ワークフローと消耗品ガイド

AdvanceBio Gly-X 2-AB Express サンプル前処理と LC/FLD/MS を用いた生物製剤の糖タンパク質の N-グリカン分析

N-グリカン分析を簡素化および標準化

N-結合型グリカンの位置と構造は、治療用タンパク質の薬理学で重要な役割を果たし、免疫原性や薬物動態、薬力学に影響を与えます。

2-AB（2-アミノベンズアミド）色素は 20 年以上もの間 N-グリカンデータの生成に使用されてきた、使用法が確立されているタグです。Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express は、高性能な N-グリカンサンプル前処理プラットフォームです。[1] そのワークフローは、溶媒内での 5 分間の脱グリコシル化ステップの後に、ソリッドステートマトリックスで 2-AB ラベリングを実行するというシンプルなものです。余分な色素をアセトニトリルで洗い流してから、脱イオン水を用いてラベル化サンプルを溶出させます。サンプルを乾燥させる必要はありません。AdvanceBio アミド HILIC カラムを用いれば、UHPLC/FLD/MS 用のサンプルを 2 時間以内に準備し、親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）とその後の相対的な定量に使用できます。また、N-グリカン分離のキャリブレーションと N-グリカン種の特定用に、幅広い種類の 2-AB-ラベル化 N-グリカン標準が用意されています。

図 1. Gly-X 2-AB Express サンプル前処理と LC/FLD/MS を用いた遊離 N-グリカンの分析ワークフロー

アジレントが設計、製造した包括的な分析ワークフローソリューション

このガイドでは、2-AB N-グリカンサンプルの前処理と分析の開始に必要な消耗品について説明します。多くの消耗品はリツキシマブ（リツキサン、モノクローナル抗体（mAb））とエタネルセプト（エンブレル、Fc 融合タンパク質）での N-グリカンの分析に使用されました。これは、サンプルの前処理、分離、データ解析を含む全体的なワークフローを示すものです。[2]

この Gly-X 2-AB Express N-グリカン分析ワークフローガイドには、次の製品の詳細情報が含まれます。

- サンプル前処理キット – AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 技術を用いれば、サンプルを 2 時間で前処理して分析用に準備できます。
- 2-AB ラベル化 N-グリカン標準 – バイオ医薬品の安全性と効能に影響しうる N-グリカン種のプロファイリングにおいて、このような十分に特性解析された個々の標準とライブラリは必須です。
- HILIC によるグリカンの分離用の液体クロマトグラフィーカラム
- 溶媒と試薬
- バイアルとキャップ
- 希釈用に準備された濃縮済み移動相

生産性向上のためのステップ：

- 50 °Cでの 5 分間の PNGase F 消化。N-グリカンを偏りなく遊離させることができます。
- クリーンアップマトリックスでグリカンが固定化されている間に実行される 2-AB Express によるラベリング。乾燥を防ぎ、サンプル前処理の合計時間を短縮できます。
- 実績のある 2-AB ラベリング色素の使用。進行中のプロジェクトでデータの継続性を確保できます。
- モジュール式キットを柔軟に使用。

糖タンパク質 40 µg
変性 3 分間
N-グリカナーゼ消化 5 分間
グリカンの遊離
2-AB Express ラベリング 60 分間（乾燥なし）
ラベル化グリカン
96 ウェルクリーンアッププレート
UHPLC, MS/MS
データ解析

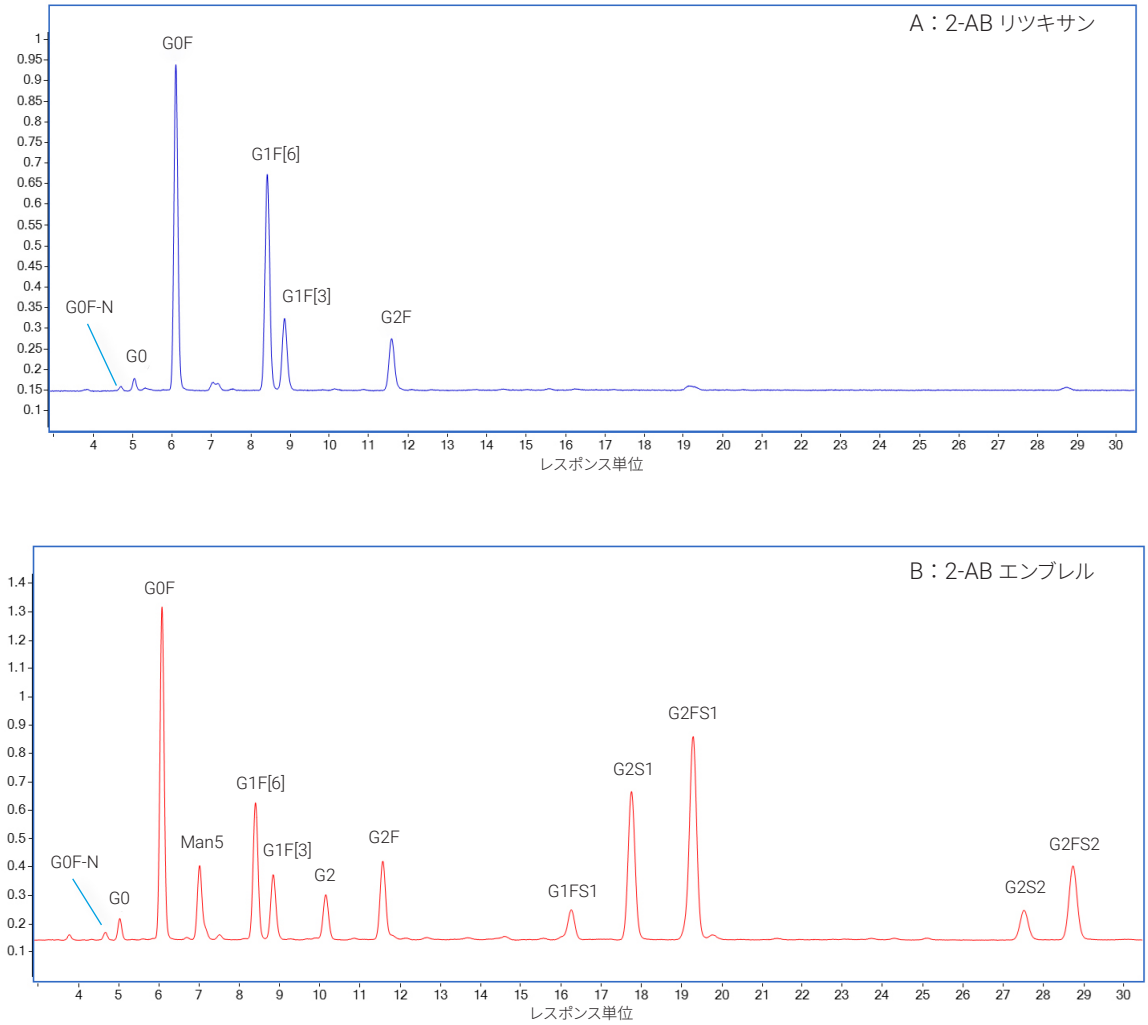


図 2. 2-AB でラベル化した（A）リツキサンと（B）エタネルセプト N グリカンの HILIC-UHPLC 蛍光プロファイル。N-グリカンの相対パーセント面積については、表 1 および 2、n = 4 をご覧ください。UHPLC 条件および Q-TOF パラメータを表 3 と 4 に示します。

表 1. 2-AB、n = 4 でラベル化したリツキサン N-グリカンの相対 % 面積、SD、%CV 値

	平均相対 % 面積	標準偏差	%CV
G0F-N	0.523	0.030	5.715
G0	1.423	0.041	2.891
G0F	42.780	0.052	0.122
G1F[6]	33.760	0.077	0.229
G1F[3]	11.853	0.040	0.340
G2F	9.660	0.140	1.447

表 2. 2-AB、n = 4 でラベル化したエタネルセプト N-グリカンの相対 % 面積、SD、%CV 値

	平均相対 % 面積	標準偏差	%CV
G0F-N	0.428	0.005	1.170
G0	1.155	0.006	0.500
G0F	19.783	0.026	0.133
Man5	5.225	0.034	0.654
G1F[6]	9.468	0.029	0.303
G1F[3]	4.663	0.056	1.193
G2	3.280	0.008	0.249
G2F	6.223	0.019	0.304
G1FS1	3.083	0.039	1.253
G2S1	14.400	0.029	0.204
G2FS1	20.523	0.039	0.188
G2S2	3.415	0.053	1.540
G2FS2	8.350	0.014	0.169

表 3. 2-AB ラベル化 N-グリカン用の Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD の条件

パラメータ	設定値		
カラム	Agilent AdvanceBio アミド HILIC、 2.1 X 150 mm、1.8 µm（部品番号 859750-913）		
カラム温度	60 °C		
移動相	A) 50 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.4 B) アセトニトリル		
グラジエントプログラム	時間（分）	%B	流量（mL/min）
	0	74	0.6
	50	54	0.6
	51	40	0.6
	52	40	0.6
	54	74	0.6
	64	74	0.6
注入量	1 µL		
蛍光検出	Agilent 1260 Infinity II FLD 2-AB：λEx 260 nm、λEm 430 nm		

表 4. 2-AB ラベル化 N-グリカン用の Agilent 6545XT Q-TOF パラメータ

Agilent 6545XT Q-TOF	
イオン源	デュアル AJS ESI
ガス温度	150 °C
乾燥ガス流量	9 L/min
ネブライザ	35 psi
シースガス温度	300 °C
シースガス流量	10 L/min
Vcap	2,500 V
ノズル電圧	500 V
フラグメンタ	120 V
スキマ電圧	65 V
質量範囲	*m/z* 300 ～ 3,000
スキャン速度	1 スペクトル/秒
取り込みモード	拡張ダイナミックレンジモード（2 GHz）

Gly-X 2-AB Express の概要：最適な分析結果を得るためのヒント

糖タンパク質サンプルの前処理における考慮事項

糖タンパク質は、界面活性剤を含まない低塩濃度の中性緩衝液で、最大濃度 2 mg/mL で前処理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 の HEPES（pH 7.9）で希釈する必要があります。

- 最大濃度：2 mg/mL
- 反応ごとのタンパク質の最大量：40 µg（例：2 mg/mL の溶液ごとに 20 µL）
  mAbs にはより大量のタンパク質（最大 100 µg）を使用できますが、ロード量が 40 µg を超える場合は、データの直線性を評価する必要があります。
- 緩衝液：界面活性剤を含まない低塩濃度（最大 150 mM）の中性緩衝液。サンプルは、水または 50 mM の HEPES（pH 7.9）で希釈できます。
- サンプルの塩濃度が 150 mM を超える場合は、Agilent AdvanceBio スピンカラム、または 10 kDa カットオフフィルタによる脱塩をお勧めします。

インキュベーションおよびクリーンアップハードウェア

Gly-X 2-AB Express のサンプル前処理ワークフロー中にはサンプルが加熱されます。その最高温度は、タンパク質変性で 90 °C、PNGase F 消化で 50 °C、2-AB ラベリングで 65 °Cです。以下の方法を用いて96 ウェルプレートでサンプルを加熱する場合は、サーマルサイクラーか乾燥ブロックヒーターを使用することを推奨します。

ワークフローでは、シンプルな真空駆動クリーンアップを使用します。この表で推奨されているモデル以外の同等のヒーター、真空マニホールドまたはポンプを使用するときは、バリデーションが必要な場合があります。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。

加熱および真空ハードウェア（アジレント以外）	部品番号
96 ウェルサーマルサイクラー（Corning）	THERM-1001、110V THERM-1000、230V
コンパクトデジタル乾燥バス/ブロックヒーター（Thermo Fisher Scientific）	88871001
真空マニホールド（Millipore）	MSVMHTS00
真空ポンプ（Millipore）	WP6211560、110 V WP6122050、220V

HILIC ベストプラクティス

- HILIC 分離には、1 µL の（水性）ラベル化グリカンの少量注入が最適です。水性注入量が 1 µL を超えると、ピーク形状と分解能が損なわれます。注入量が 1 µL を超える場合の有機溶媒によるサンプル希釈の手順については、Gly-X 2-AB のユーザーマニュアルを参照してください。[2]
- Agilent AdvanceBio ギ酸アンモニウム濃縮移動相（p/n G3912-00000）は、1 L の水に 1 本加えるだけで、pH 4.4、50 mM ギ酸アンモニウムを調整できます。
- HPLC システムを最適化して、デッドボリュームを最小化する必要があります。最大動作圧の 80 % 以下で使用すると、より長寿命でカラムを使うことができます。
- 一般的な使用温度は 60 °Cです。これより高い温度でも使用できますが、カラム寿命が短くなります。

グリカン標準

アジレントは、遊離グリカン分析用の LC/FLD/MS システムをキャリブレーションするために、2-AB でラベル化された幅広い種類の遊離 N-グリカン標準およびライブラリをご用意しています。[3] グリカン標準は、グリカン異性体と共溶出ピークの特定に必須です。共溶出する可能性がある成分としては、G0F/Man5、Man5/G1、G1FS1/G2F などがあります。

データ解析とレポート作成

データの解析には、Agilent MassHunter BioConfirm Qualitative Analysis ソフトウェアとパーソナル化合物データベースを使用しました。

注：アジレントの MassHunter 11 と OpenLab ECM XT データ解析ソフトウェアは、21 CFR Part 11 に準拠しています。

グリカンピークアサインメントツール（GPAT）

AdvanceBio アミド HILIC カラムのユーザーには、さまざまな InstantPC および 2-AB ラベル化グリカンの N-グリカンリテンションタイムを予測できるように設計された、ウェブベースの無料ソフトウェアツールが用意されています。詳細については、アプリケーションノート 5994-7477EN をご覧ください。ツールはこちら：グリカンピークアサインメントツール

カラム、標準試料、消耗品などの情報

Gly-X 2-AB Express N-グリカンサンプル前処理、AdvanceBio アミド HILIC カラム、溶媒、およびサンプル容器

説明	部品番号
N-グリカンのサンプル前処理	
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express キット、96-ct	GX96-2AB
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express キット、24-ct	GX24-2AB*
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express スタータパック	GX400
AdvanceBio Gly-X 脱グリコシル化および 2-AB Express ラベリングモジュールセット、24-ct	GX24-401AB*
カラム、フィッティングとコネクタ	
AdvanceBio アミド HILIC、2.1 x 150 mm、1.8 µm	859750-913
Agilent InfinityLab クイックコネクトフィッティング（カラム注入口）	5067-5965
Agilent InfinityLab クイックターンフィッテイング（カラム出口）	5067-5966
溶媒および試薬	
InfinityLab Ultrapure LC/MS アセトニトリル、1 L	5191-4496
InfinityLab Ultrapure LC/MS 標準、水、1 L	5191-4498
AdvanceBio ギ酸アンモニウム移動相濃縮液、10 mL	G3912-00000
MS ソリューション、ギ酸、10 mL	US-700002341
溶媒ろ過消耗品**	
InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリ	5191-6776
InfinityLab 溶媒ろ過フラスコ、ガラス、2 L	5191-6781
フィルタメンブレン、ナイロン 47 mm、0.2 µm、100 個	5191-4341
フィルタメンブレン、再生セルロース 47 mm、0.2 µm、100 個	5191-4340
溶媒ボトルガラスフィルタ、溶媒インレット、20 µm	5041-2168
溶媒関連の消耗品	
InfinityLab セーフティキャップスターターキット	5043-1222
InfinityLab 溶媒ボトル、透明、1 L	9301-6524
InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1 L	9301-6526
溶媒ボトル、透明、2 L	9301-6342
溶媒ボトル、茶色、2 L	9301-6341
InfinityLab セーフティパージボトル	5043-1339
InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き[§]	5043-1221
InfinityLab タイムストリップ付きチャコールフィルタ、58 g[§]	5043-1193
バイアルとキャップ[†]	
バイアル、スクリュー式、2 mL、ポリプロピレン、100 個[‡]	5191-8150
バイアルインサート、300 µL、ポリプロピレン、樹脂足、100 個[‡]	5182-0549
9 mm、スクリュー式透明ポリプロピレンキャップ、100 個	5191-8151

* 24-ct キット（GX24-2AB）には、96 ウェルの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ます。クリーンアップモジュールは室温で保管し、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（GX24-401AB）の 24 ct リフィルを注文してください。

** この表に掲載されている溶媒以外の製品を使用する場合は、分析前に InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリを使用してください。

† 2-AB ラベル化グリカンは、96 ウェルプレートに溶出されます。プレートから LC に直接サンプルを注入することも、サンプルバイアルに移すこともできます。

‡ デッドボリュームを最小化するには、250 µL のバイアルインサートと 2 mL のポリプロピレンバイアルを使用することを推奨します。

§ 活性炭フィルタは廃液ボトルに付属していません。5043-1221 と 5043-1193 を一緒に注文してください。

Gly-X 2-AB Express N-グリカンサンプル前処理キットおよびモジュールの追加構成

説明	部品番号
AdvanceBio Gly-X 脱グリコシル化モジュール、96-ct	GX96-100
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express ラベリングモジュール、96-ct	GX96-401
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express クリーンアップモジュール、96-ct	GB96-402
AdvanceBio Gly-X 脱グリコシル化モジュール、24-ct	GX24-100
AdvanceBio Gly-X 2-AB Express ラベリングモジュール、24-ct	GX24-401
AdvanceBio Gly-X 脱グリコシル化および 2-AB Express ラベリングモジュールセット、96-ct	GX96-401AB

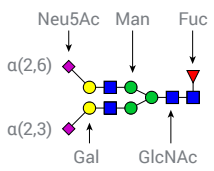
グリカン標準

アジレントのすべてのラベル化 N-グリカン標準については、アジレントのグリカン標準技術リーフレットをご覧ください。[3]

リツキシマブとエタネルセプトで出現するグリカン用の 2-AB ラベル化 N-グリカン標準。[2] これらの標準を用いて N-グリカンの分離を制御し、共溶出ピークを区別できます。

説明	CFG 構造	部品番号
G0F-N / F(6)A1		GKSB-402
G0 / A2		GKSB-301
G0F/FA2		GKSB-302
Man5/M5		GKSB-103
G1/A2G1		GKSB-317
G1F/FA2G1		GKSB-316
G2F/FA2G2		GKSB-305
G2/A2G2		GKSB-304*

* GKSB-304 2AB ラベル化 N-グリカン標準はエタネルセプト専用です。リツキシマブには使用できません。



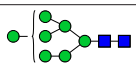
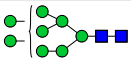
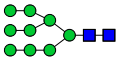
Neu5Ac = N-アセチルノイラミン酸
Man = マンノース
GalNAc = N-アセチルガラクトサミン
Fuc = フコース
Gal = ガラクトース
GlcNAc = N-アセチルグルコサミン
Asn = アスパラギン
Ser = セリン
Thr = トレオニン

図 3. グリカンの模式図は、CFG（Consortium for Functional Glycomics）[5] の推奨に従い、GlycoWorkbench 2.14.10 を使用して描きました。

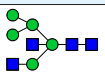
追加の複雑なタイプの 2-AB ラベル化天然型 N-グリカン標準

説明	CFG 構造	部品番号
G0-N		GKSB-401
G0FB		GKSB-303
G2FB		GKSB-306
G2S1 α(2,6)		GKSB-311
G2FS1 α(2,6)		GKSB-315
G2S2 α(2,6)		GKSB-312
G2FS2 α(2,6)		GKSB-313
G2F w/2 α-gal		GKSB-318
A3		GKSB-307
G3		GKSB-308
G3S3 α(2,6)		GKSB-314
A4		GKSB-309
G4		GKSB-310

AdvanceBio Gly-X 2-AB Express ラベル化高マンノース N-グリカン標準

説明	CFG 構造	部品番号
Man5/M5		GKSB-103
Man6/M6		GKSB-104
Man7/M7		GKSB-105
Man8/M8		GKSB-106
Man9/M9		GKSB-107

2-AB ラベル化天然型 N-グリカンコアおよびハイブリッド

説明	CFG 構造	部品番号
ハイブリッド		GKSB-111
NN		GKSB-100
Man3		GKSB-101
Man3F		GKSB-102

シアル化糖タンパク質の研究用の 2-AB ラベル化 2 本鎖、3 本鎖、4 本鎖 N-グリカンライブラリ。グリカン構造は分析証明書に記載されています。

説明	部品番号
AdvanceBio 2-AB 2antennary + 高マンノース分割ライブラリ	GKSB-520
AdvanceBio 2-AB α(2,3) シアル化 2 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKSB-232
AdvanceBio 2-AB α(2,6) シアル化 2 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKSB-262
AdvanceBio 2-AB α(2,3) シアル化 3 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKSB-233
AdvanceBio 2-AB α(2,6) シアル化 3 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKSB-263
AdvanceBio 2-AB α(2,3) シアル化 4 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKSB-234
AdvanceBio 2-AB α(2,6) シアル化 4 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKSB-264

2-AB ラベル化 N-グリカンライブラリとコントロール糖たんぱく質。グリカン構造は分析証明書に記載されています。

説明	部品番号
AdvanceBio 2-AB ヒト IgG N-グリカンライブラリ – 通常のヒト IgG の N-グリカンと一致する複雑な二分岐オリゴ糖で構成されます	GKSB-005
AdvanceBio 2-AB ヒト α-1-酸性糖タンパク質 N-グリカンライブラリ – 非フコシル化 2 本鎖、3 本鎖、4 本鎖コアグリカンの不均一な混合物で構成されます。シアル化レベル（NeuAc）はさまざまで、一部には外腕フコースの残留物とラクトサミン繰り返しが含まれており、以前にヒト α1-酸性糖タンパク質で報告された N-グリカンと一致します	GKSB-001
AdvanceBio 2-AB ウシフェチュイン N-グリカンライブラリ – シアル化 N-結合グリカン（コア非フコシル化）の混合物で構成され、以前にウシフェチュインで報告された N-グリカンと一致します	GKSB-002
AdvanceBio 2-AB グルコースホモポリマー標準	GKSB-503
Agilent-NISTmAb*、25 µL	5191-5744
Agilent-NISTmAb*、4 × 25 µL	5191-5745

AdvanceBio アミド HILIC カラム

説明	部品番号
1.8 µm、最大圧力 120 MPa、最高温度 80 °C	
AdvanceBio アミド HILIC 300 Å、2.1 × 150 mm、1.8 µm	859750-913
AdvanceBio アミド HILIC 300 Å、2.1 × 100 mm、1.8 µm	858750-913

参考文献

1. N-Glycan Analysis: Better Together. アジレントのカタログ 5994-1647EN.
2. Analysis of labeled Glycans User Manual 5994-1231EN、14 ページ.
3. AdvanceBio Glycan Standards Instant PC, 2-AB, 2-AA, APTS, InstantAB, InstantQ, Unlableled 5994-2202EN.
4. Varki A, et al. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. Glycobiology. 2015 Dec; 25(12): 1323-1324.
5. N-グリカンの遊離およびラベリングのための高速 2-AB サンプル前処理ワークフローの開発 5994-0945JAJP
6. Glycan Peak Assignment Tool (GPAT) Novel glucose unit-based software enabling more accurate peak assignments for InstantPC and 2-AB N-glycan HILIC/FLD analysis using the AdvanceBio Amide HILIC column and mobile phase. 5994-7477EN
7. A Quick and Efficient Sample Cleanup for Biomolecule Analysis. 5994-7239EN

Agilent CrossLab
From Insight to Outcome

Agilent CrossLab：サポートによる生産性の向上

Agilent CrossLab は、サービスと消耗品を統合し、お客様のワークフローのサポート、生産性の向上や運用効率の向上を実現するためのお手伝いをさせていただきます。アジレントは、あらゆる場面で「見えない価値」を提供し、お客様の目標達成を支援します。メソッドの最適化とトレーニングからラボ全体の移設と運用分析までの幅広い製品とサービスを提供することにより、お客様が機器とラボを管理して最高の性能を実現できるようお手伝いをさせていただきます。

CrossLab の詳細については、**ホームページ**をご覧ください。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE32022026

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, August 7, 2024

5994-4158JAJP

Agilent
Trusted Answers