元末端（-OH）を含むグリカンへの変換を促進します。

質問：2-ABラベリングステップのために、ヒートブロックは65°Cに設定します。反応の実際の温度は？

回答：クリーンアッププレートマトリックスの反応温度は、ヒートブロック設定値より最大で 5 °C 低くなります（約 60 °C）。

質問：Waters の真空マニホールドに GX96-2AB キットを使用できますか？

回答：はい。溶出ステップ（12 ページ）で GX100 の代わりに GX200 Gly-X 真空マニホールドスペーサ（Watersマニホールド）が使用されている場合は可能です。Waters真空マニホールド（#186001831）を使用している場合、GX200 は、クリーンアッププレートとコレクションプレートとの間に適切な距離を提供します。これは、コレクションプレートへのラベル化 N-グリカンの溶出の際に、クロストークを回避するために重要です。詳細は、アジレントにお問い合わせください（**https://explore.agilent.com/ContactUs-jp** ）。

質問：LC 分析でラベル化グリカンの光シグナルが少ないです。これはどのように対処したらよいでしょうか？

回答：シグナルを増加させるためのいつかのオプションがありますが、これらは機器メーカーによって異なる可能性があるため、まずは使用されている FLD ex/em 波長を確認します（18 ページの**“2-AB グリカンの励起/発光波長”**）。次のようなオプションがあります。

1. ACN による希釈後に、さらに多くのラベル化グリカンを注入します（**18 ページ**）。
2. 例えば SpeedVac（加熱なし）を使用してグリカンを乾燥させ、より少量で再懸濁します。
3. プロトコル中に、100 µL ではなく 50 µL の 脱イオン水でラベル化グリカンを溶出します（**16 ページ** の**“溶出” ステップ 4** を参照）。これは、ほとんどのサンプルタイプに有効です。質問はアジレントにお問い合わせください。

リソースおよび参考文献

アジレントのウェブサイトで追加情報、ダウンロード可能なポスター、出版物、テクニカルノートをご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

製品の使用、保証、使用ライセンス

販売規約はこちら：**www.agilent.com**

バーチャル特許表示

アジレントの製品と特許については、**www.agilent.com** をご覧ください。

参考文献

Bigge, J. C., T. P. Patel, J. A. Bruce, P. N. Goulding, S. M. Charles, R. B. Parekh. Nonselective and Efficient Fluorescent Labeling of Glycans Using 2-Amino Benzamide and Anthranilic Acid. Anal Biochem 230: 229-38 (1995).

Melmer, M., T. Stangler, M. Schiefermeier, W. Brunner, H. Toll, A. Rupprechter, W. Lindner and A. Premstaller. HILIC Analysis of Fluorescence-Labeled N-Glycans from Recombinant Biopharmaceuticals. Anal Bioanal Chem 398: 905-914 (2010)

技術支援

アジレントは、糖鎖分析のための自動化可能な高速メソッドの開発に取り組んでいます。開発中の製品についてはお問い合わせください。

アジレントの製品に関して質問や問題がある場合は、弊社までお問い合わせください（アジレントのホームページ：お問い合わせページは**こちら**）。

アジレントはお客様の意見を尊重し、ご連絡をお待ちしております。製品性能や新しいアプリケーション、技術に関するご提案を歓迎します。

製品情報

キットおよびモジュール

製品コード	説明
GX96-2AB	Gly-X および 2-AB キット（96-ct）
GX24-2AB*	Gly-X および 2-AB Express キット（24 -ct）
GX24-401AB	Gly-X および 2-AB Express 脱グリコシル化とラベリングモジュールセット（24-ct）
GX96-401	Gly-X 2-AB Express ラベリングモジュール（96-ct）
GX24-401	Gly-X 2-AB Express ラベリングモジュール（24-ct）
GX96-402	2-AB Express 用 Gly-X クリーンアップモジュール（96-ct）
GX96-100	Gly-X 脱グリコシル化モジュール（96-ct）
GX24-100	Gly-X 脱グリコシル化モジュール（24-ct）
GX400	Gly-X 2-AB Express スタータパック（Gly-X 真空マニホールドスペーサおよび 2 個のヒーターブロックの蓋（2 つのサイズ）を含む）
GX100	Gly-X 真空マニホールドスペーサ（2 パック）
GX200	Gly-X 真空マニホールドスペーサ（Waters マニホールド）
G5524-60010 KIT	AssayMAP PA50 Protein-A アフィニティ精製キット（96-ct）

* 24 ct キット（GX24-2AB）には、96 ウェルクリーンアッププレートと 24-ct 2-AB ラベリングモジュールが含まれています。クリーンアップモジュールは室温で保管し、24 ct リフィルの Gly-X 2-AB Express 脱グリコシル化およびラベリングモジュールセットをご注文ください（GX24-401AB）

AdvanceBio アミド HILIC カラムおよび移動相濃縮液

部品番号	説明
859750-913	AdvanceBio アミド HILIC、2.1 × 150 mm、1.8 µm
858750-913	AdvanceBio アミド HILIC、2.1 × 100 mm、1.8 µm
G3912-00000	AdvanceBio ギ酸アンモニウム移動相濃縮液（1 L の 50 mM ギ酸アンモニウムを pH 4.4 にして精製）

2-AB ラベル化グリカンライブラリ

製品コード	説明
GKSB-005	ヒト IgG N-結合型グリカンライブラリ
GKSB-520	2 本鎖糖鎖および高マンノース分割ライブラリ
GKSB-001	ヒト α1-酸糖タンパク質 N-結合型グリカンライブラリ
GKSB-003	ウシフェチュイン N-結合型グリカンライブラリ
GKSB-503	グルコースホモポリマー標準
GKSB-232	α(2-3) シアル化 2 本鎖糖鎖ライブラリ
GKSB-262	α(2-6) シアル化 2 本鎖糖鎖ライブラリ
GKSB-233	α(2-3) シアル化 3 本鎖糖鎖ライブラリ
GKSB-263	α(2-6) シアル化 3 本鎖糖鎖ライブラリ
GKSB-234	α(2-3) シアル化 4 本鎖糖鎖ライブラリ
GKSB-264	α(2-6) シアル化 4 本鎖糖鎖ライブラリ

2-AB ラベル化個別グリカン標準

製品コード	説明	製品コード	説明
GKSB-401	G0-N	GKSB-308	G3
GKSB-301	G0	GKSB-314	A3
GKSB-402	G0F-N	GKSB-309	NGA4
GKSB-302	G0F	GKSB-310	G4
GKSB-303	G0FB	GKSB-111	HYBR
GKSB-317	G1	GKSB-100	NN
GKSB-316	G1F	GKSB-101	Man3
GKSB-304	G2	GKSB-102	Man3F
GKSB-305	G2F	GKSB-103	Man5
GKSB-306	G2FB	GKSB-104	Man6
GKSB-318	NA2Ga2F	GKSB-105	Man7
GKSB-311	A1	GKSB-106	Man8
GKSB-315	A1F	GKSB-107	Man9
GKSB-312	A2	GKSB-201	GalGalNAc
GKSB-313	A2F	GKSB-203	3'-SLN
GKSB-307	NGA3	GKSB-204	6'-SLN

www.agilent.com/chem/jp

© Agilent Technologies, Inc. 2025
Second edition, March 2025

5994-1228JAJP
GX96-2AB
Rev. AG