

# AdvanceBio Gly-X InstantPC 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

## 簡素化と標準化による N-グリカン分析の生産性の向上

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る可能性があります。Agilent AdvanceBio Gly-X は次世代の N-グリカンサンプル前処理プラットフォームです<sup>1</sup>。迅速なグリカンラベリング用の InstantPC 色素、蛍光検出 (FLD) と質量分析 (MS) のための高いシグナル、余分なラベル色素や変性剤を除去する効率的な真空プレートクリーンアップステップにより、溶液内ワークフローを簡素化します。AdvanceBio アミド HILIC カラムを使用すると、ラベル化 N-グリカンサンプルの UHPLC/FLD/MS の前処理が 60 分以内に完了し、親水性相互作用液体クロマトグラフィーや、その後の相対的な定量を実施できます。また、N-グリカン分離のキャリブレーションや、N-グリカン種の同定用に、幅広い InstantPC ラベル化 N-グリカン標準が用意されています。



図 1. Gly-X InstantPC サンプル前処理と LC/FLD/MS を用いた遊離 N-グリカン分析のワークフロー

## アジレントが設計・作成した包括的な N-グリカン分析ワークフローソリューション

このガイドでは、InstantPC N-グリカン分析を開始する際に必要になる消耗品について説明します。多数の消耗品を試験した結果を、アプリケーションノート [5994-1348JAJP](#) で報告しました。<sup>2</sup> この研究では、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）の N-グリカン进行评估し、InstantPC ラベル化 N-グリカン分析は、2-AB グリカンと比較して蛍光シグナルが大幅に高く、MS イオン化効率に優れており、低アバンドランスのグリカン種の検出が可能であることを実証しました。

この Gly-X InstantPC N-グリカン分析ワークフローガイドには、次の製品情報が含まれています。

- サンプル前処理キット - Gly-X InstantPC は、LC/FLD の強い蛍光シグナルと MS 分析のイオン化向上を目的として特別に開発され、最適化されています。
- InstantPC ラベル化 N-グリカン標準品 - 十分に特性解析された個別の標準品とライブラリは、生物製剤薬品の安全性と有効性に影響を与える可能性のある N-グリカン種のプロファイリングにおいて、重要な役割を果たします。
- グリカン分離用の HILIC カラム
- 溶媒と試薬
- 希釈用に準備された濃縮済み移動相
- バイアルとキャップ
- データ解析とレポート作成

## N-グリカン分析の生産性向上を実現する要素

- LC/FLD や LC/MS 用サンプルを 1 時間以内に前処理
- 5 分間の PNGase F 消化により、N-グリカンを偏りなく遊離
- 高い LC/FLD および MS シグナルのための InstantPC 色素
- 室温で安定するシンプルな 96 ウェルクリーンアッププレート
- 高速・高分離能分析に対応
- 柔軟なサンプルスループットをサポートし、無駄がないモジュール形式

図 2 に、Gly-X InstantPC で前処理したリツキシマブとエタネルセプトの遊離 N-グリカンの HILIC/FLD データの例を示します。N-グリカン構造割り当ての MS データなどの詳細については、アプリケーションノート [5994-1348JAJP](#) に記載されています。

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

InstantPC ラベリング 1 分間

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

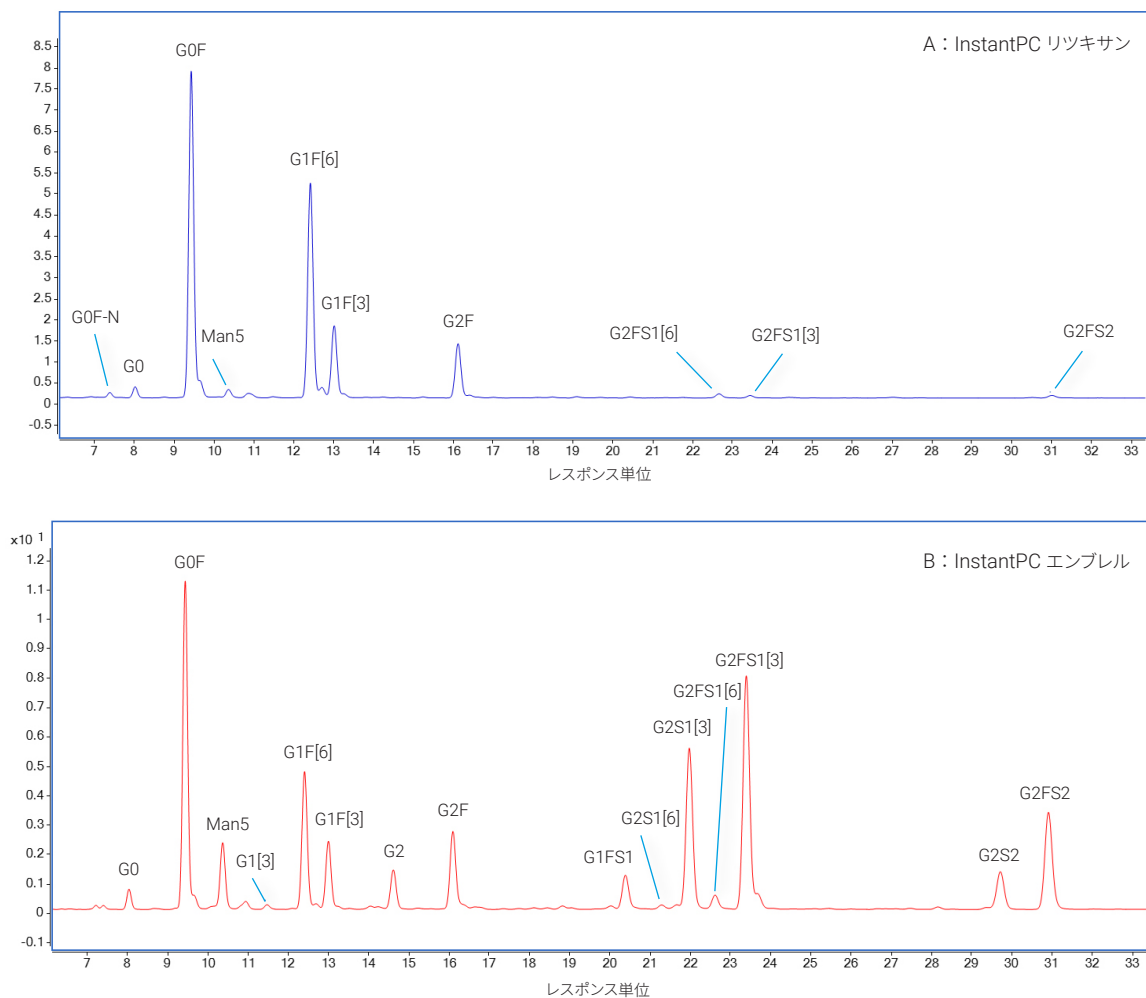


図 2. InstantPC でラベル化された A) リツキサンおよび B) エンブレル N-グリカンの HILIC-UHPLC 蛍光プロファイル。N-グリカンの相対面積 (%) を表 1 と 2 に示します (n = 4)。UHPLC 条件および Q-TOF パラメータを表 3 と 4 に示します。

表 1. InstantPC でラベル化されたエンブレル N-グリカンの相対面積、標準偏差、および CV 値 (n = 4)

	平均相対面積 (%)	標準偏差	%CV
G0F-N	0.520	0.000	0.000
G0	1.288	0.005	0.388
G0F	42.965	0.031	0.072
Man5	1.003	0.010	0.955
G1F[6]	29.453	0.031	0.105
G1F[3]	10.203	0.030	0.293
G2F	7.858	0.013	0.160
G2FS1[6]	0.675	0.010	1.481
G2FS1[3]	0.378	0.015	3.974
G2FS2	0.455	0.010	2.198

表 2. InstantPC でラベル化されたリツキサン N-グリカンの相対面積、標準偏差、および CV 値 (n = 4)

	平均相対面積 (%)	標準偏差	%CV
G0	1.138	0.005	0.440
G0F	20.340	0.055	0.269
Man5	4.073	0.015	0.368
G1[3]	0.320	0.008	2.552
G1F[6]	9.130	0.037	0.410
G1F[3]	4.523	0.013	0.278
G2	2.628	0.010	0.364
G2F	5.573	0.015	0.269
G1FS1	2.628	0.015	0.564
G2S1[6]	0.268	0.005	1.869
G2S1[3]	13.235	0.033	0.251
G2FS1[6]	1.148	0.005	0.436
G2FS1[3]	20.185	0.057	0.285
G2S2	3.478	0.005	0.144
G2FS2	9.143	0.030	0.327

表 3. InstantPC ラベル化 N-グリコシンの LC/FLD 分析条件

パラメータ	設定値		
カラム	Agilent AdvanceBio アミド HILIC、 2.1 × 150 mm、1.8 μm (p/n 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	77	0.6
	45	59	0.6
	46	40	0.6
	47	40	0.6
	49	77	0.6
60	77	0.6	
注入量	1 μL		
蛍光検出器	Agilent 1260 Infinity II FLD InstantPC : λEx 285 nm、λEm 345 nm		

## Gly-X InstantPC の使用開始

### 糖タンパク質サンプル前処理の注意事項

糖タンパク質サンプルは、低塩濃度の中性緩衝液中に、界面活性剤やアミンのような求核試薬がない状態で、最大 2 mg/mL に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) 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 (例えば各 2 mg/mL 溶液を 2 μL)。mAb にはさらに多くのタンパク質を使用できますが (最大 100 μg)、データの直線性を評価する必要があります。
- 緩衝液：界面活性剤やアミンなどの求核試薬を含まない低塩濃度 (約 150 mM) の中性緩衝液。サンプルを水または 50 mM HEPES (pH 7.9) で希釈することができます。

その他の注意事項：

- アミン緩衝液 (例えば、トリス、アルギニン、グリシン、ヒスチジン) 中のサンプルの成分は、バッファー交換ステップを実施してから脱グリコシル化する必要があります。10 kDa 分子量カットオフスピン遠心分離フィルタを推奨します。
- サンプルをプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーで前処理する場合は、溶出液として 0.1% ギ酸を使用する必要があります。
- PBS は推奨しません。
- 詳細については、Gly-X InstantPC のマニュアルをご覧ください。<sup>5</sup>

表 4. InstantPC ラベル化 N-グリコシンの質量分析パラメータ

Agilent 6545XT Q-TOF	
イオン源	デュアル AJS ESI
ガス温度	150 °C
ドライガス流量	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 600 ~ 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 (2 GHz)

## インキュベーションおよびクリーンアップ用ハードウェア

Gly-X InstantPC のサンプル前処理では、タンパク質変性の際にサンプルを 90 °C まで加熱し、PNGase F 消化と InstantPC ラベリングの際に 50 °C まで加熱します。提供される 96 ウェルプレートでサンプルを加熱する際には、サーマルサイクラーまたは乾燥ブロックヒーターの使用を推奨します。推奨製品を下に示します。クリーンアッププロセスは、吸引濾過にすることで促進できます。推奨の Millipore モデル以外の真空マニホールドおよびポンプの使用をご希望の場合は、アジレントにお問い合わせください。

加熱および吸引濾過用ハードウェア (他社製)	部品番号
96 ウェルサーマルサイクラー (Corning)	THERM-1001、110V THERM-1000、230V
乾燥ブロックヒーター、4 ブロック、HB4DG、US (数量：2) (Troemner)	HB4DG
モジュール式加熱ブロック (数量：2) (VWR)	VWR 13259-260
真空マニホールド (Millipore)	MSVMHTS00
真空ポンプ (Millipore)	WP6211560、110 V WP6122050、220V

## HILIC 分離のベストプラクティス

HILIC 分離では、1 µL の少量のラベル化グリカンを注入することが最も有効です。水性の注入量が > 1 µL になると、ピーク形状と分離能が損なわれます。注入量 > 1 µL の有機溶媒によるサンプル希釈の手順については、Gly-X InstantPC のユーザーマニュアル [5994-1231JAJP の 14 ページ](#) をご覧ください。

HPLC システムを最適化して、デッドボリュームを最小限に抑える必要があります。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。

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。

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。

## グリカン標準品

アジレントは、InstantPC でラベル化された遊離 N-グリカン標準品およびライブラリを幅広く提供しています。これらの製品により、遊離グリカンの分析に使用する LC/FLD/MS システムをキャリブレーションできます。ラベル化 N-グリカン標準品の詳細なリストについては、グリカン標準品のテクニカルリーフレット [5994-2202EN](#) をご覧ください。グリカン標準品は、グリカン異性体と不分離ピークの同定において重要です。共溶出の可能性があるのは、G0F/Man5、Man5/G1、G1FS1/G2F などです。

## 標準品、カラム、消耗品などの情報

下の表に記載されている製品をアジレントオンラインストアから注文するには、MyList # ヘッダーリンクをクリックして、製品を [お気に入りの製品] リストに追加します。次に、必要な製品の数量を入力してカートに追加し、レジに進みます。リストは [お気に入りの製品] に残り、将来のご注文の際にご使用いただけます。

[お気に入りの製品] を初めてご使用になる場合は、アカウント確認のために電子メールアドレスの入力が求められます。すでにアジレントのアカウントをお持ちの場合は、ログインできます。アジレントのアカウントをお持ちでない場合は、ご登録が必要になります。この機能は、e-コマースが有効である地域でのみご利用いただけます。すべての商品は、アジレント営業所や販売店から注文できます。

リスト 1 Gly-X InstantPC 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

品名	部品番号
<b>サンプル前処理</b>	
AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットおよび InstantPC キット、96-ct	GX96-IPC
AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットおよび InstantPC キット、24-ct*	GX24-IPC*
Gly-X 真空マニホールドスペーサ	GX100
<b>HILIC カラム</b>	
AdvanceBio アミド HILIC 300Å、2.1 X 150 mm、1.8 µm	859750-913
<b>試薬</b>	
InfinityLab UltraPure LC/MS 用アセトニトリル (1 L)	5191-4496
MS ソリューション、ギ酸、10 mL	US-700002341
AdvanceBio ギ酸アンモニウム移動相濃縮液、10 mL	G3912-00000
InfinityLab UltraPure LC/MS 用純水	5191-4498
<b>バイアルとキャップ**</b>	
スクリュートップバイアル、250 µL、100 個	5190-2242
キャップ、スナップ、青、PTFE/シリコンセプタム、100 個 キャップサイズ：11 mm	5182-0541

\* 24-ct キット (GX24-IPC) には、96 ウェルクリーンアッププレートが含まれます。クリーンアッププレートは室温で保管し、Gly-X InstantPC 脱グリコシル化およびラベリングモジュールの 24-ct リフィル (GX24-201PC) を注文してください。

\*\*InstantPC ラベル化グリカンは 96 ウェルプレートに溶出します。サンプルはプレートから直接 LC に注入するか、またはサンプルバイアルに移します。

リスト 2 Gly-X InstantPC N-グリカンサンプル前処理キットとモジュールの追加の構成

品名	部品番号
AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットおよび InstantPC キット、96-ct	GX96-IPC
AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットおよび InstantPC キット、24-ct	GX24-IPC
AdvanceBio Gly-X 脱グリコシル化モジュール、24-ct	GX24-100
AdvanceBio Gly-X InstantPC ラベリングモジュール、24-ct	GX24-101
AdvanceBio Gly-X 脱グリコシル化モジュール、96-ct	GX96-100
AdvanceBio Gly-X InstantPC ラベリングモジュール、96-ct	GX96-101
AdvanceBio Gly-X InstantPC クリーンアップモジュール、96-ct	GX96-102
AdvanceBio Gly-X 脱グリコシル化および InstantPC ラベリングモジュール セット、24-ct	GX24-201PC
AdvanceBio Gly-X 脱グリコシル化および InstantPC ラベリングモジュール セット、96-ct	GX96-201PC
Gly-X 真空マニホールドスペーサ	GX100

## グリカン標準品

アジレントのラベル化 N-グリカン標準品の詳細なリストについては、グリカン標準品テクニカルリーフレット [5994-2202EN](#) をご覧ください。

リスト 3 リツキシマブ中に存在する InstantPC ラベル化 N-グリカン標準品。<sup>2</sup> これらの標準品は N-グリカン分離でコントロールとして使用し、不分離ピークを区別できます。

リスト 3 (リツキシマブで検出された N-グリカン)

品名	CFG 構造	部品番号
G0F-N / FA1		GKPC-402
G0 / A2		GKPC-301
G0F / FA2		GKPC-302
Man5 / M5		GKPC-103
G1 / A2G1		GKPC-317
G1F / FA2G1		GKPC-316
G2F / FA2G2		GKPC-305
G2FS1 α(2,3) / FA2G2S(3)1		GKPC-325
G2FS2 α(2,3) / FA2G2S(3)2		GKPC-323

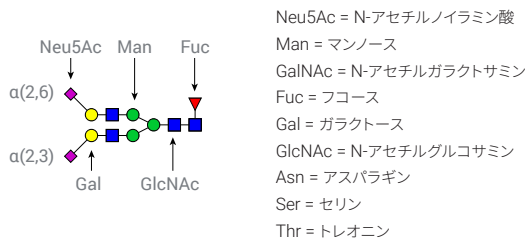


図 3. グリカンの模式図は、CFG (Consortium for Functional Glycomics) <sup>6</sup> の推奨に従い、GlycoWorkbench 2.14.10 を使用して描きました。

リスト 4 エタネルセプト中に存在する InstantPC ラベル化 N-グリカン標準品。<sup>2</sup> これらの標準品は N-グリカン分離でコントロールとして使用し、不分離ピークを区別できます。

リスト 4 (エンブレレで検出された N-グリカン)

品名	CFG 構造	部品番号
G0F-N / FA1		GKPC-402
G0 / A2		GKPC-301
G0F / FA2		GKPC-302
Man5 / M5		GKPC-103
G1 / A2G1		GKPC-317
G1F / FA2G1		GKPC-316
G2 / A2G2		GKPC-304
G1FS1 α(2,3) / FA2G1S(3)1		GKPC-330
G2F / FA2G2		GKPC-305
G2S1 α(2,3) / A2G2S(3)1		GKPC-321
G2FS1 α(2,3) / FA2G2S(3)1		GKPC-325
G2S2 α(2,3) / A2G2S(3)2		GKPC-322
G2FS2 α(2,3) / FA2G2S(3)2		GKPC-323

リスト 5 AdvanceBio InstantPC ラベル化高マンノース型 N-グリカン標準品

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

リスト 6 シアル化糖タンパク質の研究用の InstantPC ラベル化 3 本鎖および 4 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ。グリカンの構造は分析証明書に記載されています。

品名	部品番号
InstantPC α(2,3) シアル化 3 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKPC-233
InstantPC α(2,6) シアル化 3 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKPC-263
InstantPC α(2,3) シアル化 4 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKPC-234
InstantPC α(2,6) シアル化 4 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ	GKPC-264

リスト 7 N-グリカンライブラリとコントロール糖タンパク質。グリカンの構造は分析証明書に記載されています。

品名	部品番号
ヒト IgG N-グリカンライブラリ: InstantPC でラベル化された、複数のバイセクティング GlcNAc N-グリカンなどの通常のヒト IgG の N-グリカンと一致する複雑な 2 本鎖糖鎖オリゴ糖で構成されています。	GKPC-005
CHO mAb N-グリカンライブラリ: 多数の CHO 由来モノクローナル抗体 (mAb) 中に存在する、InstantPC でラベル化された複雑な中性フコシル化 2 本鎖糖鎖 N-グリカンおよび高マンノース型 N-グリカン Man5 で構成されています。	GKPC-020
CHO mAb N-グリカンライブラリ + CHO mAb 糖タンパク質: 多数の CHO 由来治療用糖タンパク質中に存在する複雑な 2 本鎖糖鎖および高マンノース型 N-グリカンで構成されています。ライブラリの元になる糖タンパク質は、サンプル前処理の含有物中にコントロールとして含まれています。	GKPC-020-P
AdvanceBio InstantPC マルトデキストリンラダー: グルコース単位 (GU) 値を生成するためのラダー標準品として使用します <sup>7</sup> 。	GKPC-503
Agilent-NISTmAb、25 μL	5191-5744
Agilent-NISTmAb、4 x 25 μL	5191-5745

リスト 8 親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) 分析に利用する AdvanceBio アミド HILIC カラム詳細については、アジレントの [ウェブサイト](#) をご覧ください。

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

## 参考文献

1. N-Glycan Analysis: Better Together. Agilent Brochure [5994-1647EN](#), 2020.
2. 遊離 N-グリカンの LC/FLD/MS 分析のために改善された親水性相互作用液体クロマトグラフィー, Agilent Application Note. [5994-6916JAJP](#), 2023.
3. Agilent AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理と InstantPC キット: シンプルなワークフローによる高速 FLD/MS グリカン分析, Agilent フライヤー [5994-0918JAJP](#), 2019.
4. Glycan Standards Technical Flyer, [5994-2202EN](#), 2020.
5. Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep with InstantPC Kit, 96-ct (formerly ProZyme). User Manual [5994-1231EN](#).
6. Y Xie, et al. High-throughput and high-sensitivity N-Glycan profiling: A platform for biopharmaceutical development and disease biomarker discovery. *Analytical Biochemistry*, Volume 623, 15 June 2021, 114205.
7. Varki A, et al. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology*. 2015 Dec; 25(12): 1323–1324.

## 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。すべてのやり取りにおいて、お客様が目標を達成するのに役立つ見えない価値を提供させていただきます。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](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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いません。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。

DE44396.4422106482

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, December 7, 2023

5994-3926JAJP